

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA**

Geisa Baptista Barros

**ESTUDO LONGITUDINAL DE MARCADORES
SOROLÓGICOS PARA O
IMUNODIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE
AGUDA HUMANA**

Belo Horizonte

2009

Geisa Baptista Barros

**ESTUDO LONGITUDINAL DE MARCADORES
SOROLÓGICOS PARA O
IMUNODIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE
AGUDA HUMANA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina
Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade
Federal de Minas Gerais, como requisito parcial
à obtenção do Título de Doutor em Ciências
da Saúde, Infectologia e Medicina Tropical.

Orientador: Professor Dr. José Carlos Serufo

Coorientador: Professor Dr. José Roberto Mineo

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2009

Barros, Geisa Baptista.
B277e Estudo longitudinal de marcadores para o imunodiagnóstico da toxoplasmose aguda [manuscrito]. / Geisa Baptista Barros. - - Belo Horizonte: 2009.
173f.: il.
Orientador: José Carlos Serufo.
Co-orientador: José Roberto Mineo.
Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Toxoplasmose. 2. Marcadores Biológicos. 3. Citometria de Fluxo. 4. Dissertações Acadêmicas. I. Serufo, José Carlos. II. Mineo, José Roberto. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WC 725



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO
Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640
cpg@medicina.ufmg.br



ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO de **GEISA BAPTISTA BARROS**, nº de registro 2005202325. Às treze e trinta horas do dia quatro do mês de setembro de dois mil e nove, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG, a Comissão Examinadora de tese indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar o trabalho final intitulado: **"ESTUDO LONGITUDINAL DE MARCADORES SOROLÓGICOS PARA O IMUNODIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE AGUDA HUMANA"**, requisito final para a obtenção do grau de doutor em Ciências da Saúde, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical. Abrindo a sessão, o presidente da comissão, Prof. José Carlos Serufo, após dar a conhecer aos presentes o teor das normas regulamentares do trabalho final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. José Carlos Serufo/orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovada</u>
Prof. José Roberto Mineo/ coorientador	Instituição: UFU	Indicação: <u>Aprovada</u>
Profa. Regina Lunardi Rocha	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovada</u>
Prof. Carlos Maurício Figueiredo Antunes	Instituição: SCM/BH	Indicação: <u>Aprovada</u>
Prof. Fausto Edmundo Lima Pereira	Instituição: UFES	Indicação: <u>Aprovada</u>
Prof. Marcelo Simão Ferreira	Instituição: UFU	Indicação: <u>Aprovada</u>

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA.
O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo presidente da comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 04 de setembro de 2009.

Prof. José Carlos Serufo /orientador _____

Prof. José Roberto Mineo / coorientador _____

Profa. Regina Lunardi Rocha _____

Prof. Carlos Maurício Figueiredo Antunes _____

Prof. Fausto Edmundo Lima Pereira _____

Prof. Marcelo Simão Ferreira _____

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha (coordenador) _____

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.
Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde; Infectologia e Medicina Tropical
Faculdade de Medicina / UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**REITOR**

Prof. Ronaldo Tadêu Pena

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof^a Elizabeth Ribeiro da Silva

PRÓ-REITOR DE PESQUISA

Prof. Carlos Alberto Pereira Tavares

DIRETOR DA FACULDADE DE MEDICINA

Prof. Francisco José Penna

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

Prof. José Carlos Bruno da Silveira

**COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE: INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL**

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha (Coordenador).

Prof. Vandack Alencar Nobre Júnior (Sub-coordenador)

Prof. José Roberto Lambertucci

Prof. Ricardo de Amorim Correa

Prof. Antônio Luiz Pinho Ribeiro

Jader Bernardo Campomizzi (representante discente)

DEDICATÓRIA

À Maria Marleide Dutra e
Daniel Dutra Salmi.

A mãe cuidou do bebê
na medida do que todos os bebês precisam:
atenção, afeto e investimento.
Eu, pediatra, vendo isso, procurei fazer o mesmo:
apoiar a mãe, acompanhar o crescimento
e desenvolvimento do bebê,
vibrar com suas conquistas
e o que mais ele precisasse.

A toxoplasmose compôs o cenário,
mas não roubou a cena.

AGRADECIMENTOS

Por meio de minha lente subjetiva, vislumbro muitas pessoas a quem devo agradecer. Arrependo-me de não ter começado estas linhas bem no início do doutorado. A memória é traiçoeira, principalmente nas cansadas etapas finais deste longo trabalho. Ainda o farei pessoalmente. Que a ABNT me perdoe tamanha informalidade!

Quero muito carinhosamente agradecer:

Ao Coordenador da Pós-Graduação da UFMG, Professor Manoel Otávio da Costa Rocha, por aceitar este trabalho; receber um pós-graduando de fora do estado não é lá muito previsível. Sei das dificuldades que causei. Quero que saiba, professor, que seu tratamento tão igual para comigo me encheu de responsabilidade. Respeito profundamente o seu compromisso com a pós-graduação e com esta instituição de ensino.

Ao meu orientador, Professor José Carlos Serufo, poeta e imortal da Academia Mineira de Medicina, confesso, que sua postura como orientador, me encantou. Tem apreço pelos alunos e gosta de ensinar, vibra com a estrada do conhecimento. A gente sente quando ouve você falar sobre os seminários, os trabalhos, as conquistas. Positivo, sereno e bem humorado, me transmitiu seu vasto conhecimento e equilíbrio nos momentos difíceis. Gostava de ouvi-lo falar: “agora vou trocar de HD e trabalhar na tese do Arnaldo, da Boni, da Lucimara...”. Simultaneamente, nesta ocasião, o Serufo tinha nove alunos sob sua orientação, cada qual com um tema diferente. Invejo sua capacidade de se concentrar no trabalho “dos outros” lá pelas oito horas da noite, depois de um dia inteiro de muitas correrias e pouca comida. Você precisa se alimentar melhor. Mesmo os imortais precisam. Aquelas paradinhas de puxão de orelha para “deixar azulejos e louças do banheiro pra depois”, eu nunca vou esquecer. “Alicerce e estrutura, senão não se pode construir nada”. Se um dia eu for orientar alguém, vou “copiar” você. Obrigada pelo suporte imprescindível na execução da imunofluorescência indireta. Tenho um grande arrependimento, de não ter podido aproveitar mais de tudo o que você sabe. Mas quem sabe, depois de se aposentar, você não vem pra Vitória nos ajudar a montar o Laboratório de Referência para o Diagnóstico da Toxoplasmose? O convite está feito.

Ao meu coorientador Professor José Roberto Mineo, pela seriedade, competência e amizade. Obrigada por ter-me aberto as portas do Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Uberlândia. O ambiente de trabalho e a equipe que você construiu, deveriam existir em todas as instituições de pesquisa e ensino formadoras de recursos humanos. Tudo com o apoio fiel e aguerrido da Deise, incansável e competente Doutora Deise, capaz de “fritar o peixe e vigiar o gato”, de olho nos detalhes! Agradeço também à Ana Cláudia, Flávia, Marlei e Cilene pelo apoio na execução dos ensaios de ELISA, na preparação dos antígenos para citometria de fluxo e lâminas de imunofluorescência. A capacitação técnica e o compromisso que pude vivenciar entre vocês me fizeram sentir orgulhosa e privilegiada. Obrigada também, Mineo, por me deixar conhecer a Dona Cida e Luisa, seres humanos da mais alta qualidade.

À biblioteconomista Fátima do Rosário, da UFMG, pela atenção dispensada na Biblioteca J. Baeta Viana. Eu precisava muito ser acolhida na chegada e você percebeu isso.

Aos meus colegas do Departamento de Pediatria da UFES, por me permitir tão longo tempo de afastamento, na busca de um aprimoramento que a tantos de nós professores não é viável, por motivos os mais diversos. Este grupo tem mostrado força, vigor, persistência e energia nesta caminhada institucional tão difícil. Isso só pode vir das crianças!

À Suzana, minha companheira de trabalho no alojamento conjunto do Hospital Universitário Cassiano Antonio Moraes (HUCAM), que comigo partilha as dificuldades de ensinar alunos de um lado e atender mães e bebês de outro, tenho ao meio uma instituição indiferente, insensível e quase sempre incapaz de prover condições de ensino, assistência e trabalho dignos de todos nós. Perdoe-me pelo abandono destes anos. Vou te contar uma verdade, caso você ainda não saiba: você é a melhor professora de internos no alojamento conjunto que já conheci.

Aos profissionais da biblioteca da UFES, Rita, Dona Elza, Luciano, coordenados pela biblioteconomista Genaid. Meu cantinho na sala 1 ou 2 foi minha moradia por meses. Eu era meio “clandestina”. Acobertada por vocês, entrava cheia de tralhas, computador, uma “mala” de referências. Até uma cadeira mais confortável você permitiu, Genaid, que eu colocasse ali. Ao Charles em especial, pelos artigos que conseguia para mim tão prontamente. Como é bom poder ler logo aquela informação que achamos, vai nos salvar da ignorância!

Aos profissionais e amigos do Laboratório Tommasi, Wanderléia e José Robson, por serem tão prestativos. Vocês foram fundamentais para que eu chegasse aos colegas médicos e aos pacientes. E também à Ester, pelas mãos de fada naquelas flebotomias difíceis!

À Dra Adília Binda, do Laboratório Bioclínico, por facilitar o acesso aos médicos e resultados laboratoriais.

Aos amigos e profissionais da Central Sorológica de Vitória. Professor Sílvio Foletto, diretor do laboratório, por me deixar sentir em casa na sua casa, onde realizamos as sorologias pelo método ELFA. Quantas vezes ao telefonar para o Sílvio, ouvia do outro lado da linha: “Doutora, a senhora não pede, a senhora manda! Diga o que posso fazer para ajudá-la!” E quantas vezes nós ligamos para o fabricante, de sua sala, no meio de tão atribulada tarde de trabalho, a fim de resolver o que fazer com nossos altos títulos de IgG! O que será que acontece com o sangue dos franceses, heim? Só nós temos este problema? Cristine, que diariamente me dava informação e localizava as amostras vindas de outros laboratórios do interior do estado. Michel, farmacêutico e bioquímico, com tantos afazeres e sempre disponível para resolver as minhas urgências, que com certeza estavam na contramão das suas. Felipe Foletto, jovem farmacêutico da CSV, com quem trabalhei no terceiro turno. Foram muitas noites, em pleno janeiro, e nós lá. Prestativo e atencioso, seguia à risca as recomendações de seu tio (para que me tratasse muito bem), que brincava sobre o fato de que eu ter sido sua pediatra no passado, longínquo.. Felipe, um grande futuro.

Aos profissionais e amigos do Laboratório Carlos Chagas, pelas incontáveis amostras que processaram para mim.

Aos funcionários dos laboratórios de outros municípios e de fora do estado,

À Reynaldo e Simone, do Labmicra em Belo Horizonte, responsáveis pela realização da imunofluorescência indireta.

Às pessoas com quem me comuniquei, por telefone, incontáveis vezes, e que me encaminharam soros dos pacientes. Nunca nos vimos pessoalmente. O interesse e o entendimento deles sobre a pesquisa foram fundamentais para a viabilidade do seguimento;

À Zildete, Laboratório Rothier em Marechal Floriano; Rose, Laboratório Laboclin de Itarana; Poliana, Laboratório Arnaldo Maia em São Mateus; Jonely, de Porto Seguro; Wendel, Hermes Pardini de Belo Horizonte; Robson, Barralab, de Conceição da Barra.

À Carlinha, bióloga do Núcleo de Doenças Infecciosas (NDI)- UFES, pela competência meiga e sorridente, organização e capricho no cuidado com a soroteca. Seguindo os mandamentos do mestre, ela fez dois arquivos de soro, guardados em locais distintos. Afinal, o seguro morreu de velho. À Valéria, pela disponibilidade em receber as amostras, quase sempre naquelas horas mais impróprias.

Aos meus colegas médicos, que atenderam ao pedido e me encaminharam seus pacientes com toxoplasmose aguda: Luciana, Aloísio, Lauro, Eliana, Adriana, Fabíola, Simone, Cristiana, Lucília, Luís Henrique, Li Márcia, Nilo, Sueli e Paulo. Um destaque para Urbano. Há mais de 20 anos, trabalhamos juntos no pronto socorro do Hospital Universitário, eu no quinto ano da graduação, ele o clínico responsável pelo plantão. Até hoje não me esqueço do diagnóstico de hanseníase tuberculóide reacional. Fiquei impressionada! Que grande professor de médicos é o Dr. Urbano! Com competência e compromisso, é um exemplo para todos os que tem a chance de estar sob sua orientação. Sem o seu empenho, Urbano, eu não teria conseguido chegar aos pacientes. Obrigada mesmo!

À Elenice, farmacêutica do NDI, com quem convivi intensamente na fase final do trabalho. Obrigada pelo tempo que dedicou a mim. Marcadinho na agenda você dizia, olhando para o relógio: “hoje eu tenho uma reunião às quatro, mas de cinco e meia em diante estou livre. Aí a gente senta e vê tudo direitinho...”. Elenice organizou em equipe todo o trabalho realizado em citometria de fluxo. Meticulosa e desconfiada (ela é mineira!), nunca se deixou seduzir pelos primeiros resultados. Analisou e questionou até os quarenta e cinco minutos do segundo tempo os números que pulavam das fitas e telas dos nossos equipamentos, afinal resposta imunológica talvez seja tão particular quanto a impressão digital! Não me esqueço do quanto ela ria nos momentos em que eu me desesperava. Tia, você ainda me paga!

À Priscila, mestranda da Pós-Graduação da UFES, que compartilhou o mesmo material e realizou os experimentos da citometria de fluxo. Sua destreza com os softwares me valeram demais! Cada gráfico e figura tem um toque dela.

À Eliana Zandonade, que em conjunto conosco trabalhou a sessão de bioestatística com a racionalidade característica dela. Meu Deus, eu precisava só de um pouquinho disso pra mim! .

À Bete, por sua disponibilidade, seu radar, verdadeiro GPS, altamente preciso, a captar as necessidades de quem a cerca, sempre carinhosa e preocupada. Obrigada por me suprir a ausência e me deixar tranqüila e menos culposa. Aprendo com você, Bete, o que não se pode aprender em fontes disponíveis por aí.

Ao meu amigo e companheiro de jornada Marco Antônio, pelo suporte, ao seu modo, nos momentos importantes, seu jeito meigo, educado e cuidadoso no lidar do dia a dia e principalmente pelos generosos “descontos”, quando me pega naqueles momentos mais impulsivos e desprovidos de paciência.

Às médicas da Clínica Perinatal Vitória (CPV), Karina, Iria e Silvia, coordenadoras da equipe de assistência, juntamente com Jaqueline (enfermeira), Mariane (psicóloga) e Virgínia (fonoaudióloga), pela competência e sintonia no trabalho. Elas dão conta, deixando o cotidiano fluir muito bem. Me “blindaram” da minha agenda, assumindo as minhas tarefas. Ufa, foi bom!

À Romão, gerente da Clínica Perinatal Vitória, por me tirar de sufocos diversos e pelas parcerias em alguns projetos. Uma boa energia, positiva e competente.

À Antonio Carlos, psicanalista, por me dar aquele empurrão no início (e no meio, e no fim...). Não esqueço do que me disse, no dia em que as inscrições para as provas terminariam: “vá, vá fazer alguma coisa por você!”

Aos pacientes. Eles se dispuseram ao acompanhamento sorológico sabendo que não iriam ser beneficiados diretamente por isso. Pessoas de todas as camadas sociais. Solidariedade, confiança, disponibilidade. Sempre uma palavra agradável, um certo orgulho de talvez contribuir. Com cada um deles eu aprendi algo. Refleti sobre o que participei de suas vidas, dificuldades, dramas e dilemas comuns aos humanos. Nas horas de perdas e despedidas, o apoio e a necessidade da crença, da fé. O zelo das mães dos menores e mesmo de alguns “maiores”. A sabedoria de um pai em lidar com o filho adolescente. Sua receita de sucesso: “ficar perto, junto, conversar, acompanhar, doar mais tempo e atenção e menos dinheiro, isso é importante”, me disse ele várias vezes enquanto conversávamos tomando café em sua casa. Do alto de seus quase setenta anos, me transmitiu paciência para aguardar a hora de colher os frutos de tudo o que se plantou. Entrei em suas casas, seus locais de trabalho. Pedi licença, tive que respeitar horários; aprendi a depender dos outros, apurar o trato para com as individualidades. Isso foi muito bom.

À minha aura de sorte, de estar ali perto de tantos autores deste tema, ao vivo e à cores, no Congresso Internacional do Centenário de Descobrimto do *Toxoplasma gondii*, em Armação de Búzios, 2008. Isso sim que foi unir o útil ao agradável!

Aos meus familiares,

Meu marido, Reynaldo Dietze, professor pesquisador e coordenador do NDI (Núcleo de Doenças Infecciosas da UFES). Tentei separar os agradecimentos em duas partes, mas aqui vou ter que juntar o público com o privado. Agradeço toda a estrutura colocada à minha disposição. Sem o seu credencial (que credencial!) eu nem teria começado este trabalho. Reynaldo participou de forma fundamental da formatação das idéias e estruturação da rede de colaboração que foi criada. Para este capricorniano, nada é impossível. Está sempre à busca de algo que acrescente ao conhecimento científico. É dele a idéia de criar o Laboratório de Referência para o Diagnóstico Sorológico de Toxoplasmose do nosso Estado (Espírito Santo), que ele brinca chamando de “Palo Baixo”, em oposição ao famoso Palo Alto, na Califórnia. Sei que não foi fácil pra você me ver percorrer caminhos tão longos, quando você os enxergava ali, bem debaixo do meu nariz. Era-me difícil ouvir aquela sua célebre pergunta: “isso é o melhor que você pode fazer?” Mais difícil ainda era encarar a resposta, que vinha escancarada, embutida e colada à pergunta. Obrigada pelo super apoio nos momentos de sofrimento. Apoiar é algo mágico, faz a diferença entre permanecermos deitados, inertes ou ficarmos de pé pra continuar. Nossos filhos tiveram, na minha ausência, a sua companhia preciosa. Isso foi muito importante pra mim.

Meu pai, pelo exemplo de bom humor, valores e visão de futuro. Muitas foram as decisões que tomei na vida seguindo a essência que captei de você, papai. Suas histórias, eu adoro ouvir, nos faz matar a saudade e reviver aqueles tempos, tão bons!. Seu olhar sobre mim, de orgulho e aprovação, foi decisivo.

Minha mãe, pela sabedoria. Alegre e de bem com vida, olha os eventos sob o ângulo positivo. Valoriza o presente, o possível, o real. Aceita as limitações e não se lamenta: vão-se os anéis, ficam-se os dedos..mamãe celebra a vida todos os dias.

Meus filhos, Rafael e Clara, pela oportunidade de sonhar e viver com toda a intensidade novamente, de tentar acertar mais e errar menos, de “apostar e investir na bolsa do amor”, tomando-lhe os dividendos diariamente. Preciso também pedir desculpas, por ausências e presenças cansadas. Talvez um dia isso faça sentido pra vocês.

Meus sogros, pela certeza concreta de uma super e sempre pronta retaguarda, que eu usei com bastante freqüência. Muito carinho, camuflado de uma fria competência germânica. Mas essa capa é fina, a gente logo logo percebe.

Meus cunhados mineiros, Cristiano e Daniela, que me acolheram em sua casa. Os vinhos dele (muito bons!) e as comidinhas e mimos dela me encheram de atenção e deixaram a estrada mais leve. No final quase me mudei de vez para este tão Belo Horizonte! .`As sobrinhas Isabela e Biba, que me ofereceram seus quartos, computadores e tudo mais que precisei nas minhas vindas à BH.

Tia Herta, minha querida tia postiça, que me acolheu com todo carinho e atenção em Uberlândia. Lá passei muitíssimo bem!

Fátima e Neuzinha, minhas fiéis escudeiras do lar. São elas que fazem a nossa casa funcionar. Elas sabem tudo!

Minhas amigas, esta rica rede feminina composta de primas, tias, vizinhas, colegas faculdade, de mestrado, de trabalho, com quem eu convivo ou convivi. Vou deixar este espaço vazio de nomes, para que todas vocês, queridas, possam ter a certeza, e eu garanto isso, de que contribuíram, pelos laços fortes que nós sabemos dar quando precisamos.

Meus irmãos, Gegeu e Nélio, meus companheiros de infância, cúmplices. Comungamos muitas das mais importantes coisas da vida: pai, mãe, colégio, amigos, professores e também livros, que já me chegavam velhos. Eu sou a mais nova dos três.

E, finalmente, e de novo, à Nélio, pela oportunidade que me trouxe nesses últimos tempos, de reavaliar o rumo da vida.

À vida.

CONATA

jocase

Domesticado desde tempos remotos,
cosmopolizou-se, entranhou-se
marcando-nos a carne por toda vida.
Sete em cada dez de nós
portam esses chips toxoplásmicos,
quase todos sem o saber,
até que um dia,
ao baixar a guarda imune,
adubam nossos linfonodos,
se não também o miolo.

Os resultados sorológicos,
indicativos de fase aguda,
vendem gato por lebre.

A infecção aguda,
em útero materno,
pode ser catastrófica para o feto,
enturvar seus olhos,
plasmar uma inteligência cerebróide.

Tudo isso motivou a mãe,
médica de neonatos,
caráter douto e nato.
Cientista famélica, de claros olhos acesos.
constituiu esgotante painel de amostras,
ao longo de anos,
incorporou equipes e instituições,
matizou sonhos,
materializando citometrias de fluxo.
A IgM e uma avidez após a outra,
assinalam melhor
a doença aguda ou a convalescente...

Assim, Geisa, pioneira ávida,
deslumbrou toda a sua competência...
Parabéns, doutora!

RESUMO

RESUMO

Toxoplasma gondii infecta um terço da população mundial. A infecção aguda que, em geral, é assintomática, pode ser transmitida por via transplacentária, levando a riscos para o feto. Os testes sorológicos disponíveis apresentam limitações para estabelecer o diagnóstico temporal da toxoplasmose aguda. Não foram encontrados estudos de imunodiagnóstico da toxoplasmose aguda humana com painéis de amostras seqüenciais, coletadas ao longo de 12 meses. Da mesma forma não há descrição da utilização da citometria de fluxo (CF) para determinação da avidéz e subclasses de IgG. Esse estudo longitudinal de coorte prospectivo, analítico-descritivo, atende à crescente demanda para o desenvolvimento de marcadores diagnósticos mais acurados que permitam distinguir infecção aguda daquela adquirida num passado recente.

No período de junho de 2005 a maio de 2008, foram acompanhados, por um ano, 31 pacientes com infecção aguda. Amostras foram coletadas nos meses 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 e 12 após o início dos sintomas e foram separadas em três grupos: grupo 1, infecção aguda (meses 1, 2 e 3); grupo 2, infecção convalescente precoce (meses 4, 6 e 8); grupo 3, infecção convalescente tardia (meses 10 e 12). Utilizaram-se as técnicas clássicas de imunofluorescência indireta (IFI) para detecção de IgG e IgM anti-*T. Gondii*; ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent Assay*) para IgG, IgM e IgA específicas; ELFA (*Enzyme-linked fluorescent assay*) para IgG, IgM e avidéz de IgG específicas. A CF foi padronizada para quantificação dos anticorpos IgG e IgM, subclasses de IgG e avidéz de IgG anti- *T. gondii*. Para os testes ELISA, ELFA e avidéz ELFA e para os testes desenvolvidos nesse estudo dois pontos de corte foram escolhidos: a) aqueles preconizados pelo fabricante ou laboratório executor e b) pontos de corte ajustados para o diagnóstico de infecção aguda, utilizando os valores de sensibilidade e especificidade que compõem as tabelas que geraram as curvas ROC. Com intuito de classificar um novo indivíduo em uma das três fases da doença utilizaram-se metodologias de análise discriminante.

O presente estudo reafirmou as limitações do uso de IgA na avaliação temporal da infecção aguda e mostrou que os anticorpos da classe IgM apresentaram sensibilidade diagnóstica para fase aguda de 100% para ELISA, ELFA e CF, e de 89,5% para IFI. Transcorridos 12 meses do início dos sintomas, a permanência de testes IgM foi de 83,8% para ELISA (26/31), 83,3% para ELFA (25/30), 32,6% para CF (16/31) e 29% para IFI (9/31).

Os resultados de avidéz de IgG, obtidos por ELFA demonstraram evolução gradual e consistente de aumento da avidéz ao longo dos 12 meses. Com a técnica de CF, o aumento de avidéz de IgG foi mais marcante e acentuado, com melhora da especificidade. Com exceção da IFI, correlação estatisticamente significativa foi evidenciada para os anticorpos da classe IgM para as técnicas ELISA, ELFA, em todos os meses; ELISA e CF entre os meses 3 e 8; e ELFA e CF do mês dois em diante. Não houve correlação significativa para todos os tempos estudados para os anticorpos IgG e avidéz de IgG. O tempo foi fator estatisticamente significativo para todos os testes utilizados, à exceção de IgG4. A análise comparativa mês a mês dos resultados de IgG obtidos pelas técnicas de ELISA e CF mostrou diferenças entre o primeiro e os demais meses, enquanto nenhuma diferença foi detectada pela IFI. Já os resultados dos testes ELISA, ELFA e CF para IgM nos dois primeiros meses foram estatisticamente diferentes do terceiro mês em diante. Os resultados de avidéz por ELFA e CF distinguem os três primeiros meses dos demais. Dentre as subclasses, a IgG1 comportou-se da mesma forma que a IgG total, enquanto IgG3 foi a que melhor distinguiu o tempo de infecção.

As curvas ROC permitiram estabelecer ajustes nos pontos de corte convencionais com vistas a montar um protocolo que melhor discriminasse a fase aguda da toxoplasmose. O modelo formado por avidéz CF, IgM ELFA e avidéz ELFA apresentou melhor desempenho. Esse modelo mostrou que nenhum paciente do grupo 1 foi erroneamente classificado no grupo 3, e vice-versa, permitindo afirmar que uma amostra não pertence ao grupo convalescente tardio ou que não provém de paciente com infecção aguda.

O presente estudo avaliou pela primeira vez a técnica de CF para detecção da avidéz de IgG, subclasses de IgG e IgM anti-Toxoplasma, e demonstrou que essa poderá ser importante ferramenta para o diagnóstico sorológico das fases aguda e convalescente tardia da toxoplasmose humana sintomática.

Palavras-chaves: toxoplasmose/diagnóstico, toxoplasmose/imunologia, *T. Gondii* diagnóstico, toxoplasmose/fase aguda

SUMMARY

SUMMARY

Toxoplasma gondii is thought to infect one third of the world population. Acute infection is often asymptomatic, but if acquired during pregnancy, *T. gondii* can be transmitted vertically, through the placenta, from mother to fetus, who is at high risk of developing severe disease. The commercially available serological tests have several limitations such as lack of quality control and conflicting results on specificity, and/or sensitivity, making the diagnosis of *T. gondii* acute infection difficult to perform. In addition, none of the diagnostics studies published thus far, have evaluated sequential longitudinal sera panels from the same patients over a 12-month period. To our knowledge there is also no study on the use of flow cytometry (FC) in the measurement of the functional affinity (IgG avidity) and analysis IgG subclasses in acute toxoplasma infection. The present study, a longitudinal descriptive analytical prospective cohort study, was designed to evaluate surrogate markers for the diagnosis of acute and recent past toxoplasma infection.

From June, 2005 to July, 2007, 31 patients with acute toxoplasma infection were enrolled in the study and followed for 12 months after the beginning of symptoms. Paired sera samples from all 31 patients were collected at the following month time points: 1, 2 & 3 (group 1: acute infection), 4, 6 & 8 (group 2: convalescent recent infection) and 10 & 12 (group 3: convalescent late infection). Sera were analyzed by IgG and IgM indirect Immunofluorescence assay (IFA), IgG, IgM and IgA Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA), IgG, IgM and IgG avidity Enzyme-linked fluorescent assay (ELFA). A CF assay was standardized to quantify IgG and IgM antibodies, IgG subclasses and IgG avidity. Two cut-points were chosen for the ELISA, IFA and ELFA assays and also for FC: **a)** according to manufactures' inserts and **b)** cut-off points adjusted according to sensitivity and specificity results using Receiver Operating Characteristic (ROC) curve analysis. Two different discriminant analyses were used in order to classify the patients in one of the three time point groups.

The present study reassures the limitations of using IgA to identify stage-specific diagnosis of infection. IgM assays displayed the most diagnostic sensitivities for detection of acute infection: 100% for ELISA, ELFA and FC and 89,5% for IFA. On the 12th month time point sera collection, persistent positive IgM antibodies were detected on ELISA in 26 of 31 patients (83,8%), on ELFA in 83,3% (25/30), on FC in 32,6% (16/31) and on IFA in 29% (9/31) patients.

The results of ELFA IgG avidity showed progressive and consistent avidity during the 12-month follow-up period. The FC IgG avidity results were more specific. Positive

correlation between assays was only detected with IgM in ELISA, ELFA and FC. This correlation was high with ELISA and ELFA in all time points, with ELISA and FC on months 3 to 8 and with ELFA and FC from the second on. There was no significant correlation for IgG and IgM antibodies between IFA and the other assays. Analysis of variance between all time points were statistically significant for all antibodies assays but IgG4. There was a statistically significant difference between the first and the months thereafter when IgG assays with ELISA and FC were compared. IgG IFA assay results did not distinguish infection between the 12 month time points. However, the ELISA, ELFA and FC IgM assay distinguished the first and second month sera from the others. Among IgG subclasses, only IgG3 distinguished infection time points. The ROC curve analysis was important in establishing cut-off points, which can be used in a future protocol in an attempt to discriminate between acute and more recent past infection. In our study, the best approach model for the temporal toxoplasma infection diagnosis was FC avidity, IgM ELFA and ELFA avidity. This model separated all patients from Group 1 from patients in Group 3 and vice-versa.

This is the first report on the use of FC for IgG avidity, IgG subclasses and IgM in the diagnosis of acute toxoplasmosis. This assay showed high specificity for IgG avidity, IgG3 and IgM anti-toxoplasma antibodies and can be used to separate recent acquired from late convalescent infections.

Key words: toxoplasmosis/immunodiagnosis, toxoplasmosis/acute infection.

LISTAS

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1- Características biológicas e epidemiológicas dos principais genótipos de <i>Toxoplasma gondii</i>	038
QUADRO 2- Classificação dos resultados da combinação de testes, segundo Roberts et al. (2001).....	084

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Desenho esquemático (micrografia eletrônica) de taquizoíta e bradizoíta	040
FIGURA 2 - Cisto tecidual de <i>T. gondii</i> em cérebro de camundongo.	041
FIGURA 3- Ciclo biológico do <i>Toxoplasma gondii</i>	042
FIGURA 4- Transmissão da toxoplasmose	046
FIGURA 5- Relação entre parasita e hospedeiro.....	049
FIGURA 6- Fotografia do fundo de olho mostrando toxoplasmose aguda ocular	051
FIGURA 7- Fluxograma de seleção de pacientes.....	071
FIGURA 8- Fluxograma da metodologia do estudo	073

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 01- Médias das dosagens de IgG por ELISA, ELFA, IFI e CF	093
GRÁFICO 02- Médias das dosagens de IgM por ELISA, ELFA, IFI e CF	094
GRÁFICO 03- Médias das dosagens de IgA por ELISA	095
GRÁFICO 04- Médias das dosagens de Avidéz de IgG por ELFA e CF	096
GRÁFICO 05- Médias das dosagens de Subclasses de IgG por ELFA e CF	097
GRÁFICO 06- Curva ROC dos resultados de anticorpos IgG anti- <i>T.gondii</i> obtidos com diferentes técnicas em soros de pacientes com infecção aguda e convalescente precoce e com infecção aguda e convalescente tardia.....	098
GRÁFICO 07- Curva ROC dos resultados de Ac IgM anti- <i>T.gondii</i> obtidos com diferentes técnicas em soros de pacientes com infecção aguda e convalescente precoce e com infecção aguda e convalescente tardia.....	100
GRÁFICO 08- Curva ROC dos resultados de Ac IgA anti- <i>T.gondii</i> obtidos com diferentes técnicas em soros de pacientes com infecção aguda e convalescente precoce e com infecção aguda e convalescente tardia	101
GRÁFICO 09- Curva ROC dos resultados de avidéz de IgG anti- <i>T.gondii</i> obtidos com diferentes técnicas em soros de pacientes com infecção aguda e convalescente precoce e com infecção aguda e convalescente tardia.....	102
GRÁFICO 10- Curva ROC dos resultados de IgG2 e IgG3 anti- <i>T.gondii</i> obtidos com diferentes técnicas em soros de pacientes com infecção aguda e convalescente precoce e com infecção aguda e convalescente tardia	102
GRÁFICO 11- Pontos de corte correspondentes ao mínimo de 95% de sens. para os testes IgM ELISA, IgM ELFA, IgM CF e IgM IFI	104
GRÁFICO 12- Ponto de corte diagnóstico p/ IgA ELISA anti- <i>T. gondii</i>	105
GRÁFICO 13- Pontos de corte correspondentes ao mínimo de 95% de sensibilidade para os testes de avidéz de IgG	105
GRÁFICO 14- Pontos de corte diagnósticos dos testes para subclasses de IgG por citometria de fluxo.....	106
GRÁFICO 15- Médias de anticorpos IgG ELISA por mês e grupo de tratamento..	151
GRÁFICO 16- Médias de anticorpos IgM ELISA por mês e grupo de tratamento .	152
GRÁFICO 17- Médias de anticorpos IgA ELISA por mês e grupo de tratamento ..	152
GRÁFICO 18- Médias de anticorpos IgM ELFA por mês e grupo de tratamento...	153

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 - Marcadores sorológicos estudados na coorte de 31 pacientes com infecção aguda <i>T. gondii</i> , UFES, 2005-2008	074
TABELA 02 - Análise das perdas de pontos faltantes da coorte de pacientes com infecção aguda <i>T. gondii</i> , UFES, 2005-2008	085
TABELA 03- Características clínicas dos 31 pacientes com infecção aguda pelo <i>T. gondii</i> , UFES, 2005-2008	088
TABELA 04- Correlação entre os resultados dos testes IgG obtidos pelas técnicas ELISA, ELFA, IFI e CF	090
TABELA 05- Correlação entre os resultados dos testes IgM obtidos pelas técnicas ELISA, ELFA, IFI e CF	090
TABELA 06- Correlação entre os resultados dos testes de avidéz de IgG anti- <i>T.gondii</i> obtidos pelas técnicas ELFA e CF	091
TABELA 07- Resultado do teste ANOVA para os testes sorológicos anti- <i>T. gondii</i> com relação ao tempo de infecção	092
TABELA 08 - Curva ROC de IgG dos resultados obtidos nos meses 1 e 2 comparados aos meses 10 e 12	099
TABELA 09- Valores da curva ROC para anticorpos IgM, grupo agudo (G1) em relação aos demais (G2 e G3)	100
TABELA 10- Pontos de corte das curvas ROC dos resultados de IgA do grupo agudo (G1) em relação aos demais (G2 e G3)	101
TABELA 11- Pontos de corte das curvas ROC dos resultados de avidéz de IgG pelas metodologias ELFA e CF do grupo agudo (G1) em relação aos demais (G2 e G3).....	101
TABELA 12- Pontos de corte das curvas ROC dos resultados de subclasses de IgG pela CF do grupo agudo (G1) em relação ao G2 e G3	103
TABELA 13- Pontos de corte diagnósticos, ajustados e desenvolvidos para a abordagem da infecção por <i>T. gondii</i>	104
TABELA 14- Análise de desempenho de 11 testes sorológicos anti- <i>T. gondii</i> segundo estratégia proposta por Roberts <i>et al.</i> (2001)	106
TABELA 15- Resultados da aplicação do modelo de análise discriminante para os 13 testes sorológicos anti- <i>T. gondii</i> com significância estatística, de acordo com os estágios de infecção	108
TABELA 16- Resultados da análise discriminante com quatro testes: avidéz CF, IgM ELFA, avidéz ELFA e IgG2 CF (Modelo 4).....	109
TABELA 17- Resultados da análise discriminante com três testes: avidéz CF, IgM ELFA e avidéz ELFA (Modelo 12)	109

TABELA 18 - Análise do impacto do tratamento e do tempo nos resultados sorológicos, UFES, 2005-2008.....	154
TABELA 19-Variáveis analisadas com e sem imputação de dados.....	155
TABELA 20- Médias e desvios padrões dos resultados com imputação por tratamento	157
TABELA 21- Valores mínimos, máximos, médias, desvios padrões e limites inferiores e superiores dos resultados de IgG.....	158
TABELA 22- Valores mínimos, máximos, médias, desvios padrões e limites inferiores e superiores dos resultados de IgM	159
TABELA 23- Valores mínimos, máximos, médias, desvios padrões e limites inferiores e superiores dos resultados de IgA	160
TABELA 24- Valores mínimos, máximos, médias, desvios padrões e limites inferiores e superiores dos resultados de Avidéz de IgG.....	160
TABELA 25- Valores mínimos, máximos, médias, desvios padrões e limites inferiores e superiores das Subclasses de IgG	161
TABELA 26- Análise dos resultados de anticorpos IgG anti- <i>T. gondii</i> obtidos por diferentes técnicas e comparados mês a mês com o teste de Tukey.....	162
TABELA 27- Análise dos resultados de anticorpos IgM anti- <i>T. gondii</i> obtidos com diferentes técnicas e comparados mês a mês com o teste de Tukey.....	163
TABELA 28- Análise dos resultados de anticorpos IgA anti- <i>T. gondii</i> ELISA comparados mês a mês com o teste de Tukey.....	163
TABELA 29- Análise dos resultados de anticorpos Avidéz de IgG comparados mês a mês, obtida com o teste de Tukey.....	164
TABELA 30- Análise dos resultados de anticorpos Subclasses de IgG comparados mês a mês, obtida com o teste de Tukey	164
TABELA 31- Resultado do desempenho dos diversos testes pela curva ROC	165
TABELA 32- Resultados da análise discriminante para o modelo que utilizou treze variáveis em todos os tempos (Modelo 1).....	165
TABELA 33- Resultado da análise discriminante com quatro testes: avidéz CF, IgM ELFA, avidéz ELFA e IgG2 CF (Modelo 2)	166
TABELA 34- Resultados da análise discriminante para o modelo que utilizou todas as variáveis para os grupos 1 (agudo), grupo 2 (convalescente precoce) e grupo 3 (convalescente tardio) (Modelo 3)	166
TABELA 35- Resultados da análise discriminante para o modelo que utilizou as variáveis IgM ELISA, ELFA e CF; avidéz ELFA e CF e IgG3 para os grupos 1 (agudo), grupo 2 (conv. precoce) e grupo 3 (conv. tardio) (Modelo 5).....	167

TABELA 36- Resultados da análise discriminante para o modelo que utilizou as variáveis IgM e avidéz ELFA para os três tempos (Modelo 6)	167
TABELA 37- Resultados da análise discriminante para o modelo que utilizou as variáveis IgM e avidéz CF para os três tempos (Modelo 7)	168
TABELA 38- Resultados da análise discriminante para o modelo que utilizou todas as variáveis de CF para IgM, avidéz e IgG3 (Modelo 8)	168
TABELA 39- Resultados da análise discriminante para o modelo que utilizou as variáveis de CF IgM e IgG3 para os três tempos (Modelo 9)	168
TABELA 40- Resultados da análise discriminante para o modelo que utilizou as variáveis de CF IgM e IgG2 para os três tempos (Modelo 10)	169
TABELA 41- Resultados da análise discriminante para o modelo que utilizou as variáveis de CF IgM, avidéz de IgG e IgG2 (Modelo 11)	169
TABELA 42- Desempenho da combinação de dois testes utilizando pontos de corte ajustado para o diagnóstico de infecção aguda pelo <i>T. gondii</i>	170
TABELA 43- Desempenho da combinação de dois testes utilizando pontos de corte recomendados para o diagnóstico de infecção pelo <i>T. gondii</i>	171

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AD-IgG	Aglutinação diferencial de IgG
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
CD4	Cluster of differentiation 4
CÉL. NK	Célula <i>natural killer</i>
CF	Citometria de fluxo
DO	Densidade óptica
DT	<i>Dye-test</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELFA	<i>Enzyme-linked fluorescent assay</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent Assay</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FL1	Fluorescência tipo 1
FL2	Fluorescência tipo 2
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC	Forward Scatter
GRA3	<i>Dense-granule protein 3</i>
HC/HS	Ensaio de aglutinação de IgG, antígeno fixado com acetona e formalina
HUCAM	Hospital Universitário Cassiano Antonio Moraes
IA	Índice avidéz
IE	Índice ELISA
IgA	Imunoglobulina da classe A
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgG1	Imunoglobulina da subclasse G1
IgG2	Imunoglobulina da subclasse G2
IgG3	Imunoglobulina da subclasse G3
IgG4	Imunoglobulina da subclasse G4
IFI	Imunofluorescência Indireta
IgM	Imunoglobulina da classe M
IL-12	Interleucina 12
ISAGA	<i>Immunsorbent Agglutination Assay</i>
INF γ	Interferon gama
LILACS	Literatura latino-americana e do Caribe em Ciências da Saúde
+LR	<i>Positive likelihood ratio</i>
-LR	<i>Negative likelihood ratio</i>
LT	Linfoadenopatia toxoplásmica
MACS	<i>Multicenter AIDS Cohort Study</i>
MI	Mililitros
NDI	Núcleo de Doenças Infecciosas
PBS	Phosphate buffered saline
PCR-RLFP	<i>Polimerase chain reaction - restriction lenght fragment polymorphism</i>
PPFP	Percentual de parasitos fluorescentes positivos
PMS	Fenil-metil-sulfonil-fluoreto
RI	Resposta Imune
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic Curve</i>
ROP1	<i>Roptria</i> proteins
SAPE	Estreptoavidina conjugada com ficoeritrina
SFB	Soro fetal bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
SSC	<i>Side Scatter</i>
STAg	Antígeno solúvel de taquizoítas de <i>T. gondii</i>
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa

UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
UI	Unidades internacionais
U ⁺	Amostras tratadas com uréia
U ⁻	Amostras tratadas sem uréia
VPF	Vacúolo parasitóforo

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	029
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	032
2.1	Histórico da descoberta do agente e da doença.....	033
2.2	Epidemiologia.....	036
2.3	O agente e o ciclo de vida.....	037
2.4	Transmissão.....	045
2.5	Patogênese e imunogenicidade	046
2.6	Aspectos clínicos.....	050
2.6.1	Hospedeiro imunocompetente.....	050
2.6.2	Toxoplasmose ocular	050
2.6.3	Toxoplasmose e Aids.....	051
2.7	Transmissão Vertical e Doença Congênita	052
2.8	Diagnóstico da infecção aguda	054
2.9	As subclasse de IgG nas infecções agudas	063
2.10	Citometria de fluxo na avaliação diagnóstica em doenças Infecciosas.....	064
3	OBJETIVOS	066
3.1	Objetivo geral.....	067
3.2	Objetivos específicos.....	067
4	PACIENTES E MÉTODOS	068
4.1	Características do estudo e Laboratórios Colaboradores.....	069
4.2	Critérios de inclusão	069
4.3	Critérios de exclusão	070
4.4	Pacientes e Amostras Sequenciais de Soro.....	070
4.5	Coleta e armazenamento do soro	072
4.6	Análises sorológicas	072
4.6.1	Imunofluorescência indireta IgG e IgM	075
4.6.2	Deteção IgG, IgM e avides de IgG por ELFA.....	077
4.6.3	ELISA <i>in house</i> para IgG, IgM e IgA.....	078
4.6.4	Estudo de anticorpos anti- <i>T gondii</i> por citometria de fluxo.....	080
4.6.5	Estudo de avides e subclasses de IgG anti- <i>T gondi</i> por citometria de fluxo	081
4.7	Definição do critério padrão-ouro para o diagnóstico de toxoplasmose aguda	082
4.8	Análise Estatística	083
4.8.1	Análise de perdas e possíveis variáveis de confusão.....	085
4.9	Pesquisa e normalização bibliográfica	086
4.10	Considerações éticas.....	086
5	RESULTADOS.....	087
	Descrição e caracterização dos pacientes.....	087
5.1	Correlações dos resultados de IgG, IgM e avides de IgG entre as diferentes técnicas	089
5.2	Dinâmica dos anticorpos IgG, IgM, IgA, avides de IgG e subclasses de IgG no período de doze meses do estudo longitudinal	091
5.2.1	Dinâmica dos anticorpos da classe IgG	092
5.2.2	Dinâmica dos anticorpos da classe IgM.....	093
5.2.3	Dinâmica dos anticorpos da classe IgA	094

5.2.4	Dinâmica da avidéz dos anticorpos IgG anti- <i>T. gondii</i>	095
5.3	Avaliação da técnica de citometria de fluxo no estudo das subclasses de IgG no diagnóstico temporal da infecção pelo <i>T. gondii</i>	096
5.4	Desempenho de cada teste na identificação da infec. Aguda...	097
5.4.1	Análise pela curva ROC.....	097
5.5	Identificação da melhor combinação de testes que discrimina as fases da doença.....	103
5.5.1	Análise de desempenho da combinação de testes	103
5.5.2	Análise discriminante.....	107
6	DISCUSSÃO	110
7	LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	125
8	CONCLUSÕES	128
9	PROPOSIÇÕES.....	131
	REFERÊNCIAS	133
	APÊNDICES	145
	APÊNDICE A- TERMO DE CONSENTIMENTO	146
	APÊNDICE B- FICHA CLÍNICA.....	150
	APÊNDICE C-GRÁFICOS	151
	APÊNDICE D- TABELAS.....	154
	ANEXOS.....	172
	ANEXOS A – Aprovação pelo comitê de ética em pesquisa....	173

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Aproximadamente um terço da população mundial é infectada por *Toxoplasma gondii*, um protozoário intracelular obrigatório que pertence ao filo Apicomplexa, subclasse *Coccidia*. A infecção pode ser adquirida através da ingestão de carne crua ou mal passada contendo cistos tissulares ou alimentos e água contaminados por oocistos. A doença pode ser transmitida ainda por via transplacentária, se a mãe adquire a infecção primária durante a gravidez. Outras formas menos comuns de transmissão são as transfusões de hemoderivados e transplantes de órgãos.

A infecção aguda é oligossintomática em cerca de 80% dos indivíduos. O quadro clínico é inespecífico e o sintoma mais comumente encontrado é a adenomegalia isolada. Podemos encontrar ainda quadros de mal estar acompanhados ou não de febre, cefaléia, mialgia, dor de garganta e sintomas relacionados ao pulmão, fígado, coração, cérebro e olhos. A manifestação clínica é usualmente benigna. Entretanto, em pacientes imunocomprometidos, pode haver recrudescência da infecção, particularmente naqueles com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e indivíduos submetidos ao uso de drogas imunossupressoras.

A toxoplasmose tem importância médica na gravidez devido ao risco de infecção fetal, que aumenta com o avançar da gestação. A gravidade da doença no feto, por outro lado, é inversamente relacionada à idade gestacional. Em geral, a doença congênita é oligossintomática ao nascimento, mas pode evoluir com sequelas tardias, como cegueira, surdez, retardo mental e psicomotor. A doença pode ser devastadora se adquirida no início da gestação, acarretando desde abortos a óbitos fetais, causados principalmente por graves lesões inflamatórias na placenta e no sistema nervoso central (SNC) (Remington *et al.*, 2006).

A ocorrência de toxoplasmose congênita é excepcional quando a mulher adquire a infecção primária antes da gravidez e, nestes casos, geralmente está relacionada à reativação da infecção devido a condições imunossupressoras (Koppe *et al.*, 1986).

Considerando que as infecções agudas em gestantes são em sua maioria assintomáticas, o diagnóstico da primoinfecção é laboratorial, baseado em reações sorológicas. A abordagem diagnóstica laboratorial é realizada através da dosagem quantitativa dos anticorpos das classes IgG e IgM. Um teste IgG positivo estabelece que o indivíduo teve contato prévio com *T. gondii*. A detecção de anticorpos IgM específicos, por outro lado, tem sido o marcador sorológico mais frequentemente utilizado para o diagnóstico da infecção aguda ou recente. Entretanto, o elevado

percentual de resultados IgM falso-positivos e a persistência de IgM por períodos prolongados, algumas vezes por vários anos (Bobic *et al.*, 1991), fundamentam o conceito de que a presença isolada de anticorpos IgM anti- *T. gondii* não confirma o diagnóstico de infecção aguda. Métodos suplementares, como a detecção de anticorpos IgA e IgE específicos, também marcadores de infecção aguda, apresentam limitações relacionadas à sensibilidade e desaparecimento no soro em intervalo de tempo variáveis (4-8 meses). Em cerca de 25% dos indivíduos, a IgA pode persistir por até 12 meses e tanto testes diagnósticos IgA quanto IgE não estão amplamente disponíveis. Atualmente, a avidéz de IgG é o teste auxiliar ou confirmatório mais utilizado em casos IgM positivos, determinando com certo grau de segurança, em casos de alta avidéz, que a primo infecção ocorreu há pelo menos 3-4 meses. Sua maior utilidade é afastar o risco de transmissão fetal nos resultados de alta avidéz obtidos no primeiro trimestre da gestação. O teste de avidéz apresenta duas importantes limitações: o fenômeno de maturação tardia, em que 25% dos casos de infecção com 12 meses de duração mostram IgG de baixa avidéz; e o grande percentual de casos (26,4%) com resultado duvidoso (Liesenfeld *et al.*, 2001).

Deste modo, existe demanda crescente para o desenvolvimento de marcadores diagnósticos mais acurados que permitam distinguir infecção aguda daquela adquirida num passado recente. A utilização de outras técnicas e métodos diagnósticos, como a citometria de fluxo (CF) para quantificação de IgM, IgG, avidéz da IgG e sub-classes de IgG anti- *T. gondii* apresentam grande potencial para dar suporte a esse diagnóstico.

Ao lado da necessidade destes novos conhecimentos, é imprescindível avaliar a dinâmica dos marcadores sorológicos de infecção aguda por *T. gondii* ao longo do tempo, já que o contexto diagnóstico pode sofrer alterações de acordo com os diferentes cenários clínicos, como o diagnóstico de infecção primária em pacientes imunocompetentes ou imunocomprometidos e na gravidez. Estudos longitudinais de casos agudos, que permitam classificar com segurança o tempo de evolução da doença, podem contribuir para avaliar a utilidade desses testes no diagnóstico sorológico da toxoplasmose aguda humana.

REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Histórico da descoberta do agente e da doença

O contexto do descobrimento do agente etiológico da toxoplasmose teve participação importante da microbiologia. As bases desta disciplina como ciência experimental estruturada e especializada foram estabelecidas por estudiosos eminentes como o químico francês Louis Pasteur (1822-1895) e o médico alemão Robert Koch (1834-1910), ajudados que foram pelo advento do microscópio. Antes deles, Antonie van Leeuwenhoek, um comerciante de tecidos holandês, dedicava-se a polir lentes e construir microscópios de alta qualidade, que usava para observar materiais diversos e analisar a qualidade da trama dos tecidos que comercializava. Entre 1673 e 1723 este curioso senhor descreveu e publicou uma série de desenhos, dentre os quais o primeiro de que se tem notícia representando uma bactéria, num importante meio científico da época, o *Philosophical Transactions da Royal Society of London*. Estas bases foram fundamentais para a descoberta dos microrganismos como agentes etiológicos de doenças.

A história da toxoplasmose começou com o descobrimento de seu agente etiológico. *Toxoplasma gondii* foi descoberto em 1908 por dois grupos de pesquisadores independentes, de um lado, Charles Nicolle e Louis Herbert Manceaux, parasitologistas franceses, que trabalhavam no Instituto Pasteur em Túnis na Tunísia e, de outro, Alfonso Splendore, pesquisador italiano residente na cidade de São Paulo, Brasil. A descoberta foi casual. Os franceses pesquisavam leishmaniose e febre tifóide e encontraram um parasita semelhante à leishmania em um roedor norte africano, o gondi (*Ctenodactylus gondi*), tendo sido por isso inicialmente nominado por eles *Leishmania gondi*. Já Splendore encontrou o parasito em coelho de laboratório, que faleceu de paralisia (Cox, 2002).

A denominação *Toxoplasma gondii* foi dada por Nicole e Manceaux em 1909, após diferenciá-lo da *Leishmania* e *Piroplasma* através de critérios morfológicos. Por causa de sua morfologia característica, propuseram o nome *Toxoplasma* (do grego *toxon*, “arco”).

Pouco mais de uma década se passou e vários relatos de casos em humanos foram feitos. Entretanto, não cumpriam os critérios necessários à confirmação do agente etiológico como causador da doença. Para isso, era preciso que: **a**) o patógeno fosse transmitido a várias espécies de animais (camundongo, coelho, cobaio, etc..) ou vários animais de um mesmo lote com prova de não infecção espontânea e que **b**) a doença

se manifestasse dentro de períodos de incubação similares ou, ainda, que **c)** fosse identificado diretamente no tecido suspeito.

Uma das primeiras descrições correlacionando o parasito à doença humana foi feita por um oftalmologista tcheco, Josef Janku, que em 1923 relatou o encontro de cistos do parasito na retina de uma criança de 11 meses (Tenter *et al.*, 2000). Cinco anos depois, em 1928, Levaditi sugere uma possível ligação entre hidrocefalia congênita e toxoplasmose. Foram, entretanto, Arne Wolf e David Cowen que em 1937 reconheceram a associação entre o parasito e a doença congênita, em um caso de encefalite fatal nos Estados Unidos (Remington *et al.*, 2006). Este e outros relatos semelhantes demonstraram que o toxoplasma invade o feto no útero podendo provocar óbito fetal ou neonatal e seqüelas tardias como coriorretinite, calcificação cerebral, microcefalia, macrocefalia além de retardo do desenvolvimento psicomotor.

A doença adquirida no adulto foi descrita apenas em 1940, por Pinkerton & Weinman, num jovem com doença generalizada fatal. No ano seguinte, esses mesmos autores descreveram dois casos também fatais, de doença exantemática febril aguda. Até esta época a doença adquirida era considerada um evento raro (Remington *et al.*, 2006).

Um caso clínico marcou a história da toxoplasmose, descrito em detalhes por Albert Bruce Sabin, em 1941. Foi um caso de encefalite toxoplásmica em uma criança de 6 anos, que morreu em outubro do ano anterior após um período de 30 dias de doença, com quadro de convulsão generalizada, desorientação, febre, pleocitose, sem sinais de irritação meníngea como rigidez de nuca e ou sinal de Kernig e ausência de sinais relativos ao envolvimento de pares cranianos (Sabin, 1941). O isolamento desta cepa de *T. gondii* se deu a partir da inoculação de suspensão fresca de cérebro em algumas espécies animais, mostrando-se patogênica para camundongo, cobaio, coelho, pinto e macaco rhesus. As iniciais do nome desta criança, R.H., até hoje identificam esta cepa, uma das mais utilizadas em testes diagnósticos tanto *in house* quanto em kits comerciais.

Os experimentos relacionados ao diagnóstico sorológico são descritos a partir do final da década de 1930, início da década de 1940, com os testes de fixação de complemento e de neutralização. Em 1948, Albert Sabin e Harry Feldman propuseram um teste que emprega parasitas vivos e azul de metileno, um corante vital, capaz de corar os patógenos na ausência de lise mediada pelo complemento (Sabin & Feldman, 1948). O teste ficou conhecido como Teste do Corante (Dye Test- DT) ou Teste de

Sabin e Feldman, utilizado até hoje como padrão ouro por laboratórios de referência mundo afora (Reiter-Owana *et al.*, 1999).

A partir do descobrimento do diagnóstico sorológico foi possível mostrar a alta prevalência e ampla distribuição da infecção, bem como seu variado espectro clínico, cuja marca predominante é a ausência de sintomas na grande maioria dos casos. Outra constatação feita, a de que animais carnívoros e herbívoros adquiriam a infecção com frequência semelhante (Tenter *et al.*, 2000).

A toxoplasmose congênita, primeira via de transmissão conhecida, foi fartamente descrita. A transmissão através da ingestão de carne contaminada foi documentada em animais. Camundongos sadios adquiriam infecção e morriam após serem alimentados com carne de animais infectados, em experimentos de laboratório (canibalismo). Em seres humanos esta via de infecção foi observada por Desmonts *et al.* (1965), num relato interessante. Crianças internadas em um hospital francês para tuberculosos, cujo costume era alimentar seus pacientes com carne crua ou mal cozida, soroconvertiam a uma taxa de 4,8% ao mês. Um subgrupo de crianças que recebeu duas refeições extras de carneiro mal cozido por semana apresentou taxa de 9%, quase o dobro daquela do “grupo controle”, sugerindo que infecção e soroconversão poderiam ser adquiridas através da ingestão de carne crua ou mal passada.

A transmissão da doença através de transplante de doador infectado foi inicialmente sugerida em 1966 por Reynolds *et al.* (1966). Eles relataram um caso fatal de toxoplasmose generalizada pós transplante renal de uma mãe para o filho, que adoeceu imediatamente após o transplante e morreu no 25º dia de pós-operatório. À necropsia, *T. gondii* foi identificado em vários órgãos e três hipóteses foram levantadas: reagudização da infecção devido à terapia de imunossupressão, descartada por uma sorologia pré-operatória negativa; transmissão através do órgão transplantado e a terceira, de infecção adquirida do ambiente, considerada improvável.

As infecções acidentais em laboratório também foram bem documentadas. Um exemplo é o relato de Ström (1951) com dois casos, ambos mulheres com 22 anos. A primeira, soronegativa, adoeceu 18 dias depois de começar o trabalho no laboratório de toxoplasmose. Na ausência de história de acidente com instrumento perfurocortante, a infecção foi assumida como tendo sido transmitida pela via oral, através de pipetagem acidental. Houve envolvimento difuso, com meningite, miocardite, linfadenopatia e *rash*. Sua recuperação foi completa, porém lenta. No

segundo caso a moça apresentou febre e adenomegalia três dias depois de ter furado o dedo com uma agulha contaminada com *Toxoplasma*. Sua recuperação foi rápida após um quadro de doença branda.

Ainda restava inexplicável a forma como seres humanos vegetarianos e animais herbívoros se infectavam. Em finais da década de 1960, pesquisadores em Glasgow na Escócia, dentre os quais William McPhee Hutchison, resumiram uma série de estudos de seu grupo mostrando a participação de gatos na eliminação fecal de *T. gondii* (Hutchison *et al.*, 1968). Eles isolaram repetidamente o parasito das fezes de gatos que haviam se alimentado de camundongos cronicamente infectados. Observaram que suas fezes diluídas em água e deixadas em temperatura ambiente mantinham a infectividade, ao contrário de outras formas do toxoplasma. Sugeriram que o parasito deveria estar dentro dos ovos fertilizados de um nematóide parasita de gatos, o *Toxocara cati*, da mesma forma como acontece com o flagelado *Histomonas meleagridis* e o nematóide *Heterakis gallinarum* em galinhas. Em 1969, Frenkel consegue, através do uso do processo de filtração, separar os ovos do verme e demonstrar a presença do oocisto nas fezes dos gatos. Finalmente em 1970, Frenkel, Dubey e Miller, em um trabalho clássico, demonstram que gatos excretam oocistos após ingestão de 1) camundongos infectados, 2) trofozoitos ou 3) suspensão infectante de fezes de gatos. Estava elucidado, definitivamente, o complexo ciclo de vida de *T. gondii*, esclarecendo o papel do gato como hospedeiro definitivo (Frenkel *et al.*, 1970).

Com a emergência da AIDS, na década de 1980, *T. gondii* se firma como agente infeccioso oportunista, capaz de provocar doença grave e risco de vida em indivíduos imunocomprometidos.

2.2 Epidemiologia

A toxoplasmose é doença de distribuição mundial, porém a soroprevalência de anticorpos específicos varia consideravelmente conforme a região geográfica e os testes sorológicos empregados para o diagnóstico. Estas diferenças estão ainda associadas ao clima, à dieta e ao contato com gatos de tal forma que a doença é mais encontrada em regiões quentes e secas, com grandes populações de gatos e onde se tem o hábito de comer carnes mal cozidas ou cruas. A soroprevalência também apresenta correlação direta com a idade, indicando que a infecção pode ser adquirida ao longo de toda a vida de um indivíduo (Remington *et al.*, 2006).

Em todos os continentes há grande variação na prevalência da toxoplasmose, desde taxas baixas (5 a 15%) na Suíça (Evengard *et al.*, 2001), Suécia (Jenum *et al.*, 1998), Estados Unidos (Jones *et al.*, 2003; McQuillan *et al.*, 2004) e Taiwan (Hung *et al.*, 2005), e taxas mais elevadas (45 a 55%) em países da região sul da Europa, Índia (Singh *et al.*, 2004), Malásia (Nissapatorn *et al.*, 2003) e Uganda (Lindström *et al.*, 2006). Taxas intermediárias de prevalência (20 a 40%) foram relatadas no Chile (Contreras *et al.*, 1996), Nigéria (Uneke *et al.*, 2005) e Sudão (Elnahas *et al.*, 2003).

No Brasil, os relatos de estudos epidemiológicos são geralmente restritos a certas localidades e subpopulações, onde a prevalência encontrada é elevada, variando entre 40 a 80% dependendo da faixa etária avaliada. Coelho *et al.* (2003) demonstraram 79% de soropositividade através da detecção de anticorpos IgG anti-Toxoplasma em doadores de sangue do sexo masculino na cidade de Recife, Pernambuco. Em inquérito epidemiológico realizado na cidade de Fortaleza, Ceará, Rey & Ramalho (1999) encontraram 22,8% de soropositividade entre pré-escolares (média 3,4 anos de idade), e 58,4% e 71,5% em estudantes e puérperas (média 11,4 e 24 anos) respectivamente. Entre crianças de 1 a 15 anos, moradoras de Jardim São Remo, comunidade de baixo nível sócio-econômico da região oeste da cidade de São Paulo, Francisco *et al.* (2006) encontraram 32,4% de soroprevalência para *T. gondii*, enquanto Lopes *et al.* (2008) identificaram 46,4% de soropositividade (128/276) entre alunos do ensino fundamental em Jataizinho, Paraná. Barros *et al.* (1979) avaliaram 40 estudantes de medicina da Universidade Federal do Espírito Santo entre 19-20 anos, encontrando uma prevalência de 47,5% para *T. gondii*.

Dois estudos em populações indígenas, um em Mato Grosso (Amendoeira *et al.*, 2003) e o outro na região amazônica (Bóia *et al.*, 2008) encontraram 80,4% e 73,5% de indivíduos infectados por *T. gondii*, respectivamente.

Entre gestantes brasileiras, a soroprevalência da infecção por *T. gondii* também é elevada: 74,5% (n= 2126) no Rio Grande do Sul (Spalding *et al.*, 2003), 66,3% (n=190) no Rio Grande do Norte (Barbosa *et al.*, 2009) e 91% (n=32512) no Mato Grosso do Sul (Figueiró-Filho *et al.*, 2007). No único estudo de base populacional realizado em Vitória, Espírito Santo, Areal (2007) encontrou 73,5% de soropositividade para *T. gondii*, dentre 1153 gestantes atendidas nas unidades de saúde do município.

2.3 O agente e o ciclo de vida

Toxoplasma gondii pertence ao Filo Apicomplexa, Classe Sporozoea, Sub-classe Coccidia, Ordem Eucoccidiida, Família Sarcocystidae e Sub-família Toxoplasmatidae. É a única espécie deste gênero. Embora mais de 50 marcadores genéticos distintos estejam atualmente disponíveis para genotipagem de cepas de *T. gondii*, do ponto de vista prático as cepas de *T. gondii* são classificadas em três linhagens clonais principais, tipo I, tipo II e tipo III, existindo ainda cepas atípicas ou exóticas e as recombinantes. Algumas características biológicas e epidemiológicas dos genótipos de *T. gondii* podem ser vistas no Quadro 1.

QUADRO 01- Características biológicas e epidemiológicas dos principais genótipos de *Toxoplasma gondii*

<p>Tipo I</p> <ul style="list-style-type: none"> • Raramente é isolado (responsável por 10% das cepas isoladas na Europa e Estados Unidos, principalmente de origem humana) • Altamente virulenta para humanos e outros mamíferos, letal para todos camundongos inoculados • <i>In vitro</i>: alta taxa de multiplicação, redução da interconversão para o estágio -bradizoít
<p>Tipo II</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mais comumente isolada (humanos, carneiros e outros mamíferos) • (80% das cepas isoladas nos Estados Unidos e outros países) • Não virulenta para humanos, infecção crônica com persistência de cistos • <i>In vitro</i>: taxa de multiplicação lenta, fácil interconversão para o estágio -bradizoíta e
<p>Tipo III, genótipos recombinantes e genótipos não usuais com alelos atípicos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Raramente isolado de cepas provenientes da Europa e Estados Unidos • Mais frequente entre cepas isoladas de animais selvagens, de áreas remotas e humanas não usuais • Geralmente mais virulenta para camundongo que a cepa II

FONTE- Dardé, 2004, pg. 61

Há cerca de uma década iniciaram-se uma série de estudos sobre as características genéticas de cepas de *T. gondii* isolados no Brasil.

Investigando um surto de toxoplasmose ocorrido em Santa Izabel do Ivaí no Paraná, Dubey *et al.* (2004) analisaram material de músculo esquelético, coração e cérebro de 54 gatos, tendo isolado *T. gondii* em 37 deles. A análise genética demonstrou que 15

cepas (40,5%) eram do tipo I e 22 (59,5%) do tipo III. No estado de São Paulo, Pena *et al.* (2006) isolaram o parasito em 47 de 71 gatos soropositivos, dentre 237 felinos investigados. Encontraram 34 gatos (72,4%) com cepa do tipo I, 12 (25,5%) com o tipo III e 1 animal (2,1%) com ambas cepas, I e III.

À medida em que novas técnicas para a classificação genética do parasito foram sendo utilizadas, surgiram diferenças nos resultados encontrados. Estudos recentes utilizando vários marcadores genéticos com a técnica de reação em cadeia de polimerase - *restriction length fragment polymorphism* (PCR-RLFP) demonstraram enorme variabilidade genética em parasitos isolados no Brasil (cepas recombinantes naturais), quando comparados com os isolados na Europa e América do Norte. Na verdade, as cepas clássicas são raramente encontradas no Brasil (Ferreira *et al.*, 2006; Dubey *et al.* 2008; Pena *et al.*, 2008). A propósito destes achados, estudiosos levantam a possibilidade de que esta diversidade genética tenha implicações na virulência do parasito, dado a existência de um maior número de casos de toxoplasmose ocular no Brasil (Glasner *et al.*, 1992) e formas graves da doença em indivíduos imunocompetentes em outros países da América do Sul (Khan *et al.*, 2006, Demar *et al.*, 2007; Dardé, 2008).

Existem três estágios infectantes para o hospedeiro definitivo: taquizoítas, bradizoítas e esporozoítas. Apesar de todos os estágios ocorrerem nos felinos somente dois são descritos no hospedeiro intermediário: o trofozoíta intracelular (taquizoítas) presente na fase aguda da infecção e a forma encistada do parasita (bradizoítas), encontrada nos tecidos na fase latente ou crônica da infecção (Dubey *et al.*, 1998).

Taquizoítas

O termo taquizoíta (do grego tachos: rápido) foi cunhado por Jacob Frenkel em 1973 e refere-se à forma de multiplicação rápida de *T. gondii* que ocorre nas células fagocíticas e não fagocíticas do hospedeiro intermediário e definitivo, mas não nas células do epitélio intestinal dos felinos. Sua multiplicação dá-se por endodiogenia, processo de divisão em que duas células filhas se formam dentro da célula mãe. O taquizoíta tem formato em crescente, medindo aproximadamente 2 a 4 µm de largura por 4 a 8 µm de comprimento com um pólo anterior pontiagudo e um posterior arredondado (FIG. 1). Possui em sua complexa ultra-estrutura várias organelas e corpos de inclusão (película, microtúbulos, anel polar, conóide, roptrias, micronemas,

mitocôndria, retículo endoplasmático liso e rugoso, aparato de Golgi, ribossomos, microporos e núcleo bem definido) (Dubey *et al.*, 1998).

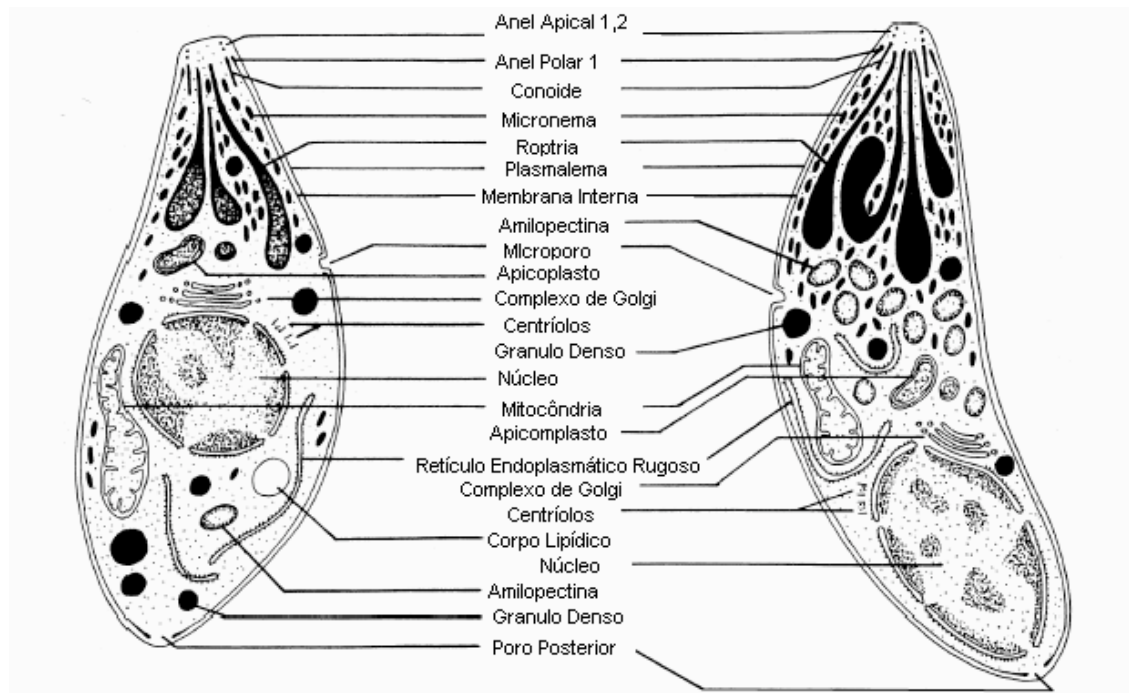


FIGURA 01- Desenho esquemático (micrografia eletrônica) de taquizoíta (esquerda) e bradizoíta (direita).

FONTE: Dubey *et al.*(1998), p. 269

Embora seja uma célula eucariótica, o taquizoíta necessita do ambiente intracelular para sobreviver e se multiplicar, uma vez que ele é susceptível aos produtos intermediários do oxigênio, mudanças de pH, flutuações osmóticas e ação dos anticorpos na presença do complemento. Além do mais, ele depende da síntese de purinas da célula hospedeira para produção do ácido fólico, essencial para o seu metabolismo. A invasão celular é um evento ativo, complexo e ainda não totalmente esclarecido, que requer contato com receptores da superfície da célula hospedeira. A adesão permite a orientação do parasito, de modo que o pólo anterior entre em contato com a membrana da célula hospedeira. Este processo é facilitado pela ação dos microtúbulos que compõem o citoesqueleto e da conóide, situada no pólo anterior do parasito. As roptrias e micronemas também participam do processo de invasão através da secreção de substâncias que alteram a propriedade da membrana celular e auxiliam na formação do vacúolo parasitóforo. Uma vez dentro da célula, o taquizoíta sobrevive graças a mecanismos de evasão da destruição intracelular (inibição da fusão vacúolo/lisossomas e/ou neutralização enzimática) e da sua capacidade de permanecer latente (Dubey *et al.*, 1998).

Do ponto de vista metabólico, *T. gondii* possui as organelas necessárias para a produção de energia, crescimento e multiplicação, síntese protéica e de pirimidinas. Entretanto, ele depende totalmente da célula hospedeira para produção de purinas.

Bradizoítas

O termo bradizoíta (do grego brady: lento), refere-se às formas do protozoário contidas dentro dos cistos. Eles são morfologicamente idênticos ao taquizoítas (FIG. 1). Apesar desta semelhança, multiplicam-se lentamente, expressam moléculas estágio/específicas, têm metabolismo distinto e são a única forma capaz de desencadear a fase sexual do ciclo. Eles podem persistir por toda a vida do hospedeiro, sendo responsáveis pelas recrudescências da doença. Cada cisto pode conter centenas a milhares de bradizoítas (FIG. 2). Os vacúolos que contém o cisto são resistentes à digestão pela pepsina, ácido clorídrico e tripsina, atravessando o ambiente do estômago sem perder a capacidade infectante.

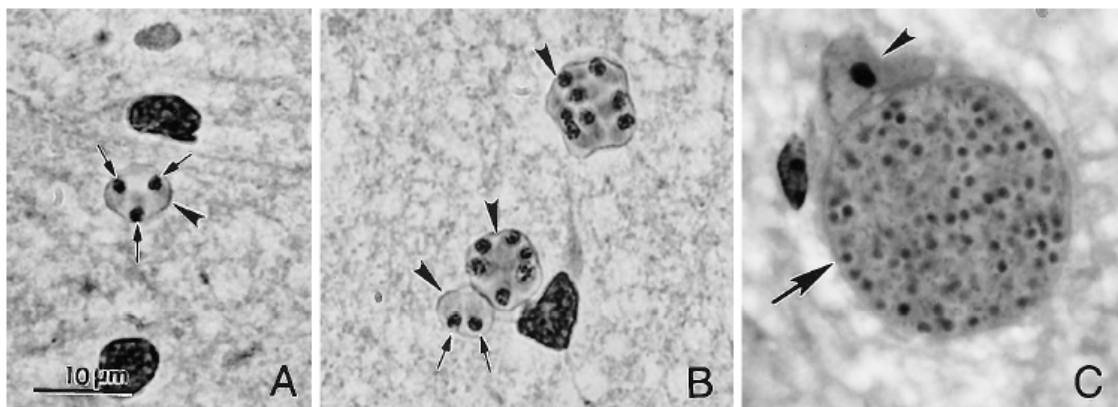


FIGURA. 2 - Cisto tecidual de *T. gondii* em cérebro de camundongo. (A e B) Cistos teciduais com bradizoítas; esfregaço impregnado com prata e corado com Giemsa. (C). Cisto tecidual intracelular corado com hematoxilina e eosina. Na ponta da seta nota-se a fina parede do cisto e cabeça da seta o núcleo da célula hospedeira.

Fonte: Dubey, 1998. p.277

O **ciclo biológico** completo de *T. gondii* só foi totalmente desvendado no final da década de 1960, início da década de 70, com os estudos de Hutchinson *et al.* (1968), Frenkel *et al.* (1970) e Jewell *et al.* (1972), dentre outros. É um ciclo complexo, onde fases reprodutivas sexuadas e assexuadas se alternam, envolvendo dois hospedeiros diferentes. No hospedeiro definitivo, gato doméstico e outros felídeos, desenvolve-se a

fase sexuada, enquanto nos hospedeiros intermediários, virtualmente todos os animais de sangue quente, mamíferos e aves, ocorre a fase assexuada do ciclo (FIG. 3).

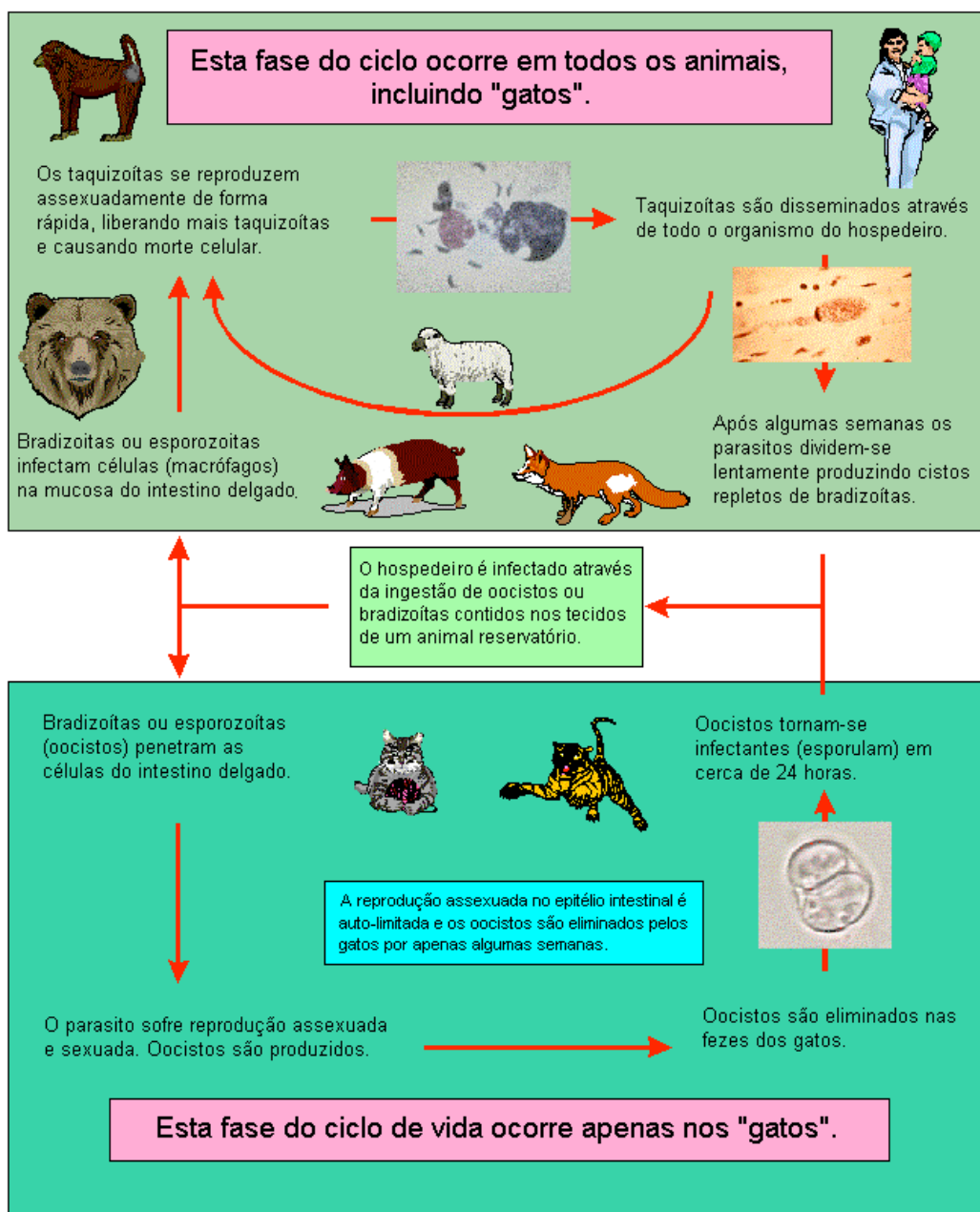


FIGURA 3. Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*
 FONTE: web.uconn.edu/T.gondii/lifecycle.gif

O ciclo sexuada no hospedeiro definitivo

Os únicos hospedeiros a apresentarem tanto o ciclo sexuada quanto assexuada do parasita são os felídeos, hospedeiros definitivos de *T. gondii*.

O ciclo sexuado, exclusivo dos hospedeiros definitivos, tem início a partir da ingestão de um animal infectado (carnivorismo). Embora o gato possa se infectar também através da ingestão de oocistos e taquizoítas, na maior parte das infecções felinas a transmissão se dá através da ingestão de cistos teciduais contendo bradizoítas. Esta forma do parasito é resistente à passagem pelo estômago.

Após invadir a célula intestinal destes hospedeiros, o bradizoíta inicia o desenvolvimento de uma série de gerações de *T. gondii* antes que a produção dos gametas (gamogonia) se inicie. São cinco estágios morfologicamente distintos (A a E), dos quais pouco se conhece (Dubey & Frenkel, 1972). Dentro do enterócito eles se multiplicam por uma forma especial de esquizogonia, cuja característica clássica é a divisão do núcleo cerca de duas a três vezes sem que ocorra simultaneamente a divisão do citoplasma, formando o esquizonte. A célula filha que se forma após a divisão do esquizonte chama-se merozoíta. A origem do ciclo sexuado não é bem conhecida. Acredita-se que os merozoítas liberados dos esquizontes D e E iniciem a formação dos gametas masculino (microgameta) e feminino (macrogameta). Nesta fase sexuada do ciclo, o zigoto é formado após a invasão do macrogameta pelo microgameta.

A fertilização inicia o processo de formação da parede do oocisto. O oocisto é eliminado no lúmen intestinal após ruptura do enterócito e conseqüente excreção nas fezes. Eles apresentam forma arredondada, medem 10 x 12 µm e são eliminados de forma imatura aos milhares nas fezes de gatos jovens não imunes, durante uma a três semanas, no período agudo da infecção. Uma vez infectados, os gatos raramente se reinfectam eliminando oocistos novamente. Os oocistos recém-eliminados sofrem um processo de “maturação” no solo, a esporulação, que ocorre em 1-5 dias, dependendo das condições de umidade, temperatura e aeração do solo. Este fenômeno compreende a continuidade de multiplicação do parasito. Cada oocisto contem dois esporocistos e cada esporocisto quatro esporozoítas. Estruturalmente, os esporozoítas são similares aos taquizoítas.

A partir daí estas formas são infectantes tanto para os hospedeiros intermediários quanto para os definitivos e são a única fonte de infecção de animais não carnívoros. Os esporocistos podem se manter viáveis por meses mesmo em climas frios e secos e por mais de 1 ano em solo úmido (Dubey *et al.*, 1998).

O ciclo assexuado no hospedeiro definitivo e intermediário

A fase assexuada do ciclo ocorre em ambos tipos de hospedeiros e se inicia com a ingestão de cistos presentes na carne crua ou mal cozida ou de água e alimentos contaminados com oocistos. Após a ingestão, a parede externa de cistos e oocistos é rompida por degradação enzimática e as formas infectantes (bradizoíta e esporozoíta, respectivamente) são liberadas no lume intestinal. Estas penetram na lâmina própria abaixo do epitélio, multiplicando-se como taquizoíta. Ao longo de alguns dias os taquizoítas se disseminam pelo corpo através do sangue e vasos linfáticos, preferencialmente no interior de macrófagos e linfócitos, bem como livres no plasma, para então alojarem-se nos tecidos, em forma de cistos. No hospedeiro definitivo, paralelamente, o ciclo sexuado transcorre no interior da célula do epitélio intestinal. Duas diferenças se apresentam no ciclo assexuado dos felídeos em comparação ao ciclo dos hospedeiros intermediários: a) taquizoítas não são encontrados em enterócitos de felídeos, b) as formas encontradas no enterócito dos felídeos não são infectantes para camundongos, o que sugere que esta forma de *T. gondii* não dá origem a taquizoítas. Os taquizoítas se dividem assexuadamente por endodiogenia, processo em que duas células-filhas se formam no interior da célula-mãe, que se rompe liberando a progênie. A propagação dos taquizoítas ocorre pelo rompimento de células infectadas e invasão de células adjacentes e do sangue (provavelmente dentro de células). Como *T. gondii* pode invadir virtualmente todas as células e tecidos do organismo, sua disseminação se estende por todo o corpo do hospedeiro (Wong & Remington, 1994). Esse período inicial da infecção caracteriza a fase aguda da doença.

A transmissão de *T. gondii* é perpetuada a partir de três reservatórios, os gatos, o solo e os hospedeiros intermediários. Os oocistos vindos dos gatos garantem o reservatório do solo, onde se infectam os pequenos animais que vivem ou se alimentam no chão. Eles constituem os hospedeiros intermediários do ciclo natural. Os oocistos também contaminam a água, que é fonte importante de transmissão humana da doença. O ciclo de vida se completa com a predação dos pequenos hospedeiros secundários por parte dos hospedeiros definitivos (carnivorismo). Mamíferos herbívoros, como caprinos e porcos, por sua vez, são importantes hospedeiros intermediários para infecção em humanos.

2.4 Transmissão

A infecção humana pode ocorrer através de quatro formas (FIG. 4):

a) Ingestão de cistos presentes em carne crua ou mal cozida, especialmente de porco e carneiro. Este hábito alimentar é o principal responsável pela transmissão da infecção em países desenvolvidos, como a França (Baril *et al.*, 1999; Rai *et al.*, 1999). Vários relatos de literatura apontam surtos bem documentados onde em geral a fonte de contaminação é carne crua ou mal passada contendo cistos de *T. gondii* (Masur *et al.*, 1978; Choi *et al.*, 1997). O conteúdo dos cistos permanece viável mesmo após ter passado pelo estômago e intestino, porém é destruído pelo congelamento (-12°C) e descongelamento, aquecimento após 66° C e dessecação. Entretanto, pode permanecer viável por até 2 meses a 4°C no refrigerador. O processo de defumação de carnes não garante a destruição de cistos porventura presentes.

b) Ingestão de oocistos contidos nas fezes de gatos, que contaminam água, solo, jardins, caixas de areia, lixo, e podem ser encontrados em vegetais mal lavados ou mesmo serem disseminados através de hospedeiros transportadores tais como baratas, moscas e minhocas (Ruiz & Frenkel, 1980). Existem relatos de surtos atingindo grande número de pessoas, comprometendo bairros, inclusive no Brasil. Nestes a fonte comum foi a água contaminada com oocistos (de Moura *et al.*, 2006; Bowie *et al.*, 1997). A ingestão de oocistos parece ser a forma de transmissão mais importante nos países subdesenvolvidos.

c) transmissão vertical, tratada em tópico à frente;

d) formas menos comuns de transmissão são conhecidas. Transfusão de sangue de doador infectado é descrita, já que *T. gondii* pode sobreviver em sangue citratado estocado a 4°C por até 50 dias (Raisanen, 1978). Outra forma menos frequente de transmissão da toxoplasmose é através de transplante de órgãos de doadores infectados contendo cistos para receptores não imunes, principalmente transplante de coração (Gallino *et al.*, 1996).

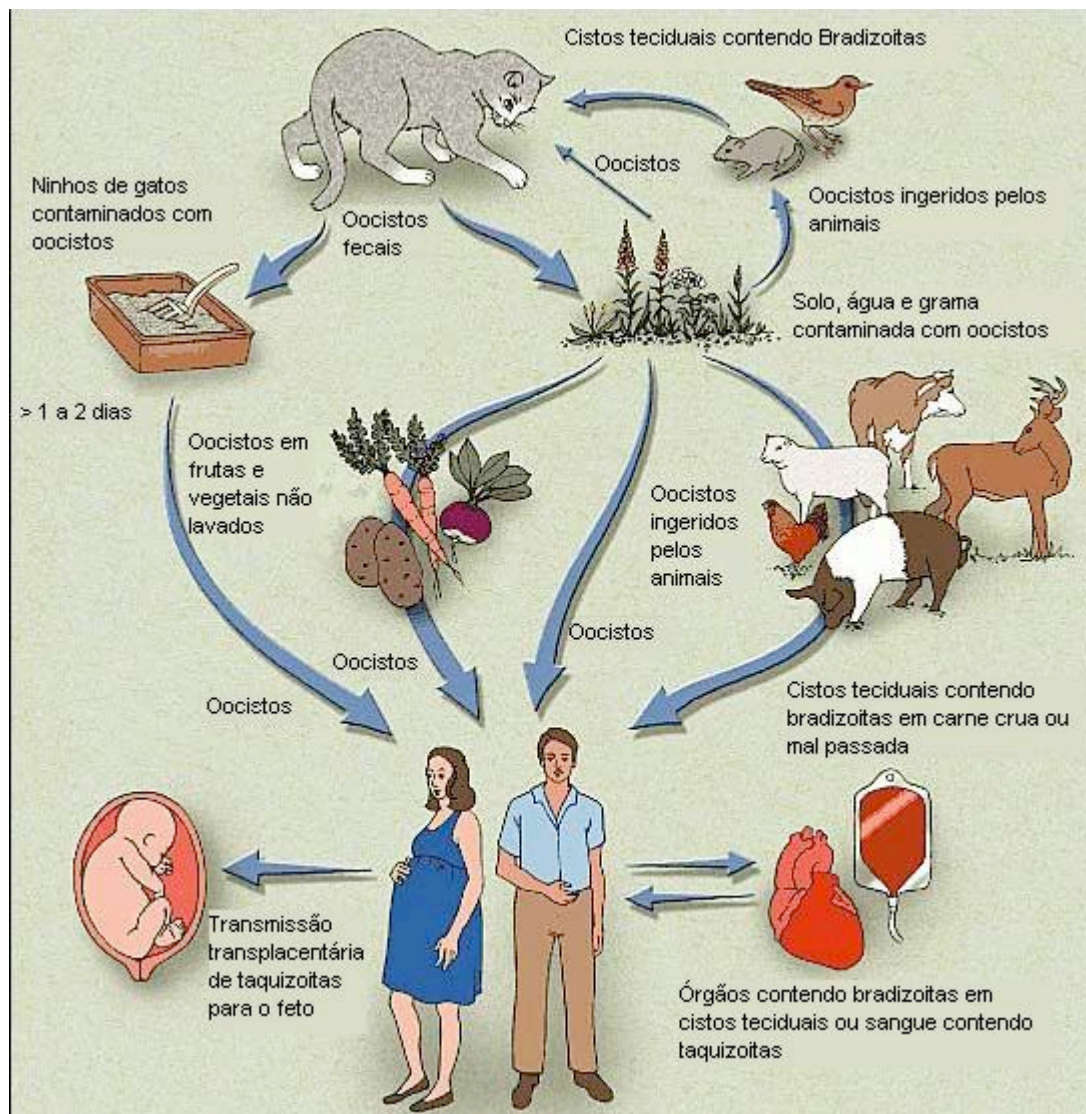


FIGURA 4. Transmissão da toxoplasmose
 FONTE- Lynfield&Guerina, 1997, p.76.

2.5 Patogênese e imunogenicidade.

Característica importante relacionada à sobrevivência de *T. gondii* é a capacidade de persistir no organismo do hospedeiro intermediário por toda a vida, a despeito da infecção desencadear uma vigorosa resposta imune humoral e principalmente celular.

Normalmente, através de fagocitose ou penetração ativa, os parasitos são capturados em vacúolos intracelulares que se fundem com lisossomas, organelas ricas em enzimas hidrolíticas e outras proteínas e peptídeos microbicidas. Eventos bioquímicos e físico-químicos como a acidificação do meio e formação de metabólitos tóxicos do oxigênio e nitrogênio são mecanismos adicionais que células invadidas utilizam como estratégia para eliminarem os microorganismos invasores.

Para escapar do sistema imune, *T. gondii* dispõe de algumas estratégias para evitar ou atuar frente aos mecanismos antiparasitários do hospedeiro. Indiretamente através da alteração da expressão e secreção de citocinas imunomodulatórias e por mecanismos diretos, estabelecendo uma forma especial de vida dentro da célula hospedeira e interferindo na cascata intracelular de sinalização. Desta maneira dribla os mecanismos de defesa do hospedeiro quanto à erradicação da infecção (Lang *et al.*, 2007). *T.gondii* mantém assim um equilíbrio delicado entre supressão e indução da resposta imune, de modo a garantir a sobrevivência do hospedeiro e a sua transmissão ao hospedeiro definitivo.

Após a ingestão, o parasito atinge o intestino e a partir daí os taquizoítas se disseminam pela via linfática para os linfonodos regionais e via hematogênica para fígado, pulmões e o restante do corpo. Invadem as células nucleadas de praticamente todos os órgãos através de um mecanismo ativo e se estabelecem em vacúolos parasitóforos. Ali se multiplicam por divisão binária a cada 5 a 12 horas, formando um pseudocisto intracelular. Dezesesseis a 32 organismos são suficientes para provocar a distorção e ruptura celular, dando lugar a novas invasões em células adjacentes. Estes fenômenos são responsáveis pelos sintomas encontrados na fase aguda da infecção.

A imunidade que se desenvolve a partir daí é predominantemente mediada por células. A produção de interferon gama (INF γ) dependente de IL-12 é vital na resistência ao parasito. Células dendríticas, neutrófilos e macrófagos são fontes importantes de IL-12 durante a infecção. Macrófagos, linfócitos T, células NK e citocinas associadas são os elementos imunológicos mais importantes envolvidos na resposta imune. A invasão de *T. gondii* dispara tanto a resposta inata quanto o sistema imune adaptativo, o qual conduz à resistência e à proteção prolongada à infecção. O linfócito B, além de participar da produção de anticorpos e apresentação de antígeno, parece estar envolvido também na resposta de citocinas. Após a montagem da resposta imune humoral, os taquizoítas extracelulares são eliminados através da ação de anticorpos específicos e complemento.

Os parasitos intracelulares (bradizoítas), por outro lado, persistem no hospedeiro na forma de cistos, onde se multiplicam lentamente, provocando pouca repercussão clínica em indivíduos imunocompetentes. Eles sobrevivem graças ao fato de estarem no vacúolo parasitóforo (VPF), protegidos contra a fusão com lisossomas devido à composição de sua membrana. Constituída do próprio hospedeiro, a parede do VPF se modifica dinamicamente após a internalização do parasito.

Um dos tecidos mais estudados quanto ao parasitismo persistente causado por *T. gondii* é o sistema nervoso central. A interação deste parasito com as células do SNC é motivo de várias pesquisas, uma vez que este órgão é particularmente afetado tanto na fase aguda quanto crônica da infecção, na doença congênita e na reativação em pacientes imunodeprimidos. Embora assintomática na maior parte dos indivíduos imunocompetentes, a presença de cistos contendo parasitos no cérebro tem provocado dúvidas acerca da sua inocuidade, já que conhecimentos recentes dão conta da habilidade do parasito em controlar a célula parasitada e seu ambiente para assegurar sua sobrevivência. A hipótese de que a infecção por *T. gondii* poderia predispor o indivíduo a problemas neurológicos, como por exemplo a esquizofrenia (Toorey & Yolken, 2003), epilepsia criptogênica e distúrbios de comportamento, foi levantada há mais de 50 anos.

Para que o parasito se mantenha encistado, uma vigilância imunológica constante é necessária para coibir o ressurgimento dos taquizoítas e o conseqüente dano provocado por eles.

Duas hipóteses têm sido aventadas no controle da replicação do parasito durante a fase crônica da infecção. De acordo com a primeira, a resposta imune ativa do hospedeiro induziria a transformação dos taquizoítas em bradizoítas, enquanto a segunda hipótese sugere que o sistema imune controla a multiplicação dos taquizoítas, com pouco efeito sobre os bradizoítas. Os taquizoítas seriam continuamente liberados dos cistos e provocariam um constante *booster* no sistema imune. De fato, experimentos em animais demonstram que o tratamento com anticorpos neutralizadores anti INF- γ e anti fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) provocam um aumento nos taquizoítas livres e maior formação de cistos (Denkers & Gazzinelli, 1998).

A indução da resposta imune mediada por célula T e a resistência ao estágio de taquizoíta são pontos-chave para a sobrevivência do hospedeiro intermediário e conseqüentemente do parasito.

Embora os pesquisadores tenham focado suas atenções em aspectos específicos do parasito (genótipo, processo de invasão, etc) ou na resposta imune do hospedeiro à infecção, admite-se que o desfecho da infecção dependa verdadeiramente da interação entre a virulência intrínseca da cepa, a resposta imune do hospedeiro e sua susceptibilidade específica à infecção, conforme pode ser visto na FIG. 5 (Maubon *et al.*, 2008).

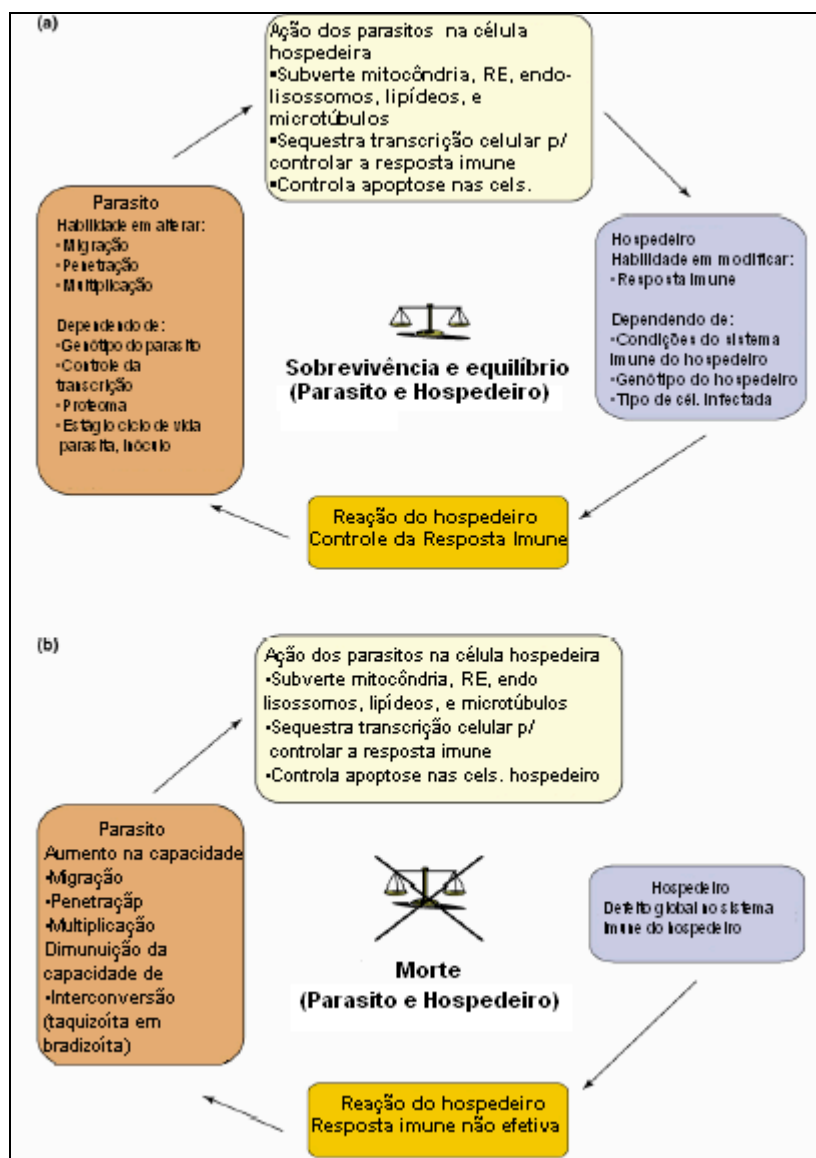


FIGURA 5.- Relação entre parasita e hospedeiro. (a) Equilíbrio entre parasita e hospedeiro. O desfecho depende de capacidades do parasito (genótipo, controle da transcrição, proteoma, estágio do ciclo de vida do parasito e tamanho do inóculo) O hospedeiro tem diferentes capacidades em relação à resposta imune (status do sistema imunológico, genótipo e via de infecção). À época da infecção, o parasito estabelece diferentes estratégias para o controle da resposta inflamatória, que permite a multiplicação do parasito e a continuação do ciclo de vida (formação dos cistos). Nesta ocasião, a infecção é geralmente assintomática. (b) Resposta imune não controlada e em desequilíbrio. Neste exemplo de sistema imune deficiente, a falta da resposta imune adaptativa leva a proliferação descontrolada de taquizoítas e disseminação no hospedeiro. A consequência é a morte de hospedeiro e parasito.
FONTE:Maubon *et al.*, 2008, pg. 300

2.6 Aspectos clínicos

2.6.1 Hospedeiro imunocompetente

A toxoplasmose aguda no hospedeiro imunocompetente é uma doença auto-limitada de aproximadamente 4 semanas que ocorre em somente 10-15% dos indivíduos infectados com cistos ou oocistos do parasito. Mais raramente a sintomatologia pode perdurar por meses (O'Connell *et al.*, 1993). Portanto, a toxoplasmose é assintomática ou oligossintomática na grande maioria dos casos.

O período de incubação da doença pode variar de uma a três semanas. A manifestação clínica mais freqüente é a adenopatia suboccipital e cervical que caracteriza-se por ser indolor, não supurativa, bilateral e simétrica com gânglios medindo menos de três centímetros. Entretanto, pode ocorrer poliadenomegalia em 20% a 30% dos casos (Montoya *et al.* 2004).

Sintomas como febre, calafrios e sudorese costumam ser de pouca intensidade quando presentes, podendo ocorrer também cefaléia, mialgias, faringite, rash maculopapular difuso não pruriginoso e hepatoesplenomegalia. Em casos graves, porém raros, podem ocorrer polimiosite, miocardite, pericardite, pneumonite, síndrome do desconforto respiratório agudo, hepatite e encefalite e até óbito.

É provável que a estrutura genética do parasita esteja relacionada ao quadro clínico da toxoplasmose como os casos descritos recentemente em regiões da América do Sul (Ajzenberg *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2006; Demar *et al.*, 2007).

2.6.2 Toxoplasmose ocular

A toxoplasmose é a principal causa de coriorretinite em indivíduos imunocompetentes, sendo responsável por 20-60% dos casos de uveíte posterior. A maioria dos casos decorre da infecção congênita, mas estima-se que até 30% sejam secundários às infecções adquiridas na vida pós-natal (Cook *et al.*, 2000; Gilbert & Standford, 2000). Episódios de retinocoroidite aguda podem ser assintomáticos dependendo da região da retina acometida, mas em geral causam turvação súbita da visão, perda da acuidade visual, dor, fotofobia ou uma combinação destes. Na infecção aguda adquirida, a lesão típica é a retinite com pouca atividade inflamatória, sem evidência de cicatriz corioretiniana prévia (FIG. 6). As lesões são auto-limitadas e evoluem para cura espontânea formando cicatrizes pigmentadas na retina onde cistos do parasito

podem ser encontrados. As lesões são geralmente unilaterais e a reativação a partir de lesões cicatrizadas, raras na infância, ocorrem em média entre os 20-25 anos de idade (Friedmann & Knox, 1969). Nestes casos, uma lesão esbranquiçada surge na borda da lesão cicatrizada, geralmente com intensa reação inflamatória. Não há consenso sobre a influência do tratamento em relação ao prognóstico e risco de futuras reativações da toxoplasmose ocular (Gilbert *et al.*, 2002).



FIGURA 6 Fotografia do fundo de olho de paciente com toxoplasmose aguda com doença ocular na primeira consulta (1) e dois meses depois do tratamento (2).
FONTE: Burnett *et al.*, 1998, pg. 1035

2.6.3 Toxoplasmose e AIDS

A toxoplasmose é a infecção oportunista mais freqüente em pacientes com AIDS. Em geral é secundária à reativação de cistos teciduais latentes e raramente associada à doença aguda disseminada ou cerebral. A soroprevalência de toxoplasmose em pacientes com HIV se assemelha àquela da população em geral.

A reativação da infecção com manifestação clínica de doença geralmente ocorre quando os linfócitos T CD4 caem para níveis inferiores a 50-100 células / μ L. Quando a contagem de CD4 é superior a 200 células/ μ l, a reativação da toxoplasmose é rara (Luft *et al.*, 1983).

O sistema nervoso central é o sítio mais comumente envolvido (90%) em casos de reativação. O quadro clínico de encefalite focal cursa com cefaléia, confusão mental e febre, déficits focais ou convulsão. O exame físico pode demonstrar anormalidades neurológicas focais e na ausência de tratamento a doença pode progredir, evoluindo com convulsão, estupor e coma. O aparecimento de embotamento pode ser devido à encefalite, porém alterações importantes no nível de consciência, principalmente se acompanhadas de náuseas e vômitos, são sugestivos de hipertensão intracraniana.

Tomografia craniana ou ressonância magnética do cérebro em casos típicos mostram lesões múltiplas hipercaptantes, geralmente associadas à edema, enquanto as lesões isoladas são menos encontradas.

A introdução da profilaxia anti-toxoplásmica e a terapia anti-retroviral combinada produziram um impacto positivo na diminuição da incidência de toxoplasmose cerebral de 5,4 para 2,2/1000 pessoas/ano no período de 1990-1992 comparado ao período de 1996-1998 (Sacktor *et al.*, 2001), conforme mostrado pelo Multicenter AIDS Cohort Study (MACS). Pacientes infectados por *T. gondii* com CD4 abaixo de 100 células/ μ L devem, portanto, receber profilaxia secundária com sulfametoxazol-trimetoprin (Kaplan *et al.*, 2009).

2.7. Transmissão Vertical e Doença Congênita

A transmissão vertical da toxoplasmose se dá pela via transplacentária. A excelente correlação entre o isolamento do parasito de tecido placentário e infecção no concepto em seres humanos sugere que a infecção da placenta é condição obrigatória para a ocorrência da transmissão congênita. *Toxoplasma gondii* atinge a placenta durante a parasitemia materna, invade e se multiplica em suas células, eventualmente atingindo a circulação fetal (Remington *et al.*, 2006), o que aponta para a existência de um intervalo de tempo mínimo entre a infecção materna e a infecção fetal. O intervalo de tempo entre a infecção e o início da parasitemia é desconhecido, mas parece ocorrer antes dos sintomas (se houver) e do aparecimento dos anticorpos no soro (Marx-Chemla *et al.*, 1990).

Dois possíveis mecanismos de transmissão de *T. gondii* da mãe para o feto foram propostos (Gilbert *et al.*, 2001): **a)** a transmissão ocorreria logo após a soroconversão e antes do desenvolvimento da resposta imune celular e humoral, sendo mais provável quanto mais avançado o desenvolvimento do fluxo sanguíneo placentário e **b)** a transmissão poderia ocorrer a partir de focos inflamatórios provocados pelo parasito na placenta, a partir dos quais taquizoítas seriam liberados na circulação fetal em qualquer momento da gestação.

As gestantes de risco para transmissão da toxoplasmose aos seus conceptos são aquelas sem imunidade prévia e que se infectam durante a gestação. Avaliando aspectos da transmissão materno-fetal, Desmonds & Couvreur (1974) concluíram que o parasita poderia ser facilmente isolado da placenta em casos adquiridos durante a

gravidez, porém raramente quando a doença ocorria antes da concepção. A possibilidade da infecção crônica produzir parasitemia existe, porém sua frequência não é elevada. Diferenças genéticas relativas às cepas levantam a possibilidade de que a transmissão congênita possa ocorrer em casos de reinfecção. Elbez-Rubinstein *et al* (2009) apresentaram um caso de toxoplasmose congênita disseminada em um recém-nascido de mãe imune que provavelmente se reinfetou durante a gestação, a partir da ingestão de carne crua de cavalo (importada). A cepa altamente virulenta, isolada do sangue periférico do bebê, revelou um genótipo atípico incomum na França, assemelhando-se àqueles descritos para cepas de *T. gondii* encontradas na América do Sul. A hipótese foi testada e confirmada em modelo animal.

O risco de transmissão e a gravidade da doença congênita guardam uma relação temporal com a idade gestacional em que a toxoplasmose foi adquirida. Enquanto a frequência de transmissão vertical aumenta com a idade gestacional, sinais clínicos graves são comumente observados em conceptos de mulheres que adquiriram a infecção mais precocemente na gestação (Dunn *et al*, 1999). Outros elementos podem ter impacto no risco de transmissão e gravidade da doença fetal, como por exemplo a instituição da triagem universal, o acompanhamento sorológico de gestantes soro negativas e o tratamento da gestante.

Embora não existam ensaios clínicos controlados sobre os efeitos do tratamento da toxoplasmose na gravidez, tanto no que diz respeito à prevenção da transmissão quanto à gravidade da doença congênita (Peyron *et al.*, 2000), estudos retrospectivos sugerem haver diminuição nas taxas de transmissão (Gilbert *et al.*, 2001) e gravidade da doença em fetos infectados, quando o tratamento materno é instituído precocemente após o diagnóstico de soroconversão.

A suspeita ou confirmação de soroconversão na gravidez demanda uma série de medidas, dentre elas a) o tratamento materno, b) a investigação fetal e o c) o seguimento ultrassonográfico fetal frequente. Em alguns países o abortamento terapêutico é permitido. Por este motivo, é importante poder contar com testes sorológicos confiáveis e de fácil acesso, que ajudem a definir com segurança se a infecção materna ocorreu antes ou durante a gravidez, evitando-se assim os riscos, custos e sofrimentos desnecessários gerados por exames laboratoriais de baixa confiabilidade.

O quadro clínico da toxoplasmose congênita é bastante variável. A tríade clássica relatada no início do descobrimento da doença, com coriorretinite, hidrocefalia e

calcificações intracranianas, reflete os casos clínicos mais graves e menos frequentes. Quatro formas de apresentação clínica de toxoplasmose congênita são descritos por Remington *et al.* (2006): a) doença neonatal, com presença de sinais e sintomas sistêmicos presentes ao nascimento, b) doença manifesta nos primeiros meses de vida, com doença leve ou severa com aparecimento entre semanas ou meses de vida (muitas vezes a doença pode ter passado despercebida logo após o nascimento), c) sequela ou recrudescência de infecção prévia não diagnosticada anteriormente na infância ou adolescência e d) infecção subclínica.

Vários estudos mostram que a maioria dos casos de toxoplasmose congênita apresenta-se de forma subclínica (Sáfadi *et al.*, 2003; Guerina *et al.*, 1994) e que a triagem laboratorial (de gestantes e/ou recém-nascidos) é a única forma de se ampliar o diagnóstico precoce da toxoplasmose (Remington *et al.*, 2006).

2.8 Diagnóstico da infecção aguda

A toxoplasmose aguda em indivíduos imunocompetentes pode ser diagnosticada através de métodos diretos, na prática pouco usados (exame microscópico, isolamento do parasito, histologia e detecção do DNA de *T. gondii*) e métodos sorológicos indiretos, que demonstram a presença de anticorpos específicos no soro (IgG, IgM, IgA e IgE). A sorologia é o método de escolha para o diagnóstico de infecção aguda, por oferecer as vantagens de um exame não invasivo, de realização rápida, capaz ainda de diferenciar entre o quadro agudo e crônico da infecção.

A necessidade de diagnosticar infecção aguda se dá principalmente em duas situações clínicas: a) quando o paciente é sintomático e há necessidade de confirmação diagnóstica, como é o caso da doença ocular, das linfadenopatias e de condições sistêmicas graves onde a toxoplasmose é levantada como possível causa (diagnóstico diferencial) e b) em gestantes, nas quais em geral a sorologia será a única fonte de informação a ser analisada para a tomada de decisões.

Na assistência pré-natal, a avaliação sorológica pode ser feita de forma sistemática ou aleatória. Em países desenvolvidos da Europa com alta prevalência da infecção, como França e Áustria, as gestantes seguem um protocolo de triagem universal no início da gestação, sendo as soronegativas reavaliadas a cada mês ou trimestre, o que facilita o diagnóstico de soroconversão. Países onde a soroprevalência é baixa, como os Estados Unidos e países do norte europeu, não recomendam a triagem universal,

justificando a medida pelo alto custo do seguimento sorológico das soronegativas e pequeno benefício devido ao baixo risco de soroconversão na gravidez. Nestes países, é comum a realização de uma avaliação sorológica em algum momento da gravidez, o que dificulta a tomada de decisões em casos diagnósticos duvidosos.

O Brasil, até o momento, não dispõe de uma política nacional unificada de triagem para toxoplasmose em gestantes ou recém-nascidos. Existem programas de abrangência estadual, como o do Mato Grosso do Sul e Minas Gerais, e de algumas cidades isoladas.

A utilização de testes sorológicos para o diagnóstico de toxoplasmose depende do controle de qualidade de kits comerciais, da segurança dos laboratórios que executam estes testes e da acurácia e habilidade dos profissionais a cargo de interpretarem os resultados de acordo com a circunstância clínica especificada (Remington *et al*, 2006). Existem vários métodos sorológicos diagnósticos e cada um deles tem uma aplicabilidade diferenciada quanto ao tipo de anticorpo que detecta. Para avaliação de IgG, IgM, IgA e IgE os mais utilizados são ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), ISAGA (*Immunosorbent Agglutination Assay*) e imunofluorescência indireta (IFI). O teste de Sabin&Feldman se destina a avaliar principalmente a IgG, embora detecte também IgM e IgA. Existem ainda dois testes que avaliam características qualitativas da IgG, que são o teste de avidéz e aglutinação diferencial, utilizados como ferramenta adicional para inferir o tempo decorrido do início da infecção.

O primeiro teste específico utilizado na detecção de anticorpos anti-*T. gondii* foi o teste do corante (*dye test*) ou reação de Sabin&Feldman, descrito por Albert Bruce Sabin e Harry Arthur Feldman em 1948. Trata-se de um teste de neutralização em que organismos vivos são lisados na presença do complemento e anticorpos (Sabin & Feldman, 1948). O teste mede a presença de anticorpos específicos totais, incluindo IgA e IgM, além da IgG. Ainda é o padrão ouro para diagnóstico de infecção toxoplásmica, contra o qual todos os outros testes deveriam ser comparados (Reiter-Owona *et al.*, 1999; Pertersen *et al.*, 2005). O soro a ser testado é diluído de forma seriada e incubado com taquizoítos vivos na presença de complemento (soro humano de doador soronegativo). O azul de metileno (corante vital) utilizado na reação é captado se o parasita estiver vivo, corando-o. O título (*end-point*) é estabelecido pela contagem do número de parasitas mortos (não corados) e vivos (corados) e o resultado reportado é a diluição na qual 50% ou mais dos parasitos estão lisados. Apresenta execução trabalhosa. Taquizoítas vivos são infectantes e demandam a existência de biotério. A leitura em microscópio é subjetiva e requer recursos humanos

treinados. Sua padronização é difícil e o teste está disponível apenas em laboratórios de referência. Tem sido tradicionalmente utilizado para estimar o tempo de infecção, uma vez que aumenta por aproximadamente 8 semanas após o início da mesma. Uma mudança “significativa” dos títulos (pelo menos de quatro vezes) em amostras pareadas coletadas com intervalo de 3 semanas auxilia no diagnóstico de infecção recente.

Por ser mais prática, a IFI substituiu a reação de Sabin-Feldman, permitindo a identificação de anticorpos IgG, IgM e demais classes de imunoglobulinas, em soros incubados sobre taquizoítas fixados em lâminas de microscopia. O parasita utilizado nesta reação é mantido íntegro, inativado pela fixação feita com formaldeído. Se o soro do paciente contém anticorpos específicos, estes serão identificados a partir da reação do antissoro contra imunoglobulina ligado à fluoresceína. O soro do paciente é incubado em diluições seriadas, os resultados expressos pela maior diluição reagente (título) ou, no teste IFI-IgG, de preferência em Unidades Internacionais (UI/ml). Uma reação positiva é detectada pela fluorescência verde-amarela brilhante na periferia total do parasito ao microscópio. Existe uma relação direta entre as diluições e as unidades internacionais e um fator de conversão a ser trabalhado pelos laboratórios, dependente das características do equipamento de microscopia e dos reagentes utilizados. A Organização Mundial de Saúde padronizou soro de referência, para anticorpos IgG anti-*T. gondii*, indispensável para corrigir diferenças entre resultados do teste de imunofluorescência, frequentemente observados em laboratórios. Os testes IgM não são padronizados e podem apresentar resultados falso-positivo na presença de anticorpos antinucleares ou fator reumatóide (IgM anti-IgG). Resultados falso-negativos podem ocorrer devido ao bloqueio por anticorpos IgG específicos. O teste de IFI é mais seguro e econômico quando comparado ao DT, fornecendo resultados comparáveis. Entretanto, sua interpretação também é subjetiva e demorada.

Atualmente, as técnicas imunoenzimáticas para detecção de anticorpos são utilizadas na maioria dos laboratórios, por apresentarem alta sensibilidade e especificidade, baixo custo, técnica simples, versátil e de leitura objetiva. São disponíveis em *Kits* comerciais. Extratos ou frações antigênicas do *Toxoplasma* adsorvidos em placas de microtitulação ou microesferas são incubados com soros suspeitos, e, em seguida, incubados com conjugados enzimáticos antiglobulina G, M, A ou E. Após colocação do substrato enzimático (cromogênico), haverá aparecimento de cor nos casos positivos, vista a olho nu ou medida através de espectrofotometria. É importante lembrar que não há correspondência entre resultados de testes imunoenzimáticos

realizados por diferentes metodologias. Na avaliação longitudinal o ideal é analisar no mesmo momento as diferentes amostras coletadas com intervalo de tempo mínimo de 2 a 3 semanas (amostras pareadas).

A técnica ISAGA é utilizada para detecção de anticorpos IgM, IgA e IgE. Ela apresenta as vantagens do teste de aglutinação direta e de captura (duplo sanduíche) ELISA para sensibilidade e especificidade. Não requer a utilização de conjugado enzimático e a leitura é fácil, semelhante ao teste de aglutinação direta. Não apresenta resultados falso-positivos relacionados à presença de fator reumatóide e/ou fator antinuclear e é mais sensível e específico que a IFI e ELISA para IgM. Muito utilizado para o diagnóstico de infecção congênita. Em geral é disponível apenas em laboratórios de referência.

Do ponto de vista prático, a avaliação sorológica da toxoplasmose aguda começa com a dosagem de anticorpos IgG e IgM, os quais apresentam uma cinética específica que deve ser conhecida. Existem várias técnicas para detecção destes anticorpos, que foram desenvolvidas e aprimoradas ao longo das décadas, algumas inclusive já abandonadas. Várias podem ser encontradas comercialmente e totalmente automatizadas, como os testes ELISA.

Anticorpos IgM são os primeiros a aparecerem, aproximadamente 14 dias após a infecção primária por *T. gondii*, declinando a níveis indetectáveis meses a anos depois (Dunn *et al.*, 1999; Gras *et al.*, 2004).

As técnicas utilizadas para detecção de IgM devem merecer atenção especial na análise dos resultados encontrados. Enquanto o teste de IFI(IFI) apresenta baixa sensibilidade e alta especificidade, levando a resultados falso-negativos, os testes ELISA disponíveis comercialmente apresentam grande variabilidade. Avaliando seis testes comerciais para detecção de anticorpos IgM contra *T. gondii* em uso nos Estados Unidos, Wilson *et al.* (1997) encontraram especificidade entre 77-99% quando comparados ao ELISA de referência, ressaltando um percentual importante de resultados falso-positivos. A persistência da IgM por longos períodos de tempo é um outro ponto problemático (Bobic *et al.*, 1991). Estudando uma coorte de 446 mulheres que soroconverteram durante a gravidez, Gras *et al.* (2004) mostraram que a IgM permaneceu positiva por mais de 10 e 12 meses em média, quando utilizou-se a IFI e ISAGA respectivamente. Kodym *et al.* (2007) encontraram IgM positivo por ELISA em 21,4% de amostras coletadas mais de 3 anos após o início de sintomas de toxoplasmose aguda. A persistência prolongada de anticorpos IgM é cada dia mais

comum, à medida em que se utilizam testes laboratoriais de alta sensibilidade. Desta forma, resultados IgM positivos em uma única amostra não confirmam infecção aguda na gestação, principalmente se levarmos em conta que uma série de medidas diagnósticas e terapêuticas deverão ser instituídas a partir deste diagnóstico. Por outro lado, um resultado IgM negativo em gestante com títulos baixos de IgG praticamente afasta a possibilidade de soroconversão na gravidez, especialmente se obtida no primeiro trimestre.

Nos Estados Unidos, o FDA (*Food and Drug Administration*) recomenda que os testes ELISA-IgM sejam utilizados como triagem e confirmados, caso positivos, em laboratório de referência.

Os anticorpos IgG são detectados uma a três semanas após o início da infecção, depois do aparecimento da IgM, atingindo pico em 6 a 8 semanas, dependendo da técnica sorológica utilizada. Permanecem com títulos elevados por vários meses e persistem detectáveis por toda a vida. São muito utilizados na triagem de infecção passada (Remington *et al.*, 2006).

Os anticorpos IgA são detectáveis em cerca de 80% dos casos de infecção aguda e são utilizados como um dos marcadores de infecção recente em vários centros de referência para o diagnóstico de toxoplasmose (Liesenfeld *et al.*, 2001; Roberts *et al.*, 2001). Podem permanecer positivos por meses ou até por mais de 1 ano (Stepick-Biek, 1990).

Os anticorpos IgE aparecem nas primeiras semanas de infecção, e juntamente com a IgA compõe o painel de testes em laboratórios de referência (Roberts *et al.*, 2001). Sua vantagem em estudos com a técnica ISAGA foram o aumento precoce dos títulos simultaneamente com a IgA e IgM e desaparecimento anterior a estes anticorpos, em torno dos quatro meses (Pinon *et al.*, 1990).

Os anticorpos da classe IgA e IgE são mais utilizados em conjunto com outros testes, compondo um painel sorológico. Assim ajudam a configurar um perfil agudo ou crônico e são aplicados na análise de casos suspeitos de infecção aguda (Wong *et al.*, 1993; Montoya, 2002). Contudo, alguns autores pontuam que estes anticorpos não acrescentam informações adicionais devido à limitações ligadas à sensibilidade dos testes, ao rápido desaparecimento do soro (IgE em torno de 4 meses), a persistência além de 12 meses (Takahashi&Rossi, 1997; Ashburn *et al.*, 1998) e grande variação individual (Derouin *et al.*, 1987; Candolfi *et al.*, 2007) no caso da IgA. Ambos são

raramente disponíveis para o diagnóstico sorológico de gestantes na prática clínica pública ou privada no Brasil.

Vale a pena ressaltar que testes sorológicos diferentes geralmente medem anticorpos diferentes, os quais mostram um padrão único de ascensão e queda de seus títulos em relação ao início da infecção. Este conhecimento deve ser dominado tanto por médicos quanto pelos laboratórios para que possam juntos buscar solução em casos duvidosos.

Hedman *et al.* (1989) aplicaram em toxoplasmose o conceito, utilizado até então para doenças virais, de que ocorre maturação na afinidade de ligação entre antígeno e anticorpo da classe IgG (avidez) de acordo com a evolução temporal da resposta imune. Eles mostraram que havia diferença significativa na avidez dos anticorpos IgG em soros coletados nos primeiros 3-4 meses de infecção quando comparados àqueles com 1 ano ou mais, sugerindo que o teste pode ser útil em discriminar infecção recente daquela ocorrida no passado distante. Durante a infecção aguda os anticorpos IgG se ligam de forma fraca ao antígeno e à medida que o processo “matura” por semanas ou meses, a avidez da ligação antígeno-anticorpo (Ag-Ac) aumenta, como decorrência da seleção clonal dirigida pelos linfócitos B. Quanto maior a afinidade, mais forte a ligação Ag-Ac, mais tempo transcorrido desde o início da infecção. Reagentes que desnaturam proteínas, incluindo uréia, são utilizados para dissociar o complexo Ag-Ac. A dissociação da ligação do complexo Ag-Ac por meio de uma solução contendo uréia 6M é medida através de um teste imunoenzimático ELISA IgG modificado. O soro do paciente é incubado na placa. Esta é lavada com solução de uréia e em seguida prossegue-se a reação pela incubação com o conjugado enzimático. O resultado é expresso como percentual de anticorpos que resistem à eluição pela uréia e é dado através do cálculo: $(\text{título após uréia} / \text{título original}) \times 100$. Em toxoplasmose, resultados mostrando alta avidez de IgG geralmente indicam que a infecção ocorreu antes de três a cinco meses. O teste está particularmente indicado no primeiro trimestre da gestação em mulheres com IgM positivo. Nesta idade gestacional, um resultado mostrando IgG de alta avidez nos permite afastar infecção aguda recente (Cozon *et al.*, 1998), com chances praticamente nulas de transmissão fetal. Testes em uso na Europa estendem esta possibilidade até o quarto mês de gestação.

Relatando a experiência de um laboratório americano de referência em diagnóstico de toxoplasmose, Liesenfeld *et al.* (2001) avaliou o uso do teste de avidez de IgG em casos sugestivos ou equívocos com relação à infecção aguda. Demonstraram que

55.9% dos pacientes com resultado IgM positivo ou indeterminado na técnica de ELISA apresentaram alta avidéz de IgG e que a utilização deste teste pode diminuir significativamente o número de testes adicionais, acompanhamento sorológico, tratamento medicamentoso ou propedêuticas fetais invasivas, tais como a análise da cadeia de reação em cadeia de polimerase (PCR) no líquido amniótico.

Inicialmente, o teste de avidéz de IgG foi proposto para diagnosticar infecção recente por *T. gondii* (Lappalainen *et al.*, 1993). Estudos posteriores demonstraram que anticorpos de baixa avidéz podem persistir por vários meses após a infecção aguda e, portanto, não seriam fidedignos para o diagnóstico de infecção aguda (Pelloux *et al.*, 1998; Cozon *et al.*, 1998; Lefevre-Pettazzoni, 2006). Por outro lado, parece haver um consenso de que resultados de alta avidéz obtidos no primeiro trimestre do pré-natal afastam a possibilidade de infecção aguda adquirida na gravidez (Petersen *et al.*, 2005). O que ocorre é que a maioria dos estudos confronta os resultados de avidéz de IgG obtidos em apenas dois grupos de pacientes com tempo de infecção muito distantes. O grupo de pacientes com infecção aguda em geral é bem documentado, constituindo-se de pacientes que soroconverteram ou apresentaram sintomas, com menos de 3-5 meses de duração. O grupo com infecção antiga, em contrapartida, é constituído de pacientes com tempo de infecção bastante variável, mais de 6 meses até anos. É evidente a falta de dados sobre o comportamento da avidéz de IgG no intervalo de tempo entre a fase aguda e crônica da infecção, por alguns chamada de convalescente.

Alguns questionamentos ainda são levantados com relação à utilização sistemática do teste de avidéz no auxílio do diagnóstico de infecção aguda na gravidez (Lefevre-Pettazzoni *et al.*, 2006): a maturação da resposta de IgG é variável de indivíduo para indivíduo, os índices não estão padronizados entre laboratórios e não se conhece muito acerca de sua variabilidade, reprodutibilidade e curva ao longo do tempo. A definição de pontos de corte para baixa e alta avidéz também é variável entre os laboratórios e o tratamento antimicrobiano pode influenciar a maturação, atrasando-a (Petersen *et al.*, 2005). Nos Estados Unidos, ao contrário da Europa, os testes comerciais ainda não estão disponíveis fora do centro de referência de Palo Alto, Califórnia, permanecendo sem a liberação do FDA.

Outro teste disponível apenas em laboratórios de referência, produzido *in house*, é o teste de aglutinação diferencial (AD-IgG) para anticorpos IgG anti-*T. gondii*. Baseia-se no fato de que uma alteração química provocada na membrana do taquizoíta produz um padrão único de aglutinação quando este é fixado por formalina ou acetona

(Suzuki *et al.*, 1988). O teste AD-IgG compara títulos de anticorpos obtidos com taquizoítas de *T. gondii* fixados pela formalina com aqueles obtidos com taquizoítas fixados com acetona. Altos títulos de anticorpos no preparado com acetona estão relacionados com infecção aguda recente enquanto altos títulos encontrados quando o parasito é fixado pela formalina estão associados com infecção passada. Dannemman *et al.* (1990) demonstraram que o teste AD-IgG é útil na confirmação da toxoplasmose aguda em pacientes com IgM e IgG positivos. Num grupo de 33 pacientes com toxoplasmose aguda (19 grávidas que soroconverteram na gravidez e 14 pacientes com linfadenopatia toxoplásmica), os autores mostraram que o teste AD-IgG identificou corretamente todas as 19 grávidas e 12 dos 14 pacientes com adenopatia. Por outro lado, um padrão AD-IgG de infecção aguda foi encontrado em 5 de 8 pacientes avaliados após 14-21 meses do episódio inicial de adenopatia e 2 de 14 indivíduos que se infectaram há mais de 2 anos. Resultados semelhantes foram encontrados por Suzuki *et al.* (2001), onde 97% de 31 pacientes com infecção aguda recente apresentaram padrão AD-IgG compatível com infecção aguda. Contudo, o mesmo padrão de infecção recente também foi detectado em 45% de 33 pacientes com infecção latente, deixando claro a limitação do teste em confirmar infecção aguda, de forma semelhante ao que acontece com a avididade de IgG. Também não resolve todas as pendências diagnósticas como ferramenta única na confirmação da infecção aguda recente.

Na maioria dos estudos publicados, as avaliações de testes diagnósticos são baseadas em comparações com métodos de referência, como exemplificado no levantamento feito por Liesenfeld *et al.* (1997) acerca de testes ELISA-IgM. Entretanto, o real motivo para a realização de testes sorológicos em toxoplasmose é inferir sobre o tempo de infecção, em outras palavras, definir se o paciente está ou não na fase aguda da infecção. Acontece que vários estudos evitam incluir pacientes que se encontram em fase intermediária entre infecção aguda e latente, justamente os que trazem maiores dúvidas diagnósticas (Kodym *et al.*, 2006). Roberts *et al.* (2001), por exemplo, não incluíram os soros convalescentes (entre 3 e 12 meses) enquanto Suzuki *et al.* (2001) compararam os resultados obtidos com soros de fase aguda (1-3 meses) e latente (13-38 meses). Holec-Gasior *et al.* (2009), por outro lado, analisaram a reatividade a proteínas recombinantes de *T. gondii*, GRA3 e ROP1, em dois grupos de pacientes, classificados com base critérios sorológicos como agudo (presença de IgM ELISA, IgM/IgA ISAGA e baixa avididade de IgG) e crônico (IgM negativo e alta avididade de IgG).

No contexto das limitações discutidas acima, o desenvolvimento de métodos sorológicos que permitam diferenciar infecção recente daquela adquirida no passado não muito distante tem sido objeto de pesquisas acadêmicas e da indústria. Estas pesquisas precisam incorporar constantemente novos conhecimentos acerca da resposta imune, das particularidades do preparo do antígeno e de tecnologias apropriadas para mensurar a evolução temporal destes marcadores imunológicos de forma a preencher esta lacuna do conhecimento científico.

Estes métodos diagnósticos são particularmente importantes em países que não preconizam triagem sorológica universal e periódica para *T. gondii* durante o pré-natal, como é o caso do Brasil. Na maioria das situações não existe possibilidade de amostras seriadas e as decisões médicas devem ser tomadas frente a casos onde a IgM encontra-se positiva, não raramente já na segunda metade da gestação. Em geral, nestes casos também não podemos contar com a primeira amostra, o que impossibilita a realização de testes pareados ou outros que estejam indicados.

A despeito dos grandes avanços no campo da tecnologia do DNA, a maioria dos testes sorológicos utilizados para infecção pelo *T. gondii* empregam extratos brutos de taquizoítas ou parasitas fixados com paraformaldeído ao invés de antígenos recombinantes de parasitas. A IFI para detecção de IgM em casos suspeitos de infecção aguda utiliza parasitas inteiros fixados. Já a detecção de IgG geralmente é feita com testes ELISA, os quais costumam empregar extrato bruto de parasitas. Os testes que utilizam antígenos recombinantes não mostraram alta sensibilidade e especificidade, o que em parte pode ser atribuído aos seguintes fatos: a) carboidratos ao invés de peptídeos são os principais alvos para anticorpos IgM produzidos durante infecção aguda pelo *T. gondii* e b) a dobra inadequada do antígeno recombinante pode resultar em dramática redução da ligação de quantidades consideráveis de IgG anti-Toxoplasma, que devem reconhecer melhor estruturas terciárias ao invés de primárias (Giraldo *et al.*, 2000)

Três outras abordagens para se estimar o tempo de infecção seriam:

Quantificar os níveis de anticorpos (IgG, IgM) baseados em uma curva padrão de ascensão e queda longitudinal destes anticorpos, respectivamente, obtida a partir de casos de infecção aguda confirmada. Entretanto, os estudos existentes na literatura são em sua maioria compostos por grupos transversais, muitas vezes caracterizados como agudo ou crônico apenas com base em critérios sorológicos (Giraldo *et al.*, 2000). Utilizando como base estudos conduzidos com *Leishmania donovani* e

Trypanosoma cruzi, Giraldo *et al.* (2000) fracionaram componentes da membrana dos taquizoítas de *T. gondii* utilizando procedimento bioquímico (solvente orgânico), obtendo duas frações diferentes de acordo com o grau de hidrofobicidade. Estas duas frações foram preferencialmente reconhecidas por IgM e IgG presentes em soros de pacientes com infecção aguda e naqueles cronicamente infectados, respectivamente;

Avaliar a resposta de isotipos de anticorpos e subclasses de IgG à infecção por *T. gondii*. Vários estudos sugerem que os principais alvos para produção de anticorpos durante as fases aguda e crônica da infecção são antígenos de superfície presentes na membrana (Giraldo *et al.*, 2000);

Analisar a utilidade da citometria de fluxo na avaliação diagnóstica temporal da toxoplasmose adquirida.

2.9 As subclasses de IgG nas infecções agudas

A estrutura antigênica de *T. gondii* é complexa. Antígenos citoplasmáticos, que são liberados quando da lise dos organismos, e antígenos de membrana estão envolvidos na resposta imune. Espera-se que anticorpos formados em resposta a estes diferentes antígenos apresentem-se de forma diferente tanto em sua especificidade quanto na classe e subclasse de imunoglobulinas. As diferenças nas propriedades biológicas das quatro subclasses de IgG têm servido de estímulo para pesquisadores na exploração da resposta de subclasses de IgG a vários agentes infecciosos. A resposta de subclasses pode variar consideravelmente, dependendo do organismo. Por exemplo, a resposta de subclasses de imunoglobulina G a antígenos protéicos e de carboidratos é primariamente IgG1 e IgG2, respectivamente (Wagner *et al.*, 1987). Enquanto a resposta de subclasse de IgG a antígenos virais é principalmente do tipo IgG1, a resposta de antígenos polissacarídeos bacterianos parece ser primariamente de IgG2 (Wagner *et al.*, 1987) e a resposta à infecção por filária parece ser principalmente IgG4 (Hussain *et al.*, 1987; Ottessen *et al.*, 1985). Estudando a resposta de subclasses de IgG no diagnóstico de leishmaniose tegumentar americana utilizando a técnica de citometria de fluxo, Pissinate *et al.* (2008) encontraram predomínio de IgG1 e IgG3. A resposta de subclasses de IgG também pode variar de acordo com fatores do hospedeiro. Desta forma, enquanto lactentes com menos de 2 anos de idade apresentam resposta anticórpica de subclasse IgG2 e IgG3 ao vírus sincicial respiratório, a resposta do adulto é primariamente da subclasse IgG2 (Wagner *et al.*, 1987).

Na tentativa de identificar resposta de subclasse de anticorpos IgG que pudesse ser útil no estudo da patogênese e diagnóstico da toxoplasmose, Huskinson *et al.* (1989) analisaram a presença das quatro subclasses de IgG em soros de pacientes com infecção aguda de 2-4 meses de duração (4 casos), gestantes que apresentaram soroconversão (3 casos) e indivíduos com infecção crônica por *T. gondii* (5 casos), através do método de ELISA. Para isso utilizou antígenos reduzidos e não reduzidos de taquizoítas da cepa RH de *T. gondii* para *immunoblot*. Encontraram resposta predominantemente de IgG1, títulos menores de IgG2 e IgG3 e ausência de detecção de IgG4. Os autores levantaram dúvidas sobre se o número de bandas identificadas pelos quatro anticorpos monoclonais anti-subclasses de IgG poderiam identificar com acurácia os determinantes antigênicos principais de *T. gondii* que realmente estimulam esta resposta de anticorpos.

Estudando os níveis de IgG e subclasses pelo método de ELISA em pacientes imunocompetentes selecionados com base em critérios clínicos, epidemiológicos e sorológicos, classificados em casos agudos (Grupo A- < 10 semanas após soroconversão), sub-agudos (Grupo B- 3-12 meses) e latentes (Grupo C- > 12 meses após infecção primária), Derouin *et al.* (1987) encontraram resultados semelhantes à Huskinson *et al.* (1989): predominância de IgG1 em todos os grupos porém níveis mais elevados no grupo B. IgG2 e IgG3 mostraram níveis mais baixos que a IgG1. A IgG3 apresentou comportamento diferente das outras subclasses, com níveis significativamente menores nos grupos B e C do que no grupo com infecção aguda. Os anticorpos da subclasse IgG4 foram detectados apenas ocasionalmente.

2.10 Citometria de fluxo na avaliação diagnóstica em doenças infecciosas

Estudando eficácia do tratamento da Doença de Chagas, Martins-Filho *et al.* (1995) avaliaram a presença de anticorpos líticos ligados à membrana de tripomastigotas vivos como critério de tratamento, aplicando pela primeira vez a técnica de citometria de fluxo. Mostraram que a sensibilidade da citometria de fluxo foi muito maior do que a técnica de lise mediada por complemento, até então utilizada para detecção destes antígenos ligados à membrana.

Estudo conduzido no Núcleo de Doenças Infecciosas (NDI) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) para avaliação de cura de pacientes com calazar mostrou a presença de níveis significativamente diferentes de anticorpos aderidos à membrana do parasito em pacientes curados e não curados, também utilizando a técnica de

citometria de fluxo (Lemos *et al*, 2007). A técnica de citometria de fluxo foi aplicada por Pissinate *et al.*(2008) em estudo conduzido na mesma instituição, para o diagnóstico de leishmaniose tegumentar americana, utilizando como antígeno promastigotas de *Leishmania amazonensis* fixados. Os autores encontraram excelente desempenho diagnóstico do teste, com sensibilidade de 99% e especificidade de 100%, contudo evidenciando reatividade cruzada com outras doenças co-endêmicas como calazar, doença de Chagas e malária.

Sabendo que tanto o teste de Sabin Feldman quanto a IFI utilizam parasitos íntegros, vivos e fixados, respectivamente, identificando anticorpos anti-*T. gondii* aderidos à membrana, nós nos propusemos a estudar a presença de anticorpos dirigidos contra componentes da membrana do parasito íntegro fixado com a técnica de citometria de fluxo.

OBJETIVOS DO ESTUDO

3. OBJETIVOS DO ESTUDO

3.1 Objetivo Geral

Estudar a dinâmica de marcadores sorológicos para o imunodiagnóstico da toxoplasmose aguda humana

3.2 Objetivos Específicos

1. Correlacionar os resultados de IgG, IgM e avidéz de IgG entre as diferentes técnicas
2. Estudar a dinâmica dos anticorpos IgG, IgM, IgA e avidéz de IgG durante o período de doze meses do estudo longitudinal
3. Avaliar a técnica de citometria de fluxo no estudo das subclasses de IgG no diagnóstico temporal da infecção por *T. gondii*
4. Determinar o desempenho de cada teste na identificação da infecção aguda
5. Identificar a melhor combinação de testes que discrimina as fases da doença.

PACIENTES E MÉTODOS

4. PACIENTES E MÉTODOS

4.1 Características do estudo e laboratórios colaboradores

Este estudo longitudinal de coorte prospectivo, analítico-descritivo foi realizado no NDI-UFES e outros três laboratórios colaboraram na realização das etapas do projeto, descritas a seguir. No NDI foram feitos o arrolamento dos pacientes e as análises de anticorpos anti-*T. gondii* IgM, IgG, avides de IgG e subclasses de IgG por citometria de fluxo. O Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) preparou os antígenos (taquizoítas para CF e imunofluorescência indireta), e realizou os testes *para* dosagens dos anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* por ELISA *in house*. O Laboratório Micra Biotecnologia (Belo Horizonte, MG) realizou os testes de imunofluorescência indireta para IgG e IgM anti-*T. gondii* com lâminas preparadas no Laboratório de Imunologia da UFU. A Central Sorológica de Vitória realizou o teste de avides de IgG e as dosagens de anticorpos IgG e IgM por ELFA, utilizando o Sistema Vidas (bioMérieux).

4.2 Critérios de inclusão do estudo

- a) Pacientes de ambos os sexos.
- b) Faixa etária entre 7 e 80 anos.
- c) Presença de pelo menos dois dos seguintes sinais ou sintomas compatíveis com infecção aguda por *Toxoplasma gondii*: mal estar, adinamia, presença de gânglios, cefaléia, febre e artralgia.
- d) Evidência sorológica da infecção pela presença de soroconversão ou títulos elevados de anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii* por técnicas clássicas
- e) Concordar com o protocolo do estudo e assinar o termo de consentimento livre e esclarecido pós-informação.

4.3 Critério de exclusão do estudo

- a) Presença de infecção pelo HIV.
- b) Gravidez.
- c) Impossibilidade de cumprir o protocolo.
- d) Presença de anticorpos IgG anti-*T.gondii* de alta avidéz na primeira amostra.

4.4 Pacientes e amostras sequenciais de soro

Como parte da estratégia de identificação e arrolamento dos voluntários do estudo contactou-se, através de telefone, todos os médicos infectologistas cadastrados na Sociedade Brasileira de Infectologia – seção Espírito Santo. Após o primeiro contato, os médicos receberam por e-mail o resumo do protocolo, contendo os critérios de inclusão e exclusão e o endereço para encaminhamento dos pacientes.

O período de arrolamento do estudo foi de 25 meses (junho de 2005 a junho de 2007). Todos os pacientes foram seguidos por 12 meses \pm 30 dias. Portanto, o seguimento do último paciente ocorreu em maio de 2008. Voluntários do estudo com suspeita clínica ou confirmação sorológica da doença eram triados por médicos infectologistas, a partir de consultórios privados ou ambulatorios de doenças infecciosas de hospitais e postos de saúde da rede pública da região metropolitana de Vitória e municípios do interior do estado. Após a triagem, os pacientes eram encaminhados para entrevista, realizada sempre pela autora do estudo, para reavaliação dos critérios de inclusão e exclusão. Se o paciente era elegível, obtinha-se termo de consentimento livre e esclarecido e, a seguir, a primeira amostra de sangue.

Durante o período de estudo, 72 pacientes foram encaminhados por seus médicos assistentes para entrevista. Destes pacientes, 32 preencheram os critérios de inclusão e formaram o grupo estudado. Os motivos da exclusão do restante foram o não preenchimento dos critérios clínicos (37 pacientes) e presença de anticorpos IgG anti-*T.gondii* de alta avidéz na primeira amostra de soro (três pacientes). Um paciente desistiu antes de completar a série de coletas (FIG. 7).

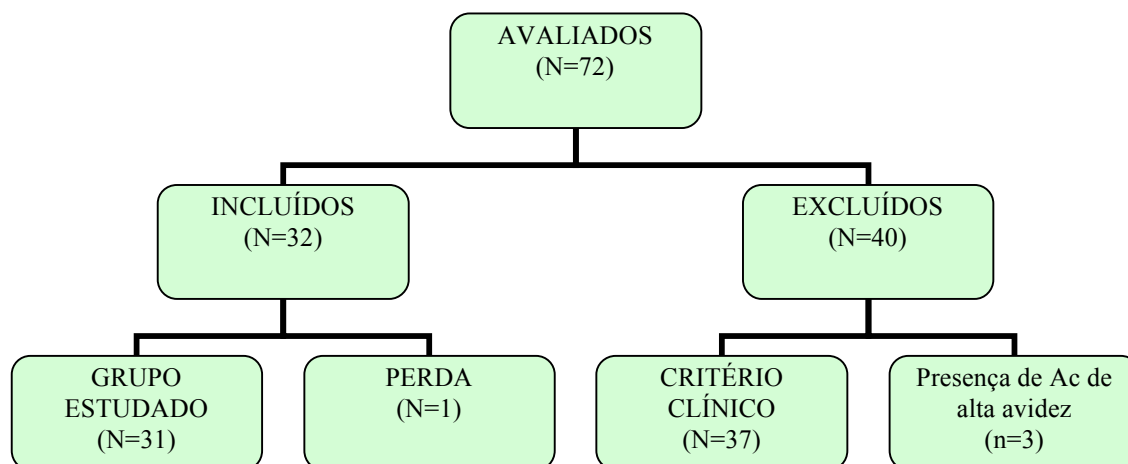


FIGURA 7-Fluxograma de seleção de pacientes

Todos os 31 pacientes arrolados foram seguidos por aproximadamente 12 meses \pm 30 dias utilizando-se a data do início dos sintomas como dia zero (*baseline*). De cada paciente foram coletadas de cinco a 8 amostras de sangue (média de 7 amostras), agrupadas com base nos intervalos entre a data da coleta e a data de início dos sintomas em 1, 2, 3, 4 meses (\pm 15 dias) e 6, 8, 10 e 12 meses (\pm 30 dias). Em todos os pacientes foi realizado oftalmoscopia binocular indireta, após midríase com colírio de tropicamida a 1% para avaliação do vítreo, coróide e retina. A fundoscopia binocular indireta foi indicada para todos os pacientes e realizada por médico oftalmologista, seguindo protocolo preconizado pelos médicos assistentes.

Parte dos pacientes (12/31) recebeu tratamento antiparasitário, conforme indicação do médico assistente, por 2 a 6 semanas.

Os soros foram separados em três grupos, classificados de acordo com o intervalo de tempo decorrido entre o início dos sintomas clínicos e a coleta da amostra de sangue em:

- **grupo 1**, (infecção aguda): 1, 2 e 3 meses
- **grupo 2**, (infecção convalescente precoce): 4, 6 e 8 meses
- **grupo 3**, (infecção convalescente tardia): 10 e 12 meses.

4.5 Coleta e armazenamento do soro

As amostras seqüenciais de sangue foram coletadas através de venopunção em tubo de ensaio sem anticoagulante. Os soros foram identificados e armazenados em freezer -20° Celsius, em alíquotas de 100µl, que eram armazenadas até o momento da realização das respectivas técnicas.

4.6 Análises sorológicas

Utilizaram-se as técnicas clássicas de IFI para detecção de IgG e IgM; ELISA para IgG, IgM e IgA; ELFA para IgG, IgM e avides de IgG. A citometria de fluxo foi padronizada para quantificação dos anticorpos IgG e IgM, subclasses de IgG e avides de IgG anti-*T. gondii*.

O desenvolvimento das análises do estudo pode ser visualizado na Figura 8. Os testes e seus valores de referência, recomendados pelo fabricante e adotados pelos laboratórios executores, assim como os valores para resultados positivos e negativos, podem ser vistos na Tabela 01.

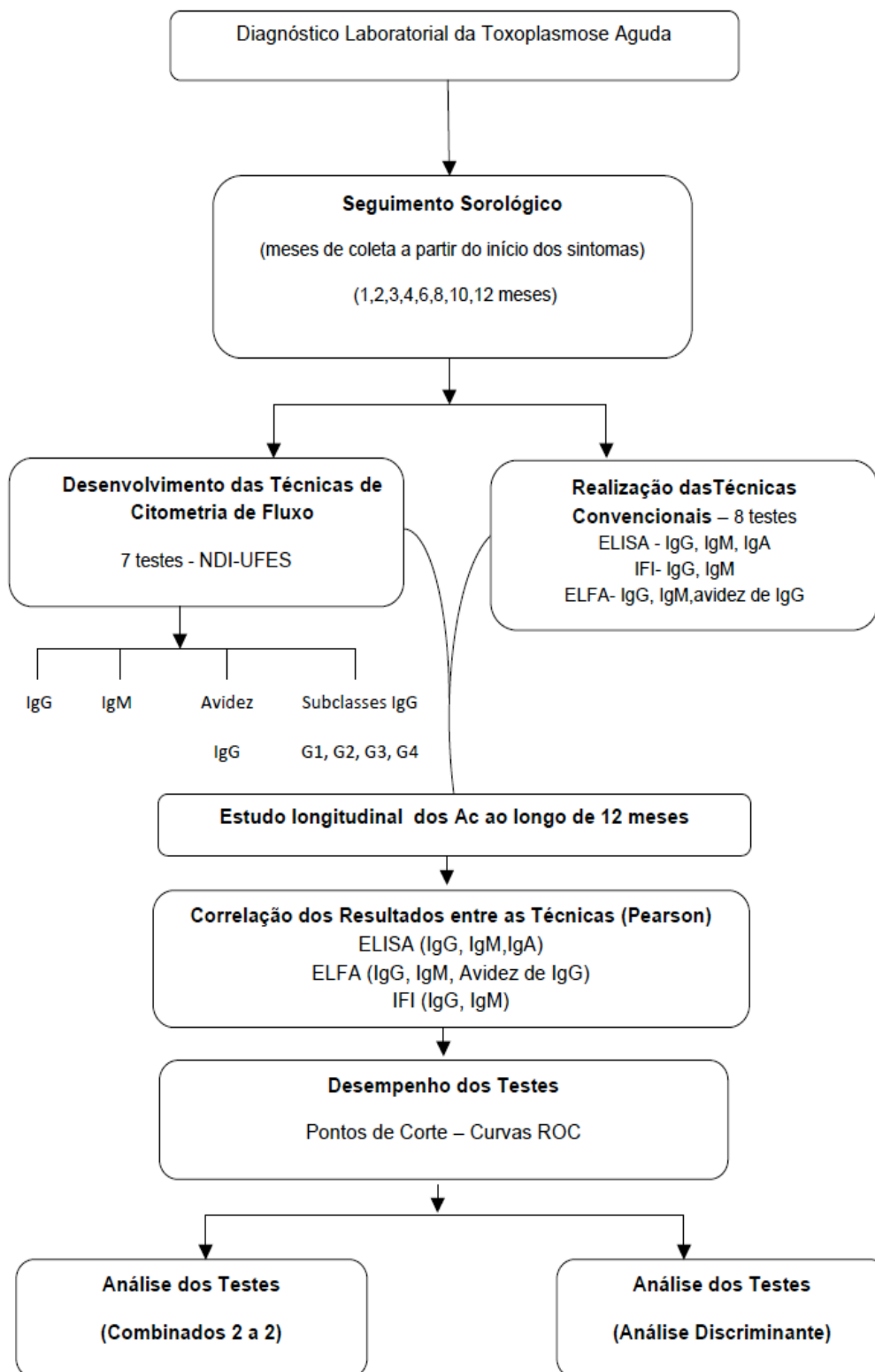


FIGURA 8- Metodologia do estudo

ELISA, ensaio imunoenzimático; ELFA, ensaio imunoenzimático fluorimétrico; IFI, imunofluorescência indireta, CF, citometria de fluxo

TABELA 01 - Marcadores sorológicos estudados na coorte de 31 pacientes com infecção aguda por *T. gondii*, UFES, 2005-2008.

Imunoensaio			Limite de Detecção	
Anticorpo	Princípio	Expressão	Negativo	Positivo
IgG	ELISA	Índice	≤ 1,0	> 1,2
IgG	ELFA	UI/ml	< 4	≥ 8
IgG	IFI	Título	< 128	≥ 128
IgG	CF	PPFP	≤ 10	> 10
IgM	ELISA	Índice	≤ 1,0	> 1,2
IgM	ELFA	IU/ml	< 0,55	> 0,65
IgM	IFI	Diluição	≤ 32	≥ 64
IgM	CF	PPFP	≤ 15	>15
IgA	ELISA	Índice	≤ 1,0	> 1,2
IgG1	CF	PPFP	≤ 10	> 10
IgG2	CF	PPFP	≤ 10	> 10
IgG3	CF	PPFP	≤ 5	> 5
IgG4	CF	PPFP	≤ 10	> 10
Avidez de IgG	ELFA	Índice	≥ 0,3 ⁽¹⁾	<0,2 ⁽²⁾
Avidez de IgG	CF	Percentual	> 60 ⁽¹⁾	≤ 60 ⁽²⁾

ELISA, ensaio imunoenzimático; ELFA, ensaio imunoenzimático fluorimétrico; IFI, imunofluorescência indireta, CF, citometria de fluxo; UI/ml, unidades internacionais por mililitros; PPFP, percentual de parasitas fluorescentes positivos; ⁽¹⁾, considerado como alta avides; ⁽²⁾, considerado como baixa avides

4.6.1 Detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA anti- *T. gondii* por ELISA

4.6.1.1 Manutenção e obtenção de *T. gondii*

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

4.6.1.2 Preparo do antígeno solúvel de *T. gondii*

Antígeno solúvel de taquizoítas de *T. gondii* (STAg) foi preparado como descrito por Scott e colaboradores (1987), com algumas modificações. Suspensões parasitárias (1×10^8 taquizoítas/ml) foram tratadas com inibidores de proteases (fenil-metil-sulfonil-fluoreto [PMSF] a 1,6 mM, leupeptina a 50 µg/ml e aprotinina a 10 µg/ml; Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) e então submetidas a seis ciclos rápidos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C seguido por seis ciclos de ultra-som (Thorton – INPEC Eletrônica S/A, Santo Amaro, SP, Brasil) durante 1 minuto a 60 Hz em banho de gelo. Após centrifugação (10.000 x g, 30 minutos, 4°C), o sobrenadante foi coletado e a concentração protéica foi determinada (Lowry *et al.*, 1951). Alíquotas dos antígenos foram armazenadas a -20°C até serem utilizadas em ELISA.

4.6.1.3 ELISA indireto IgG

O teste ELISA indireto foi realizado para a detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, conforme descrito previamente (Mineo *et al.*, 1980), com algumas modificações.

Placas de microtitulação de poliestireno de alta afinidade (Corning costar 3590, fSigma) sensibilizadas com STAg (10µg/ml) diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M (pH 9,6) durante 18 horas a 4°C. Após a incubação, as placas foram lavadas três vezes com PBS-0,05% de Tween 20 (PBS-T) e bloqueadas com PBS-T contendo 5% de leite em pó desnatado (PBS-TM) por 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagem por três vezes com PBS-T, as placas foram incubadas com amostras de soro diluídas (1:64) em PBS-TM por 1 hora a 37°C. Após lavagem por seis vezes, as placas foram incubadas com anticorpo de cabra anti-IgG humana conjugado com peroxidase (1:2000) por 1 hora a 37°C. Após nova lavagem por seis vezes com PBS-T, a reação foi revelada pela adição do substrato enzimático H₂O₂ a 0,03% e cromógeno 2,2'-azino-bis-3-etil-benzotiazolina ácido sulfônico (ABTS) a 0,01 M diluídos em tampão citrato-fosfato 0,07 M (pH 4,2).

A densidade óptica (DO) foi determinada a 405nm em leitora de placas. Soros controles positivos e negativos foram incluídos em cada placa. O limite de positividade (*cut off*) da reação foi determinado pela média da DO dos soros controles negativos acrescida de 3 desvios padrões. Os resultados foram expressos em índices de reatividade ELISA (IE), de acordo com a fórmula: $IE = DO \text{ amostra} / DO \text{ cut off}$, onde valores de $IE > 1,2$ foram considerados positivos, para a exclusão de valores de reatividade próximos a $IE = 1,0$.

4.6.1.4 ELISA de captura IgM e IgA

ELISA de captura foi realizada para a detecção de anticorpos IgM e IgA específicos a *T. gondii* em amostras de soro humano, seguindo o protocolo anteriormente descrito (Mineo *et al.*, 1986), com algumas modificações.

Placas de microtitulação de poliestireno (Immulon 2, Dynex Technologies, Chantilly, VA, EUA) foram sensibilizadas com anticorpos de captura anti-IgM humana ou anti-IgA humana (Sigma Chemical Co.) a 10 µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M (pH 9,6) durante 18 horas a 4°C. Após este período de incubação, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T e bloqueadas com PBS-TM por 1 hora à temperatura ambiente. Após serem lavadas por mais três vezes, as placas foram incubadas com amostras de soro humano diluídas em PBS-TM (1:16) por 2 horas a 37°C. Após novas lavagens, as placas foram incubadas com STAg (100 µg/ml) em PBS-TM por 2 horas a 37°C. O Ag ligado foi detectado pela adição da porção F(ab')₂ de anticorpo de coelho anti-*T. gondii* conjugado com peroxidase (preparado segundo Wilson&Nakane, 1978)

diluído 1:50 em PBS-TM, seguindo incubação por 1 hora a 37°C. As etapas de revelação, leitura e expressão dos índices de reatividade ELISA foram realizadas conforme descrito para ELISA indireto.

4.6.2 Detecção de anticorpos IgG, IgM e avides de IgG anti- *T. gondii* por ELFA

4.6.2.1 Detecção de IgG

Foi utilizado o teste VIDAS® TOXO IgG II (bioMérieux, Lyon, França) que é uma análise quantitativa totalmente automatizada, utilizando o método imunoenzimático sanduíche em duas etapas, com detecção final em fluorescência (ELFA). A fase sólida do teste se desenvolve num cone que também serve como sistema de pipetagem e os reagentes da reação imunológica estão prontos para ser utilizados numa barrete contendo 10 poços. O valor do sinal de fluorescência é proporcional à concentração do anticorpo presente na amostra e o resultado final é impresso depois de calculado automaticamente pelo aparelho em relação a uma curva de calibração memorizada. Resultados < 4 UI/ml são considerados negativos; ≥ 8 UI/ml positivos e valores de 4-7 UI/ml são duvidosos.

4.6.2.2 Detecção de IgM

Foi utilizado o teste VIDAS® TOXO IgM II (bioMérieux, Lyon, França) que é uma análise quantitativa totalmente automatizada, utilizando o método imunoenzimático por imunocaptura, com detecção final em fluorescência (ELFA). Resultados com valores < 0,55 UI/ml são considerados negativos, >0,65 UI/ml são positivos e de 0,55 a 0,65 UI/ml são duvidosos.

4.6.2.3 Avides de IgG

Foi utilizado o teste de avides de IgG por imunoensaio enzimático duplo sanduíche (*two-step enzyme immunoassay sandwich method*) com sistema de detecção final fluorescente (ELFA). Este teste é executado em equipamento automatizado (VIDAS®, bioMérieux, Lyon, França) que também efetua automaticamente os cálculos e a interpretação dos resultados, como se segue: <0.200, baixa avides (pode ser

encontrada em infecções agudas primárias por *T. gondii*); 0.200 a <0.300, avidéz intermediária (infecção primária durante os últimos 6 meses é possível); ≥0.300, alta avidéz (exclui infecção primária dentro das últimas 16 semanas). O fabricante declara que, com este método, resultados de alta avidéz nas primeiras 16 semanas de gestação permitem a exclusão de infecção aguda adquirida durante a gravidez (Pelloux *et al.*, 1998).

4.6.3 Detecção de anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii* por IFI

*4.6.3.1 Preparo do antígeno de *T. gondii* para reação de imunofluorescência indireta*

Taquizoítas íntegros de *T. gondii* foram preparados como previamente descrito (Mineo *et al.*, 1980), com algumas modificações. As suspensões parasitárias foram tratadas com solução fixadora (10,0g/L de paraformaldeído, 10,2g/L de cacodilato de sódio e 6,65g/L de cloreto de sódio, pH 7,2) diluída 1:1 em PBS e mantida a 4°C. Após 24 horas foram centrifugadas a 1000g, 4°C por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 10ml de PBS. Posteriormente, procedeu-se a contagem do número de parasitos e a suspensão celular foi ajustada para 5×10^6 taquizoítas/ml para utilização nos ensaios de imunofluorescência convencional e por citometria de fluxo. Ainda para o preparo das lâminas da IFI, a suspensão parasitária foi ressuspendida em água destilada estéril até obter concentração de 20-30 parasitos por campo microscópico (aumento 400X). Um volume de 10 µl da suspensão foi adicionado em áreas demarcadas de lâminas microscópicas para imunofluorescência (Perfecta Ind. e Com. de Lâminas de Vidro Ltda., São Paulo, SP, Brasil) que foram mantidas à temperatura ambiente por 3 a 4 horas para completa fixação dos parasitos. As lâminas com taquizoítas fixados de *T. gondii* foram individualmente embaladas em lenços de papel e, posteriormente, em papel alumínio e armazenadas a -20°C até serem utilizadas em reações de imunofluorescência indireta.

4.6.3.2 Testes de Imunofluorescência indireta

Os reagentes utilizados para a reação de imunofluorescência indireta foram: antígeno preparado como descrito anteriormente e conjugados anti-IgG (*Anti-human IgG Fc*

specific FITC conjugate, Sigma) e anti-IgM (*Anti-human IgM μ chain specific FITC conjugate*, Sigma).

As lâminas foram preparadas e conservadas a -20°C por até três meses em recipiente fechado. Para cada soro desconhecido foram preparadas diferentes diluições seriadas para IgM (1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/1024, 1/4096) e para IgG (1/64, 1/128, 1/256, 1/1024, 1/4096, 1/8192, 1/16.384, 1/32.768, 1/65.536), juntamente com soros controles positivo e negativo. A seguir, 50ul dos soros-teste foram distribuídos nas lâminas e incubados por 30 minutos a 37°C em câmara úmida. Após esta incubação as lâminas foram lavadas com PBS e secas à temperatura ambiente antes de receberem os conjugados específicos e serem incubadas nas mesmas condições anteriores. Após uma nova etapa de lavagem com PBS, foi realizada a leitura independente por dois técnicos de nível superior, utilizando o microscópio de imunofluorescência (Olympus CBA2).

As amostras foram consideradas positivas, quando intensa fluorescência verde-maça foi detectada por toda a periferia do parasito. O título do soro foi determinado pela última diluição, onde 50% dos parasitos apresentavam fluorescência. Os títulos de IgM abaixo de 64 e de IgG abaixo de 128 foram considerados negativos.

4.6.4 Detecção de anticorpos anti-*T. gondii* por Citometria de Fluxo

No momento do uso, as amostras foram descongeladas, diluídas em PBS [0,15M, 8,0g/l de NaCl, 0,2g/l de KCl, 0,24g/l de KH₂PO₄ e 1,15g/l de Na₂PO₄, pH 7,2] suplementado com 3% de soro fetal bovino (SFB).

Os anticorpos reveladores utilizados nos ensaios de imunofluorescência por citometria de fluxo marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou biotina foram obtidos da Sigma Chemical Corp., St Louis, MO; e o reagente secundário estreptoavidina-ficoeritrina foi obtido da SouthernBiotech Associates, Birmingham, AL. As diluições dos anticorpos conjugados e dos soros foram padronizadas pelo laboratório de citometria de fluxo do NDI (dados não publicados).

Os ensaios de imunofluorescência para a detecção de anticorpos anti-taquizoítas fixados foram realizados segundo o protocolo descrito por Lemos *et al.* (2007). O experimento foi realizado em placas de microtitulação de 96 poços com fundo em “U” ((Nunc, Dinamarca), adicionando-se 50ul do soro diluído, juntamente com 50ul da suspensão de parasitas (5,0x10⁶/ml) e incubados a 37°C por 30 minutos. Os parasitos foram lavados duas vezes com 200ul PBS-3%SFB, por centrifugação a 1.000g, 4°C durante 10 minutos, e o sobrenadante desprezado. Posteriormente, os parasitos foram incubados com 50ul de anticorpo anti- IgG e anti-IgM marcados com isotiocianato de fluoresceína-FITC diluído em PBS- 3%SFB, a 37°C durante 30 minutos, ao abrigo da luz. Para a detecção de anticorpos das subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) os soros foram incubados juntamente com os parasitos a 37°C por 30 minutos, na presença de 50ul de anticorpos anti-subclasses de IgG humana marcado com biotina, diluídos em PBS-3%SFB, seguida por duas lavagens com PBS-3%SFB. Em seguida, os parasitos foram incubados a 37°C por 30 min, na presença de 20ul de estreptoavidina conjugada com ficoeritrina – SAPE, diluído 1:400 em PBS-3%SFB. Após a incubação, os parasitos foram lavados duas vezes e o sobrenadante desprezado. Os parasitos foram, então, novamente fixados com 200ul de solução fixadora e a microplaca mantida a 4°C, ao abrigo da luz, até o momento da leitura da fluorescência no citômetro de fluxo, que não ultrapassou 24 horas.

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

4.6.5 Detecção de Avidéz de IgG anti-*T. gondii* por citometria de fluxo

O ensaio de avidéz de IgG por citometria de fluxo foi realizado conforme descrito anteriormente para parasitos fixados, com algumas modificações. O experimento foi realizado em microplacas de 96 poços com fundo em “U” (Nunc, Dinamarca), em duplicatas em duas placas separadas, adicionando-se 50ul do soro diluído nas seguintes diluições 1:32.000, 1:128.000, 1:512.000 e 1:2048.000 juntamente com 50ul da suspensão de parasitas ($5,0 \times 10^6$ /ml) e incubados a 37°C por 30 minutos. Os parasitos foram lavados uma vez com 200ul PBS-3%SFB por centrifugação a 1.000 x g, 4°C durante 10 minutos. Em seguida foi realizada uma lavagem diferencial em uma das placas com solução de uréia 6M diluída em PBS-3%SFB por 5 minutos, enquanto a outra placa foi lavada somente com PBS 3%-SFB, por centrifugação a 1.000 x g, 4°C durante 10 minutos, e o sobrenadante desprezado. Posteriormente após nova lavagem com 200ul PBS-3%SFB, a reação foi revelada como descrito para o ensaio de citometria de fluxo para parasitos fixados.

Os resultados foram expressos em Índice de Avidéz (IA) e calculado como a razão entre os valores de Parasitos Fluorescentes Positivos (PPFP) obtidos das amostras tratadas com uréia (U^+) e as amostras não tratadas (U^-), segundo a fórmula: $IA (\%) = [PPFP(U^+) / PPFP (U^-)] \times 100$. Para análise, foi utilizada a última diluição do soro que possuía valores de PPFP>20% para cada amostra

4.6.5.1 Aquisição e análise dos dados da citometria

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

FITC, emitem fluorescência verde (FL1 - fluorescência tipo 1), enquanto anticorpos marcados pelo sistema biotina/SAPE, emitem fluorescência laranja (FL2 - fluorescência tipo 2).

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

4.7 Definição do critério padrão-ouro de diagnóstico de toxoplasmose aguda

Os requisitos para o diagnóstico de infecção aguda nos pacientes estudados foram:

- a. Presença de pelo menos dois sintomas compatíveis com infecção aguda por *T. gondii*, com data de início conhecida e pelo menos uma amostra de sangue coletada durante os primeiros três meses;
- b. Presença de IgM anti-*T. gondii* positivo em títulos elevados ou em elevação;
- c. Ausência de IgG anti-*T. gondii* na primeira amostra e presença na segunda, ou títulos elevados ou em elevação;
- d. Baixa avidéz de IgG na primeira amostra.

4.8 Análise Estatística

Os dados da ficha clínica e os resultados dos testes sorológicos foram transferidos para o banco de dados do programa SPSS versão 15.0.

A análise dos resultados do estudo foi realizada de forma descritiva e inferencial.

A análise descritiva (média e desvio padrão) foi realizada utilizando o total de pacientes arrolados (N= 31). Para a análise inferencial foram utilizados os pacientes que apresentavam resultados sorológicos para todos os meses avaliados.

Foi realizado o teste ANOVA para avaliar a associação entre os resultados de medidas repetidas através do programa Statistica, versão 7.0, considerando o tempo como variável dependente.

Foram testadas as médias dos grupos para todos os tempos e também para os tempos individualmente pelo teste de Tukey.

Para análise de correlação dos resultados dos testes entre diferentes técnicas, para cada tipo de anticorpo, tempo a tempo, foi utilizado o teste de correlação de Pearson. O teste IgA não foi analisado neste item por ter sido realizado apenas por uma técnica.

Em todas análises, diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Para análise do desempenho das análises sorológicas para o diagnóstico de infecção aguda por *T. gondii* três metodologias foram implementadas: Curva ROC, para avaliar cada teste individualmente, a combinação de dois testes e análise discriminante. As duas últimas foram empregadas para identificar a melhor combinação de testes que discrimina as fases da doença.

Em primeiro lugar, para a obtenção dos valores de sensibilidade e especificidade para os testes diagnósticos avaliados, foi necessária a definição de pontos de corte, ou seja, um valor que permitisse classificar os resultados dos testes como positivos (infecção aguda) e negativos (infecção convalescente tardia). A *Receiver Operating Characteristic Curve*, conhecida como curva ROC, foi utilizada neste estudo para determinação destes pontos de corte, bem como para avaliação da acurácia global da pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* por CF no diagnóstico de toxoplasmose. As curvas ROC foram obtidas utilizando-se o programa MedCalc Statistical, versão 7.0. Todos os testes foram avaliados por esta metodologia.

A segunda forma de acessar a época da infecção (aguda ou convalescente tardia) foi através da combinação de dois testes, seguindo estratégia proposta por Roberts *et al.* (2001). Sensibilidade foi considerada como o percentual de positivos no grupo 1 (infecção aguda) e especificidade o percentual de resultados negativos no grupo 3 (infecção convalescente tardia). Os valores positivos no grupo 3 e negativos no grupo 1 foram considerados falso-positivos e falso-negativos, respectivamente. O teste de primeira linha deve apresentar 95% de sensibilidade e o teste de segunda linha pelo menos 90% de sensibilidade e menos de 50% de falso positivo. A combinação dos dois testes foi feita de forma sequencial. Resultados negativos nos testes de primeira linha foram classificados como indicativos de infecção convalescente tardia. Soros com resultados positivos ou duvidosos nos testes de primeira linha foram referidos para avaliação combinada com um dos testes de segunda linha. Os pares de resultados obtidos com a combinação de testes foram classificados de acordo com o critério proposto por Roberts *et al.* (2001), mostrado no Quadro 2.

QUADRO 2- Classificação dos resultados da combinação de 2 testes

Teste segunda linha	Teste primeira linha		
	Positivo	Duvidoso	Negativo
POSITIVO	AGUDA	AGUDO	CONVALESCENTE TARDIA
DUVIDOSO	AGUDA	NÃO CLASSIFICÁVEL	CONVALESCENTE TARDIA
NEGATIVO	NÃO CLASSIFICÁVEL	CONVALESCENTE TARDIA	CONVALESCENTE TARDIA

FONTE: Roberts *et al.* 2001, pg. 469

Para os testes **convencionais** (ELISA, IFI e ELFA) e para aqueles **desenvolvidos** pelo nosso estudo (CF), foram escolhidos dois pontos de corte: a) para o diagnóstico da doença (**preconizados** pelo fabricante ou laboratório executor) e b) pontos de corte **ajustados** pelo nosso estudo, utilizando os valores de sensibilidade e especificidade que compõem as respectivas curvas ROC (TAB. 13), buscando atender os critérios para classificação do teste como de primeira ou segunda linha (Roberts *et al.*, 2001).

Por último, ainda com intuito de discriminar as fases da doença e classificar um novo indivíduo em uma destas três fases, foi utilizado o programa SPSS, versão 15.0, na opção *análise discriminante*. Foram adotados o método “ENTER”, que deixa no modelo todas as variáveis escolhidas pelo pesquisador e o método “STEP WISE”, onde o próprio modelo escolhe as variáveis com melhor poder discriminante. Outros

modelos foram testados em cenários diferentes. A seguir, para avaliar os percentuais de acerto, foi utilizada a validação cruzada, que ao calcular o percentual de acerto não inclui no modelo o ponto analisado (Johnson & Wichern, 1992).

4.8.1 Análise de perdas e possíveis variáveis de confusão

Dezessete pacientes completaram as oito coletas programadas.

A Tabela 2 mostra os dados faltantes por variável de acordo com o mês programado para a coleta.

Tempo (Mês da coleta)	ELISA			ELFA			CF				IFI				
	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM	Avidéz de IgG	IgG	IgM	Avidéz de IgG	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgG	IgM
1	7	7	7	7	7	15	5	5	12	5	5	5	5	7	6
2	5	5	5	5	6	5	5	4	7	4	4	5	4	3	1
3	1	1	1	2	1	2	1	1	3	1	1	1	1	2	0
4	3	3	3	4	3	4	3	3	5	3	3	3	3	1	0
6	2	2	2	3	2	3	2	2	3	2	2	2	2	2	0
8	0	0	0	1	0	1	0	0	3	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	1	0	1	0	0	6	0	0	0	0	2	0
12	0	0	1	1	2	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0

TABELA 2. Dados faltantes por variável de acordo com mês programado para a coleta de sangue para os 31 pacientes com infecção aguda por *T. gondii*, 2005-2008

Para proceder à análise longitudinal, foi utilizado um método de imputação de dados que substituiu o dado faltante pela média do tempo anterior e posterior ao dado faltante. Este procedimento não pode ser realizado para os tempos iniciais e finais. A análise estatística não mostrou diferença significativa para nenhuma variável com ou sem imputação. Decidiu-se por utilizar os dados com imputação (TAB. 19 do APÊNDICE D).

Como parte dos pacientes recebeu tratamento anti-parasitário, para avaliar o impacto do tratamento nos resultados, a variável tratamento (presente ou ausente) foi considerada como fator de variação independente, assim como a interação entre tempo e tratamento. Os resultados indicaram que o tempo é um fator estatisticamente significativo, e que tanto o fator tratamento quanto a interação entre tempo e tratamento não foram estatisticamente significantes. Assim, decidiu-se por utilizar os

dados sem a variável tratamento, considerando todos os pacientes como um único grupo (TAB. 18 e GRAF. 15 a 18, APÊNDICE D).

4.9 Pesquisa e Normalização Bibliográfica

A pesquisa bibliográfica foi realizada a partir de consulta à base de dados *Medline*, compilada pela *National Library of Medicine*, dos Estados Unidos da América, disponível na internet e do LILACS (literatura latino-americana e do Caribe em Ciências da Saúde). Utilizando-se de estratégias de busca a partir de palavras chave (toxoplasmose/diagnóstico, toxoplasmose/imunologia, *T. gondii*/diagnóstico, toxoplasmose/fase aguda, toxoplasmose/citometria de fluxo, toxoplasmose/subclasses de IgG, toxoplasmose congênita), foram procurados artigos indexados nas áreas de interesse, dos anos de 1990 até 2009. Outros artigos citados a partir dos primeiros e referências importantes foram obtidas em livros especializados, teses e livros de resumos de eventos científicos. Foram incluídas publicações nos idiomas português, espanhol, italiano e inglês. A estrutura da tese seguiu as orientações do “Manual para normalização de publicações técnico-científicas” (França & Vasconcellos, 2008). As referências foram organizadas e citadas de acordo com o *International Committee of Medical Journal* (ICMJR, 2005).

4.10 Considerações Éticas

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da UFES em reunião ordinária no dia 30/03/2005 (ANEXO A). Todos os voluntários ou seus representantes legais assinaram o termo de consentimento pós-informação, antes do início do estudo (APÊNDICE A). Os pacientes e/ou responsáveis foram entrevistados e esclarecidos sobre os objetivos da pesquisa, mediante leitura do termo de consentimento e esclarecimento de dúvidas. Os pacientes só foram incluídos na pesquisa após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A). Os dados obtidos foram utilizados exclusivamente para os fins da pesquisa, e a identidade dos pacientes foi mantida em sigilo total. Este estudo trouxe risco mínimo para o paciente, relacionado à coleta de sangue por punção venosa. Por outro lado, os pacientes tiveram o benefício de acesso fácil ao serviço de saúde e acompanhamento médico durante o período de seguimento de 12 meses.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

A idade dos pacientes variou de 9 a 65 anos (média de 37 anos). Treze eram do sexo masculino e 18 do sexo feminino. Vinte e seis (83,9%) indivíduos eram procedentes de municípios que compõem a Região Metropolitana da Grande Vitória, 4 de municípios do interior do estado e 1 do sul do estado da Bahia.

As principais características e sintomas clínicos dos 31 pacientes com toxoplasmose aguda podem ser vistas na Tabela 3.

TABELA 03- Características clínicas dos 31 pacientes com infecção aguda por *T. gondii*, UFES, 2005-2008

Características	Frequência (%)
Sexo	
Masculino	13 (42,0)
Feminino	18 (58,0)
Tratamento	
Sim	12 (38,7)
Não	19 (61,3)
Fundoscopia	
Normal	29 (93,5)
Alterada	2 (6,5)
Sinais e Sintomas	Frequência (%)
Adenomegalia	31 (100)
Febre	28 (90,3)
Adinamia/ Mal estar	21 (67,7)
Cefaléia	17 (54,8)
Mialgia	13 (41,9)
Perda de peso	7 (22,6)
Inapetência	4 (12,9)
Dor de garganta	4 (12,9)
Sudorese	2 (6,5)
Rash Cutâneo	2 (6,5)

O aparecimento da adenomegalia, relatada por todos os pacientes, ocorreu 5 a 14 dias após o início dos sintomas. A adinamia observada em cerca de dois terços dos pacientes foi uma queixa que persistiu por vários meses, chegando a incomodar a vida cotidiana de vários deles.

Dentre os pacientes estudados, um casal relatou viagem de 20 dias, concluída uma semana antes do início do adoecimento. Os sintomas iniciaram-se com 3 dias de intervalo entre eles.

Todos os pacientes foram submetidos à avaliação oftalmológica. Dois deles (6,5%) apresentaram anormalidade ao exame de fundo de olho, um dos quais era assintomático.

Três pacientes necessitaram internação hospitalar no início do quadro, quando ainda não havia sido feito o diagnóstico da doença. Em dois deles chamava atenção a queda do estado geral, mal estar e febre, enquanto no terceiro caso o quadro clínico era de cefaléia acentuada, acompanhada de febre, com suspeita de meningite.

Doze pacientes (38,7%) receberam tratamento específico, por período que variou de 2 a 6 semanas. O esquema mais utilizado foi sulfadiazina e pirimetamina (8 casos). Outros antimicrobianos prescritos foram sulfametoxazol/ trimetoprin, clindamicina e claritromicina. Corticoterapia foi associada nos dois casos de coriorretinite.

Nenhum paciente apresentou imunocomprometimento. Ao final dos 12 meses de acompanhamento não foram apresentados problemas médicos.

Os resultados dos testes sorológicos dos 31 pacientes serão apresentados a seguir.

5.1 Correlações dos resultados de IgG, IgM e avidéz de IgG entre as diferentes técnicas

A Tabela 4 mostra a comparação dos testes para anticorpos IgG anti- *T. gondii* obtidos pelas técnicas ELISA, ELFA, IFI e CF, onde fica evidenciada correlação significativa somente para ELISA e ELFA no primeiro mês; ELISA e CF no primeiro mês; ELFA e IFI nos meses 4, 6 e 8; ELFA e CF nos meses 2 e 6 em diante.

TABELA 04- Correlação de Pearson (e respectivos p-valores) dos resultados dos testes para anticorpos IgG anti-*T. gondii* obtidos pelas técnicas ELISA, ELFA, IFI e CF

IgG		Mês1	Mês2	Mês3	Mês4	Mês6	Mês8	Mês10	Mês12
ELISA	Elfa	0,5587	0,2307	0,0931	-0,1341	0,0446	0,0265	-0,0597	-0,1526
	p-valor	0,0056	0,2286	0,6244	0,4797	0,8152	0,8896	0,7542	0,4207
	IFI	0,2933	0,3068	0,1861	0,0039	-0,0600	-0,0696	-0,0017	0,0539
	p-valor	0,1852	0,1196	0,3337	0,9835	0,7573	0,7099	0,9932	0,7732
	CF	0,5870	0,1487	-0,0825	-0,1545	0,2973	0,2492	0,2540	0,1723
	p-valor	0,0026	0,4500	0,6590	0,4067	0,1043	0,1764	0,1680	0,3541
ELFA	IFI	0,0162	0,0719	0,3346	0,5046	0,4437	0,4591	0,3091	0,2654
	p-valor	0,9429	0,7217	0,0818	0,0052	0,0180	0,0107	0,1095	0,1564
	CF	0,5290	0,2638	0,1152	0,2797	0,4218	0,5132	0,4701	0,5053
	p-valor	0,0079	0,1749	0,5445	0,1344	0,0203	0,0037	0,0088	0,0044
IFI	CF	0,0376	0,0578	-0,2737	-0,2682	0,2016	0,2781	0,2813	0,1428
	p-valor	0,8615	0,7746	0,1507	0,1519	0,2944	0,1298	0,1394	0,4436

ELISA, ensaio imunoenzimático; ELFA, ensaio imunoenzimático fluorimétrico; IFI, imunofluorescência indireta, CF, citometria de fluxo

A tabela 05 apresenta a correlação entre os resultados dos testes IgM obtidos pelas técnicas ELISA, ELFA, IFI e CF onde fica evidenciada a boa correlação entre os resultados obtidos por: a) ELISA e ELFA para todos os meses; b) ELISA e CF entre os meses 3 e 8 e c) ELFA e CF do mês dois em diante. Não houve correlação significativa entre as medidas de IgG e IgM obtidas por IFI e os outros testes utilizados (TAB. 5).

TABELA 05- Correlação de Pearson (e respectivos p-valores) entre os resultados dos testes para anticorpos IgM anti-*T. gondii* obtidos pelas técnicas ELISA, ELFA, IFI e CF

IgM		Mês1	Mês2	Mês3	Mês4	Mês6	Mês8	Mês10	Mês12
ELISA	ELFA	0,6082	0,5539	0,6486	0,6682	0,7359	0,7117	0,5702	0,7445
	p-valor	0,0021	0,0022	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000	0,0008	0,0000
	IFI	0,1959	0,1110	0,1142	0,0646	0,0716	0,0127	0,0122	-0,1278
	p-valor	0,3703	0,5664	0,5409	0,7301	0,7019	0,9459	0,9479	0,4932
	CF	0,1496	0,2608	0,3987	0,5124	0,6084	0,5271	0,3116	0,2840
	p-valor	0,4852	0,1718	0,0263	0,0032	0,0003	0,0023	0,0880	0,1215
ELFA	IFI	-0,0210	-0,1028	0,2383	0,3186	0,1852	0,1533	0,0664	0,0706
	p-valor	0,9241	0,6026	0,1968	0,0807	0,3185	0,4104	0,7227	0,7158
	CF	0,3629	0,5576	0,6996	0,7289	0,7233	0,6668	0,5828	0,5067
	p-valor	0,0814	0,0020	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0006	0,0050
IFI	CF	0,1711	0,1275	0,2578	0,2405	0,1543	0,1973	0,3255	0,1904
	p-valor	0,4134	0,5020	0,1614	0,1925	0,4073	0,2874	0,0740	0,3049

ELISA, ensaio imunoenzimático; ELFA, ensaio imunoenzimático fluorimétrico; IFI, imunofluorescência indireta, CF, citometria de fluxo

A Tabela 06 apresenta a comparação dos testes de avides de anticorpos IgG obtidos pelas técnicas ELFA e CF, onde fica evidenciada a baixa correlação entre os resultados.

TABELA 06- Correlação de Pearson (e respectivos p-valores) entre os resultados dos testes de avides de IgG obtidos pelas técnicas ELFA e CF

Avides IgG		Mês1	Mês2	Mês3	Mês4	Mês6	Mês8	Mês10	Mês12
ELFA	CF	-0,1204	0,4233	0,2064	0,2681	0,2151	-0,2366	0,2558	0,1440
	p-valor	0,6342	0,0221	0,2738	0,1520	0,2536	0,2081	0,1724	0,4570

ELFA, ensaio imunoenzimático fluorimétrico; CF, citometria de fluxo

5.2 Dinâmica dos anticorpos IgG, IgM, IgA, Avides de IgG e Subclasses de IgG durante o período de doze meses do estudo longitudinal

As Tabelas 21 a 25 (APÊNDICE D) mostram que as variações das dosagens de anticorpos IgG, IgM, IgA, avides de IgG e subclasses de IgG apresentaram intervalos pequenos. Portanto, as análises comparativas para estudo da dinâmica de anticorpos foram realizadas a partir das médias.

Aplicou-se o teste ANOVA para medidas repetidas na avaliação dos anticorpos, considerando o tempo como variável dependente, e o teste de Tukey para os tempos individualmente. A análise comparativa feita com o teste ANOVA indicou que o tempo foi um fator estatisticamente significativo para todos os testes utilizados, à exceção de IgG4 (TAB. 7).

TABELA 07- Resultado do teste ANOVA para os testes sorológicos anti *T. gondii* com relação ao tempo de infecção

Ensaio	Variáveis	F	p-valor
IgG	ELISA	22,35	0,0001
	ELFA	12,68	0,0001
	IFI	2,31	0,0299
	CF	9,88	< 0,0001
IgM	ELISA	82,35	0,0001
	ELFA	99,42	0,0001
	IFI	2,30	0,0299
	CF	104,48	0,0001
IgA	ELISA	8,99	0,0001
Avidez IgG	ELFA	38,53	0,0001
	CF	54,61	0,0001
Subclasses IgG	IgG1 CF	4,78	0,0001
	IgG2 CF	2,98	0,0056
	IgG3 CF	10,87	< 0,0001
	IgG4 CF	1,70	0,1119

ELISA, ensaio imunoenzimático; ELFA, ensaio imunoenzimático fluorimétrico; IFI, imunofluorescência indireta, CF, citometria de fluxo

5.2.1 Dinâmica dos anticorpos da classe IgG anti-*T. gondii*

A análise comparativa mês a mês dos resultados da classe IgG obtidos pelas técnicas de ELISA, ELFA, IFI e CF foi realizada pelo teste de Tukey, e pode ser observada na Tabela 26 (APÊNDICE D).

Para o teste ELISA-IgG houve diferença estatística entre o primeiro e os demais meses; o segundo mês é diferente do quarto em diante, e a partir do terceiro mês não houve diferença estatística. Os dados de ELFA-IgG apontam que os dois primeiros meses não apresentam diferença entre si, sendo diferentes dos demais; do terceiro mês em diante também não houve diferença estatística. Os resultados de IFI-IgG não foram estatisticamente diferentes para nenhum dos meses analisados. As medidas de IgG obtidas por CF conseguiram separar somente o primeiro mês dos demais.

As médias das dosagens quantitativas de IgG anti-*T. gondii* por diferentes técnicas ao longo de 12 meses de seguimento sorológico são mostradas no Gráfico 1.

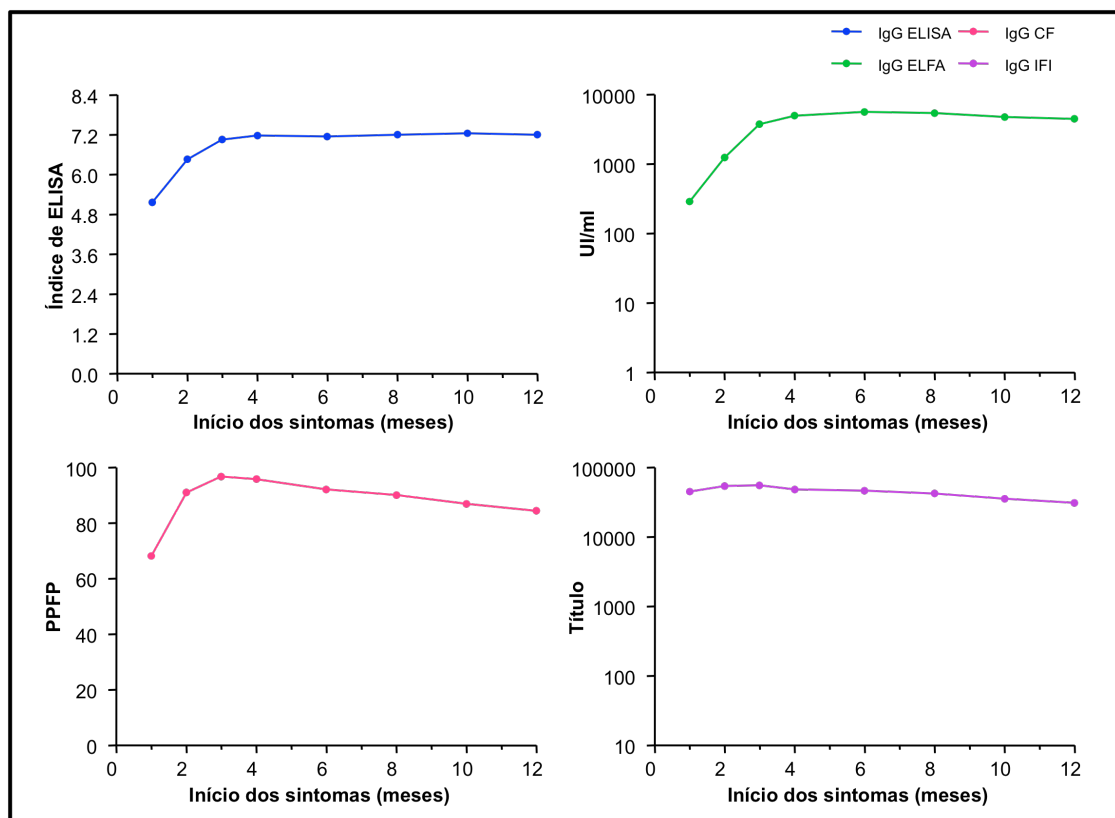


GRÁFICO 1- Médias das dosagens de IgG obtidas por ELISA, ELFA, IFI e CF
 IgG ELISA- Resultado expresso em índice; IgG ELFA- Resultado expresso em UI/1000
 IgG IFI- Resultado expresso em diluição/10.000; IgG CF- Resultado em PFPF/10

5.2.2 Dinâmica dos anticorpos da classe IgM anti-*T. gondii*

A análise comparativa feita com o teste de ANOVA indica que o tempo é um fator estatisticamente significativo para todas as técnicas utilizadas para dosagem de IgM (TAB. 7).

Os valores mínimo e máximo, média e desvio padrão, limite inferior e superior por tempo de infecção para os anticorpos IgM, medidos pelas quatro técnicas utilizadas podem ser visto na Tabela 22 (APÊNDICE D).

A análise comparativa mês a mês (teste de Tukey) dos resultados de IgM medidos por ELISA, ELFA, IFI e CF pode ser vista na Tabela 27 (APÊNDICE D). Os resultados dos testes ELISA, ELFA e CF para IgM anti-*T. gondii* dos dois primeiros meses foram estatisticamente diferentes do terceiro mês em diante mas não entre si; o terceiro e quarto meses foram estatisticamente diferentes entre si e também entre o restante dos meses. Do sexto mês em diante ELISA e ELFA só mostraram diferença comparativa com o mês doze, enquanto a CF mostrou ainda resultados diferentes para o sexto e oitavo com relação ao meses décimo e décimo segundo. Os resultados de IFI-IgM só

foram estatisticamente diferentes quando comparamos o primeiro mês com o sexto mês em diante e o segundo mês com o décimo e o décimo segundo.

O Gráfico 2 mostra a média das dosagens quantitativas de IgM anti-*T. gondii* obtida pelas diferentes técnicas ao longo de 12 meses de seguimento sorológico.

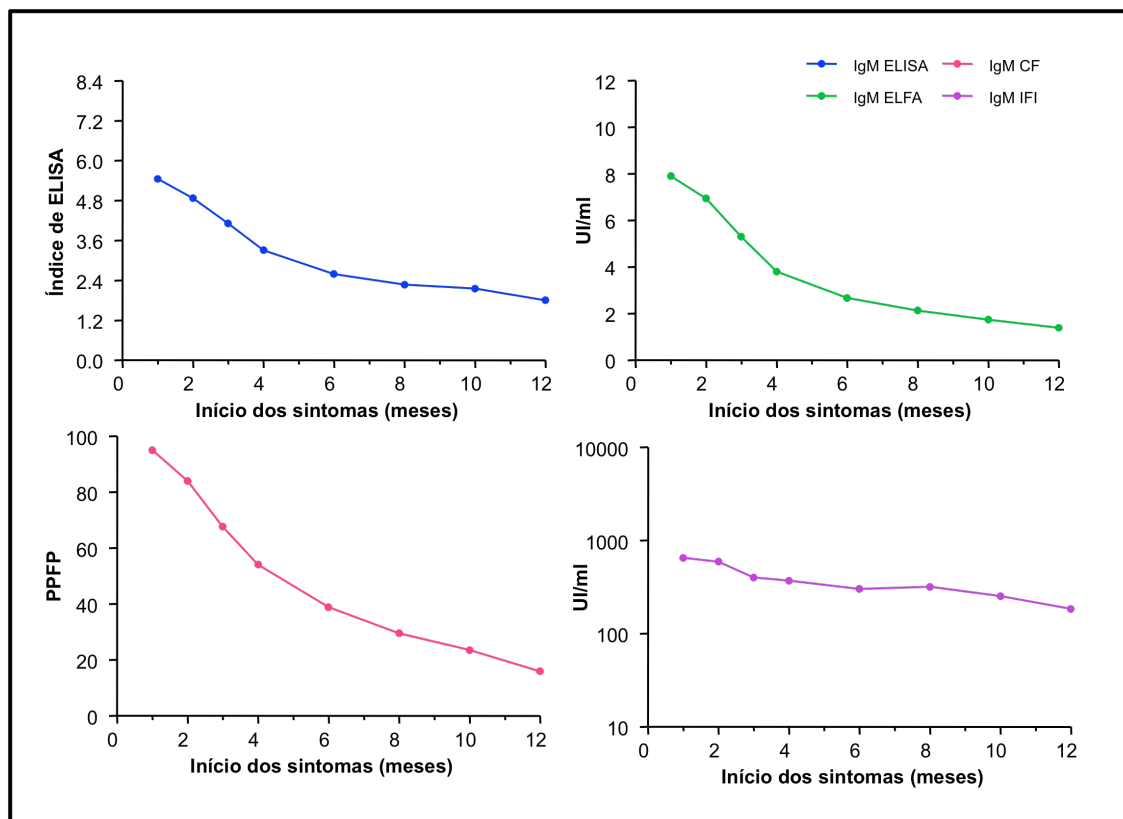


GRÁFICO 2- Médias das dosagens quantitativas de IgM anti-*T. gondii* obtidas por ELISA, ELFA, IFI e CF

IgM ELISA, resultado expresso em índice, IgM ELFA, resultado expresso em UI/ml; IgM IFI, resultado da diluição dividido por 100; IgM CF- resultado expresso em PPFP/ 10

5.2.3 Dinâmica dos anticorpos da classe IgA anti-*T. gondii*

A Tabela 7 mostra os resultados da análise comparativa feita com o teste ANOVA para os dados de ELISA-IgA, que indicam ser o tempo um fator estatisticamente significativo.

Os valores mínimo e máximo, média e desvio padrão, limite inferior e superior com 95% de confiança por tempo de infecção para os anticorpos IgA, medidos pela técnica de ELISA, podem ser vistos na Tabela 23 (APÊNDICE D).

A Tabela 28 (APÊNDICE D) mostra a análise dos resultados de ELISA-IgA comparados mês a mês, obtida com o teste de Tukey. Os resultados indicam que o

primeiro mês foi igual ao segundo e terceiro meses e estatisticamente diferente dos demais; o segundo não se diferenciou estatisticamente do terceiro ao oitavo mas sim do décimo em diante.

A IgA foi detectada em 87,5% dos pacientes (21/24) no mês 1, 76% (19/25) no mês 2, 60% (18/30) no mês 3, 60,7% (17/28) mês 4, 41,3% (12/29) mês 6, 37,9% (11/29) mês 8, 25% (7/28) mês 10, (33,5%) 10/30 aos 12 meses.

O Gráfico 3 apresenta as média das dosagens quantitativas de IgA obtidas pela técnica ELISA.

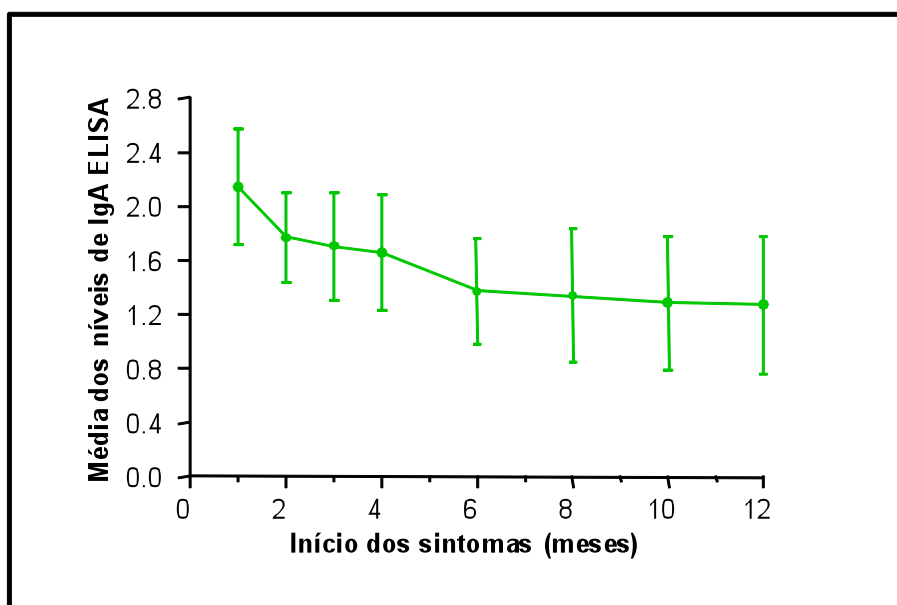


GRÁFICO 3-Médias das dosagens quantitativas de IgA anti-*T. gondii* obtidas por ELISA

Resultado de média do ELISA-IgA expresso em índice

5.2.4. Dinâmica de avidéz dos anticorpos IgG anti-*T. gondii*

A análise comparativa feita com o teste ANOVA indica que o tempo foi um fator estatisticamente significativo para os resultados de avidéz de IgG obtidos pelas técnicas ELFA e CF ao longo de 12 meses de seguimento após infecção aguda por *T. gondii* (TAB. 7).

Os valores mínimo e máximo, média e desvio padrão, limite inferior e superior por tempo de infecção para a avidéz de anticorpos IgG medidas por ELFA e CF podem ser visto na Tabela 24 (APÊNDICE D).

O teste de avidéz de IgG ELFA foi realizado a partir do 1^o mês para 16 pacientes. Os quinze pacientes restantes não tiveram a amostra deste mês analisada porque os resultados de IgG foram negativos ou *borderline* (8 pacientes) ou a 1^a amostra não era existente ou insuficiente (7 pacientes).

A Tabela 29 (APÊNDICE D) apresenta a análise comparativa mês a mês (teste de Tukey) dos resultados de avidéz de IgG determinados pelas técnicas de ELFA e CF. A análise comparativa destes resultados para a metodologia ELFA mostraram que os dois primeiros meses foram estatisticamente diferentes do quarto mês em diante mas não entre si e entre o terceiro mês; o quarto mês foi estatisticamente diferente do oitavo mês em diante; o sexto mês foi estatisticamente diferente do décimo em diante. Do oitavo mês em diante não houve diferença estatística entre as médias das dosagens de avidéz de IgG.

A média das dosagens quantitativas de avidéz de IgG obtidas pelas duas diferentes técnicas são ilustradas no Gráfico 4.

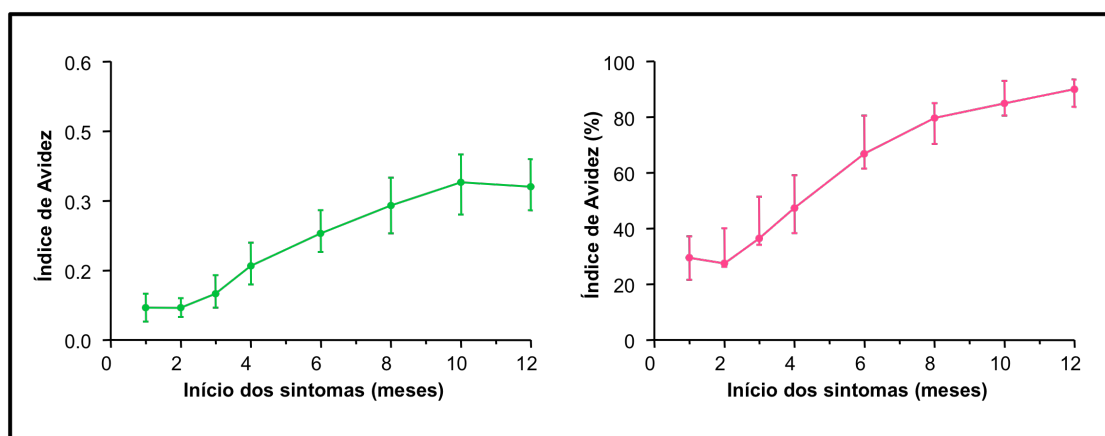


GRÁFICO 4- Média das medidas de avidéz de IgG obtidas por ELFA e CF
Resultado de avidéz CF expresso em índice/100

5.3 Avaliação da técnica de citometria de fluxo no estudo das subclasses de IgG no diagnóstico temporal da infecção por *T. gondii*.

Os resultados das medidas das subclasses de IgG anti-*T. gondii* obtidas por citometria de fluxo podem ser vistas na Tabela 25 (APÊNDICE D).

Os resultados do teste ANOVA para medidas repetidas das subclasses de IgG indicam que o tempo é um fator estatisticamente significativo, à exceção de IgG4 (TAB. 7).

A Tabela 30 (APÊNDICE D) apresenta a análise comparativa mês a mês obtida com o teste de Tukey para os resultados de subclasses de IgG anti-*T. gondii* determinadas pela técnica de CF. A análise comparativa destes resultados mostrou que a IgG1 apresenta diferença estatisticamente significativa quando comparamos o primeiro mês com os demais; a IgG2 mostra diferença significativa quando comparamos os segundo e terceiro meses com o décimo segundo. Dentre as subclasses, a IgG3 foi a que conseguiu distinguir melhor o tempo de infecção, apresentando níveis descendentes. O primeiro e sexto meses foram estatisticamente diferentes do décimo segundo e o segundo, terceiro e quarto meses estatisticamente diferentes do oitavo em diante.

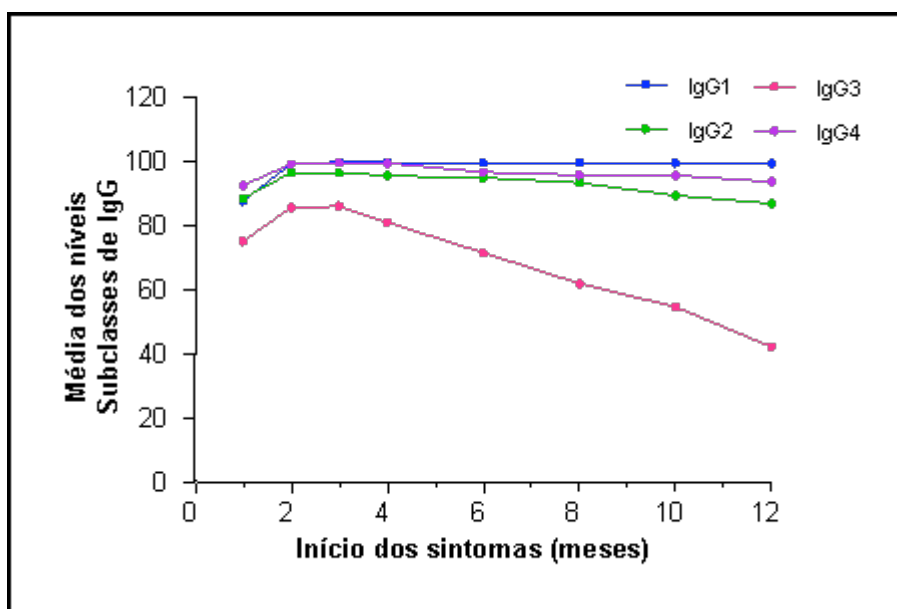


GRÁFICO 5- Média das dosagens quantitativas de subclasses de IgG anti-*T. gondii* obtidas pela técnica de CF.

Resultado expresso em PFPF

5.4 Desempenho de cada teste na identificação de infecção aguda

5.4.1 Análise pela curva ROC

Quinze testes (Tabela 01) foram realizados em soros de 31 pacientes seguidos durante um ano. As amostras de soro correspondiam a 8 períodos de tempo (meses 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 e 12 meses), considerando o intervalo de tempo decorrido entre o início dos sintomas e a coleta da amostra sanguínea. Essas amostras foram agrupadas em 3 períodos: Grupo 1- meses 1, 2 e 3; Grupo 2- meses 4, 6 e 8; e Grupo 3- meses 10 e 12.

O Gráfico 6 mostra as curvas ROC utilizadas para analisar a sensibilidade e a especificidade diagnósticas dos testes para IgG anti-*T. gondii* para separar os pacientes com infecção aguda e convalescente precoce (G1 x G2); e infecção aguda de convalescente tardia. Os resultados mostraram que sensibilidade e especificidade diagnósticas dos testes de anticorpos IgG não foram significantes para as metodologias empregadas para separar os grupos citados, à exceção da CF para diferenciar infecção aguda da convalescente tardia (TAB. 8).

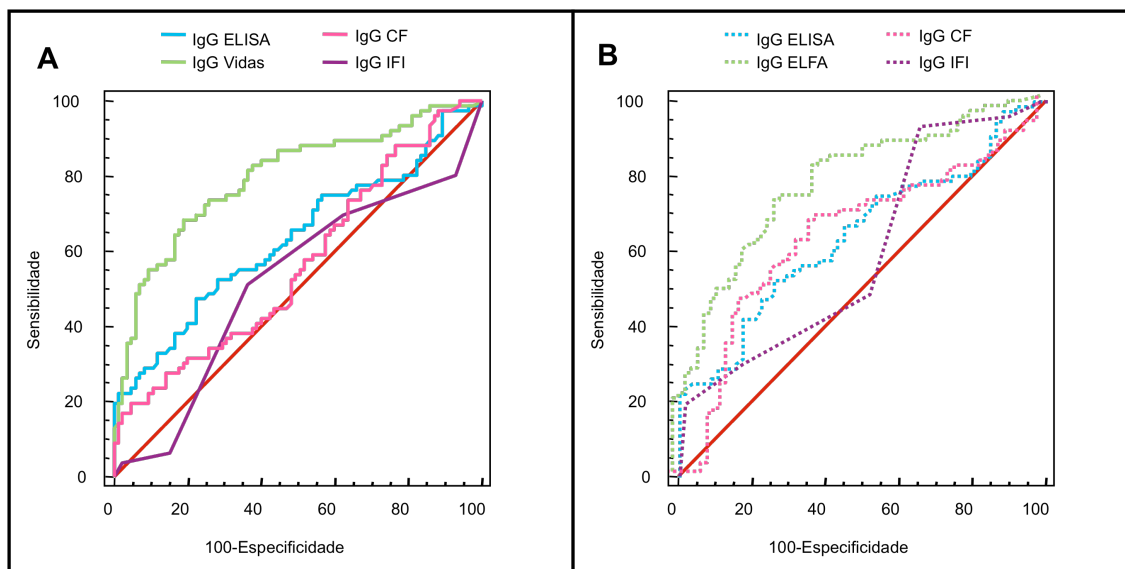


GRÁFICO 6- Curva ROC dos resultados de anticorpos IgG anti-*T. gondii* obtidos com diferentes técnicas em soros de pacientes com a) infecção aguda e convalescente precoce (A) e b) infecção aguda e convalescente tardia (B).

A Tabela 31 (APÊNDICE D) mostra a análise dos resultados da curva ROC dos testes para IgG anti-*T. gondii* por todas as técnicas, retirando-se os meses 3 do Grupo 1 e 8 do Grupo 2. Não houve diferenças significantes entre os grupos, assim como o observado no Gráfico 6 com grupos originais.

TABELA 8 - Resultado do desempenho dos diversos testes pela curva ROC

TESTES	G1 x G2		G1 x G3		
	ASC	p-valor	ASC	p-valor	
IgG ELISA, ensaio	ELISA	0,403846154	0,0511	0,39952957	0,0715
	ELFA	0,217948718	<0,0001	0,230510753	<0,0001
	IFI	0,46980976	0,5402	0,579133065	0,1558
	CF	0,467845327	0,5142	0,614583333	0,0399
IgM	ELISA	0,844602978	<0,0001	0,934475806	<0,0001
	ELFA	0,860008271	<0,0001	0,960685484	<0,0001
	IFI	0,569582299	0,1581	0,671202957	0,0021
	CF	0,815756824	<0,0001	0,938508065	<0,0001
IgA	ELISA	0,685690653	0,0002	0,783266129	<0,0001
Subclasses	IgG1 CF	0,44210091	0,2401	0,483534946	0,7677
	IgG2 CF	0,514681555	0,7658	0,670698925	0,0022
	IgG3 CF	0,571133168	0,1490	0,705141129	0,0002
	IgG4 CF	0,524710505	0,6162	0,619623656	0,0319
Avidez IgG	ELFA	0,911488301	<0,0001	0,981134878	<0,0001
Avidez IgG	CF	0,864499425	<0,0001	0,995246583	<0,0001

imunoenzimático; ELFA, ensaio imunoenzimático fluorimétrico; IFI, imunofluorescência indireta, CF, citometria de fluxo; G1, Infecção aguda; G2, Infecção convalescente precoce; G3, Infecção convalescente tardia; AUC, área sob a curva

A análise de sensibilidade e especificidade diagnósticas dos testes para IgM, IgA, avides de IgG e subclasses de IgG anti-*T. gondii* utilizando a curva ROC, para os pacientes do Grupo 1 x Grupo 2 e Grupo 1 x Grupo 3 mostraram significância estatística (à exceção da IFI para G1 x G2) ($p < 0,05$ e $AUC > 0,5$) e podem ser vistas nos Gráficos de 7 a 10 e Tabelas de 9 a 12.

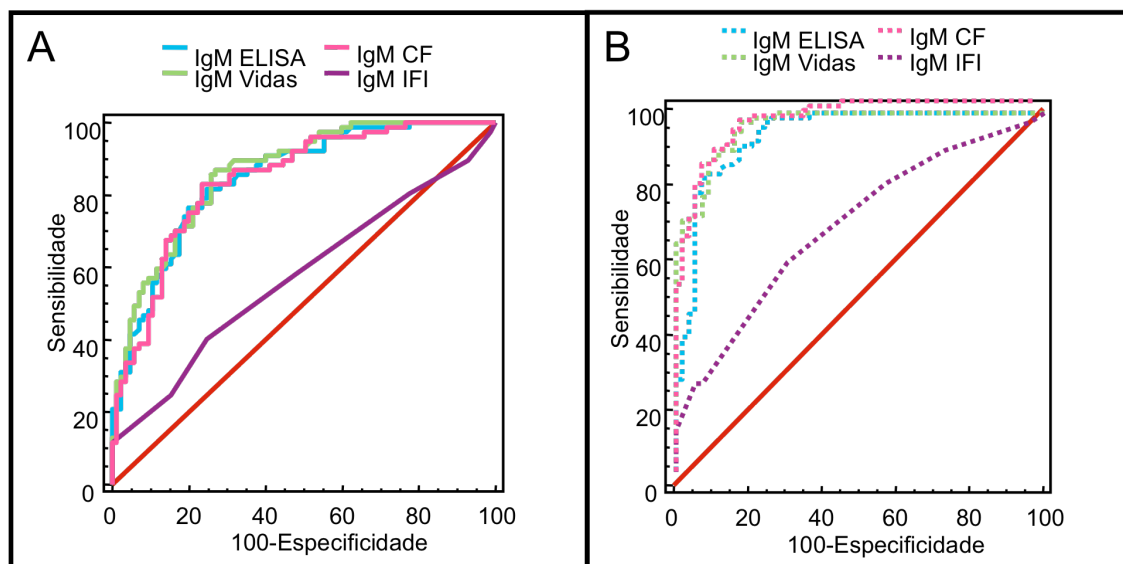


GRÁFICO 7- Curva ROC dos resultados de anticorpos IgM anti-*T. gondii* obtidos com diferentes técnicas em soros de pacientes com infecção aguda e convalescente precoce (A); e infecção aguda e convalescente tardia (B)

TABELA 09- Valores da curva ROC para anticorpos IgM anti-*T. gondii*, comparando Grupo 1 em relação aos Grupo 2 e Grupo 3

TESTE	GRUPOS	PONTO CORTE	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE
			(CI 95%)	CI 95%
ELISA	G1 X G2	>3,40	81,8 (71,4- 89,7)	75,3 (64,7- 84,0)
	G1 X G3	> 3,36	81,8 (71,4- 89,7)	93,1 (83,3- 98,0)
ELFA	G1 X G2	> 3,72	87,0 (77,4- 93,6)	72,9 (62,2- 82,0)
	G1 X G3	> 2,37	97,4 (90,9- 99,6)	82,1 (69,6- 91,1)
IFI	G1 X G2*	> 256	39,7 (28,8- 51,5)	75,3 (64,7- 84,0)
	G1 X G3	> 128	57,7 (46,0- 68,8)	70,7 (57,3- 81,9)
CF	G1 X G2	> 63,51	81,0 (70,6- 89,0)	76,5 (66,0- 85,0)
	G1 X G3	> 33,43	93,7 (85,8- 97,9)	82,8 (70,6- 91,4)

ELISA, ensaio imunoenzimático; ELFA, ensaio imunoenzimático fluorimétrico; IFI, imunofluorescência indireta, CF, citometria de fluxo; * Ausência de significância estatística, G1, Infecção aguda; G2, Infecção convalescente precoce; G3, Infecção convalescente tardia

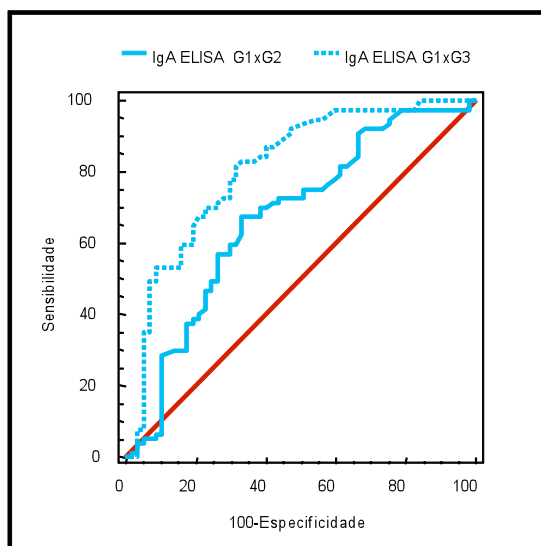


GRÁFICO 8- Curva ROC comparando resultados de anticorpos IgA *anti-T. gondii* obtidos por ELISA em soros de pacientes com infecção aguda e convalescente precoce (G1 x G2); e infecção aguda e convalescente tardia (G1 x G3)

TABELA 10- Pontos de corte das curvas ROC dos resultados de IgA *anti-T. gondii* do grupo agudo (G1) em relação aos demais (G2 e G3)

TESTE	GRUPOS	PONTO CORTE	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE
			CI 95%	CI95%
IgA ELISA	G1 x G2	> 1,40	67,5 (55,9- 77,8)	69,4 (58,5- 78,9)
	G1 X G3	> 1,09	81,8 (71,4- 89,7)	68,4 (54,8- 80,1)

ELISA, ensaio imunoenzimático.

TABELA 11- Pontos de corte das curvas ROC dos resultados de avidéz de IgG *anti-T. gondii* pelas metodologias ELFA e CF do grupo agudo (G1) em relação aos demais (G2 e G3)

TESTE	GRUPOS	PONTO CORTE	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE
			CI 95%	CI 95%
ELFA	G1 x G2	≤ 0,086	75,4 (63,5- 84,9)	91,8 (83,8- 96,6)
	G1 x G3	≤ 0,189	97,1 (89,9- 99,6)	89,5 (78,5- 96,0)
CF	G1 x G2	≤ 53,89	93,0 (84,3- 97,6)	68,3 (57,1- 78,1)
	G1 x G3	≤ 58,45	94,4 (86,2- 98,4)	100,0 (93,3-100,0)

ELFA, ensaio imunoenzimático fluorimétrico; CF, citometria de fluxo

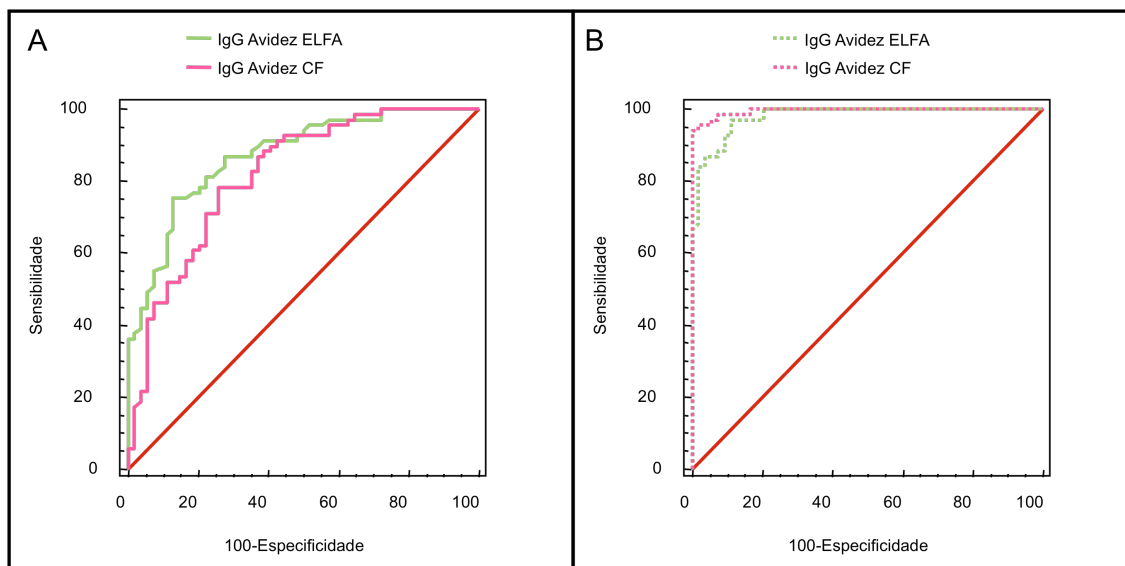


GRÁFICO 9- Curva ROC dos resultados de avidéz de IgG *anti-T. gondii* obtidos por ELFA e CF em soros de pacientes com (A) infecção aguda e convalescente precoce (G1 x G2) e (B) infecção aguda e convalescente tardia (G1 x G3)

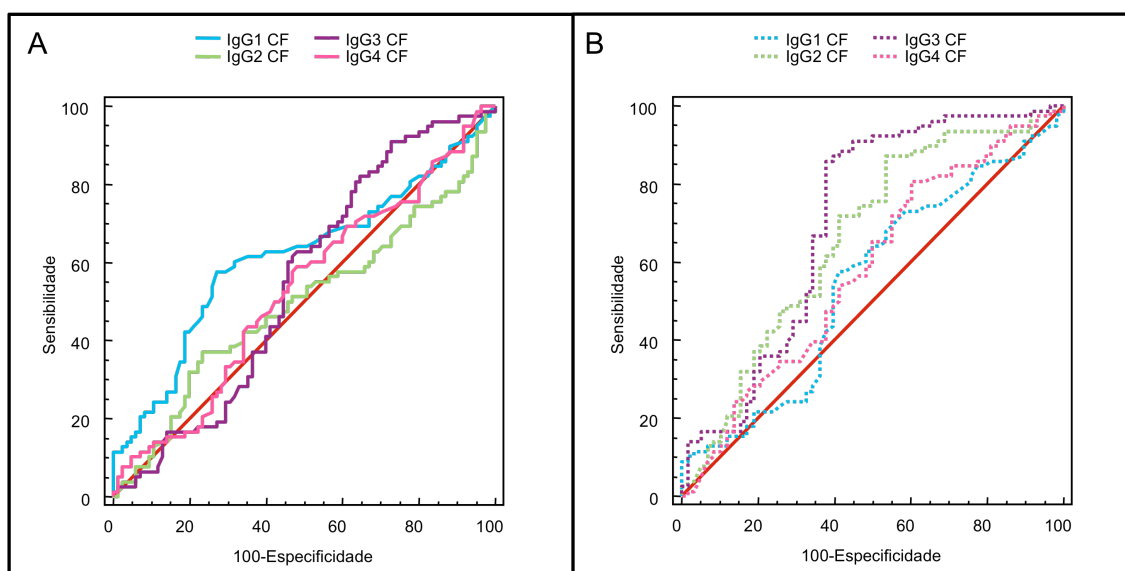


GRÁFICO 10- Curva ROC dos resultados de subclasses IgG *anti-T. gondii* por CF em soros de pacientes com (A) infecção aguda e convalescente precoce (G1 x G2) e (B) infecção aguda e convalescente tardia (G1 x G3)

TABELA 12- Pontos de corte das curvas ROC dos resultados de subclasses de IgG2 e IgG3 pela metodologia de CF dos pacientes com infecção aguda (G1) em relação aos pacientes com infecção convalescente precoce e tardia (G 2 e G3)

TESTE	GRUPOS	PONTO CORTE	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE
			CI 95%	CI 95%
IgG2 CF	G1 x G2*	> 99,39	36,7 (26,1- 48,3)	76,5 (66,0- 85,0)
	G1 x G3	> 93,02	87,3 (77,9- 93,7)	46,6 (33,3- 60,1)
IgG3 CF	G1 x G2	> 31,68	91,0 (82,4- 96,3)	27,1 (18,0- 37,8)
	G1 x G3	> 57,53	85,9 (76,2- 92,7)	62,1 (48,4- 74,5)

CF, Citometria de fluxo, * Ausência de significância estatística

5.5 Identificação da melhor combinação de testes que discrimina as fases da doença

5.5.1 Análise de desempenho da combinação de testes

As amostras de soro correspondiam a 8 períodos de tempo (meses 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 e 12), considerando o intervalo de tempo decorrido entre o início dos sintomas e a coleta da amostra sanguínea. Essas amostras foram agrupadas em 3 períodos: Grupo 1- meses 1, 2 e 3 (infecção aguda); Grupo 2- meses 4, 6 e 8 (infecção convalescente precoce); e Grupo 3- meses 10 e 12 (infecção convalescente tardia).

Pontos de corte para onze testes sorológicos foram escolhidos de acordo com a estratégia para distinguir a fase de infecção. Foram eleitos para esta análise os testes convencionais, tipicamente utilizados para o diagnóstico de infecção aguda (IgM, IgA por ELISA; IgM por IFI; e IgM e avidéz de IgG por ELFA), além daqueles desenvolvidos no presente estudo, realizados por citometria de fluxo (IgM, avidéz de IgG e subclasses de IgG). A Tabela 13 apresenta os onze testes, com os respectivos pontos de corte **diagnósticos de infecção pelo *T. Gondii***, preconizados pelos fabricantes dos testes comerciais (ELFA), laboratórios executores para os testes convencionais (ELISA, IFI) e para aqueles desenvolvidos neste estudo para CF; mostra ainda os pontos de corte, que chamamos de **ajustados para o diagnóstico de infecção aguda**, escolhidos para alguns destes testes, entre os valores que compõem a curva ROC. Tanto a escolha dos pontos de corte quanto a estratégia de análise da combinação de testes 2 a 2 para o diagnóstico de infecção aguda pelo *T. Gondii* seguiram os critérios definidos por Roberts *et al.* (2001).

TABELA 13- Pontos de corte diagnósticos para infecção por *T. gondii* e ajustados para o diagnóstico de infecção aguda por *T. gondii*

Testes	Ac	Princípio	Expressão	Pontos de corte					
				Preconizados para diagnóstico da infecção			Ajustados para diagnóstico de infecção aguda		
				Negativo	Duvidoso	Positivo	Negativo	Duvidoso	Positivo
Convencionais	IgM	ELISA	Índice	≤ 1,0	>1 ≤ 1,2	> 1,2	≤ 2,5	-	> 2,5
	IgM	ELFA	IU/ml	< 0,55	≥0,55 ≤0,65	> 0,65	≤ 2,4	-	> 2,4
	IgM	IFI	Título	< 64	-	≥ 64	-	-	-
	IgA	ELISA	Índice	≤ 1,0	>1 ≤ 1,2	> 1,2	-	-	-
	Avidéz	ELFA	Índice	≥3 ⁽¹⁾	≥0,2< 0,3	< 0,2 ⁽²⁾	≥2,5 ⁽¹⁾	0,15 < 0,25	< 0,15 ⁽²⁾
Testes	AC	Princípio	Expressão	Desenvolvidos para diagnóstico de doença			Desenvolvidos para diagnóstico de infecção aguda		
Desenvolvidos	IgM	CF	PPFP (%)	≤ 15	-	>15	≤ 32	-	>32
	IgG1	CF	PPFP (%)	≤ 10	-	> 10	-	-	-
	IgG2	CF	PPFP (%)	≤ 10	-	> 10	-	-	-
	IgG3	CF	PPFP (%)	≤ 5	-	> 5	≤ 35	-	> 35
	IgG4	CF	PPFP (%)	≤ 10	-	> 10	-	-	-
	Avidéz	CF	Percentual	≤ 60 ⁽¹⁾	-	> 60 ⁽²⁾	-	-	-

ELISA, ensaio imunoenzimático; ELFA, ensaio imunofluorimétrico; IFI, imunofluorescência indireta, CF, citometria de fluxo; IU/ml, unidades internacionais por mililitros; PPFP (%), percentual de parasitas fluorescentes positivos;⁽¹⁾, considerado como alta avidéz; ⁽²⁾, considerado como baixa avidéz

O Gráfico 11 apresenta os pontos de corte correspondentes ao mínimo de 95% de sensibilidade para os testes ELISA, ELFA e CF para anticorpos IgM. O teste IFI-IgM não permitiu distinguir as fases da doença.

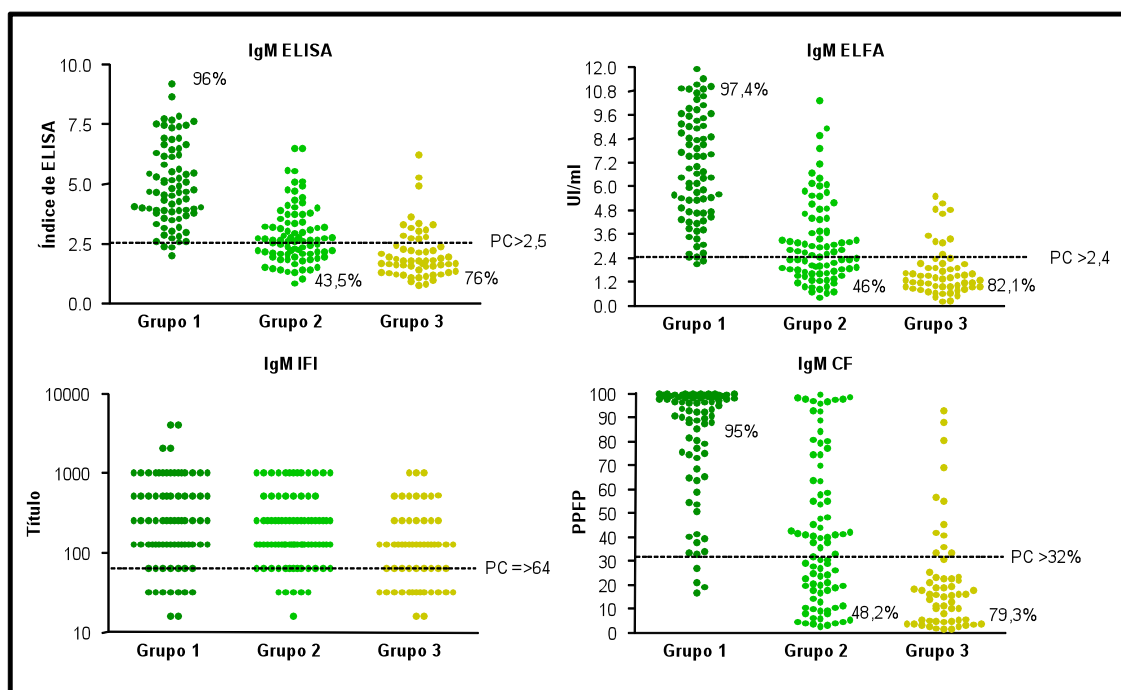


GRÁFICO 11- Pontos de corte correspondentes ao mínimo de 95% de sensibilidade para os testes IgM ELISA, IgM ELFA, IgM CF e IFI IgM

O Gráfico 12 apresenta o ponto de corte diagnóstico para o anticorpo da classe IgA por ELISA, recomendado pelo Laboratório de Imunologia da UFU.

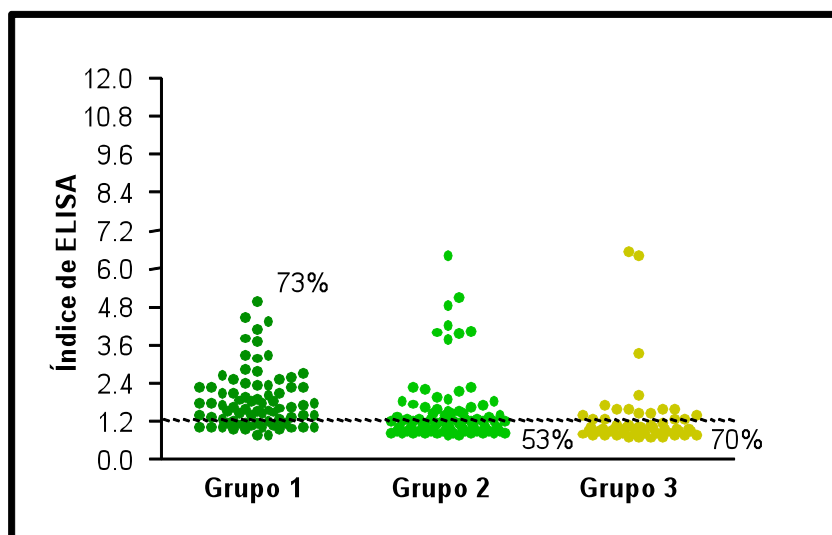


GRÁFICO 12- Ponto de corte diagnóstico para ELISA IgA anti- *T. gondii*

O Gráfico 13 apresenta os pontos de corte correspondentes ao mínimo de 95% de sensibilidade para os testes de avides de IgG anti-*T. gondii*.

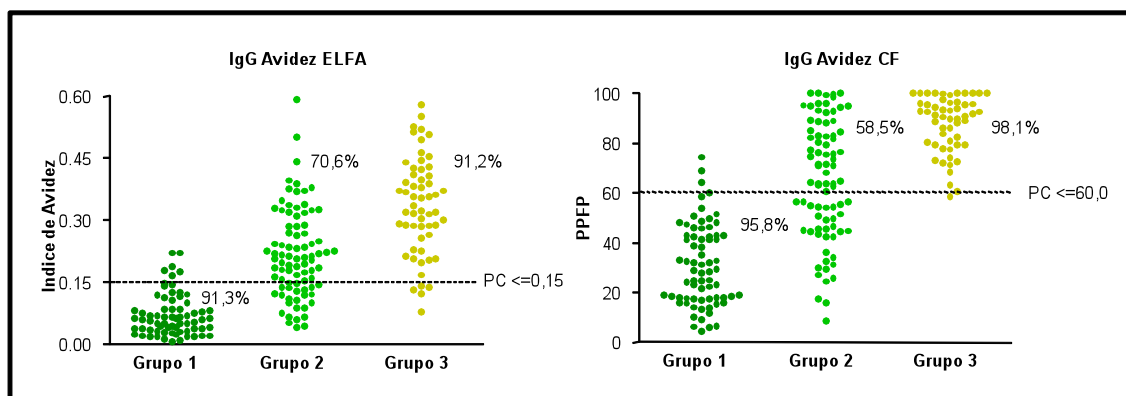


GRÁFICO 13- Pontos de corte correspondentes ao mínimo de 90% de sensibilidade para avides de IgG anti- *T. gondii* ELFA e CF

Os pontos de corte diagnósticos dos testes subclasses de IgG anti- *T. gondii* por citometria de fluxo estão apresentados, no Gráfico 14. A IgG3 permitiu escolha do ponto de corte ajustado para o diagnóstico de infecção aguda por *T. gondii*.

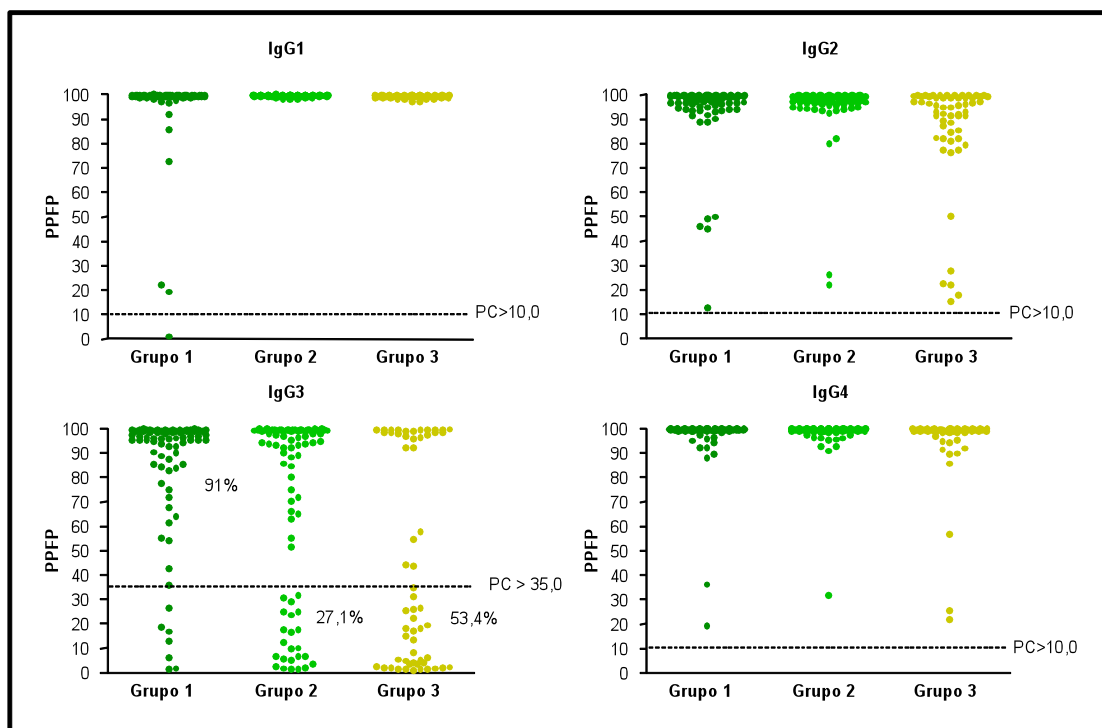


GRÁFICO 14- Pontos de corte diagnósticos e/ou ajustados dos testes para subclasses de IgG anti- *T. gondii* por citometria de fluxo

A Tabela 14 apresenta a sensibilidade (% de positivos no grupo 1), especificidade (% de negativos no grupo 3) e os falsos positivos (positivos no grupo 3) dos testes anti *T. gondii* analisados.

TABELA 14- Análise de desempenho de 11 testes sorológicos anti- *T. gondii* segundo estratégia proposta por Roberts *et al.* (2001)

Princípio	Anticorpo	Ponto de Corte	Categoria do teste*	Grupo 1: agudo (meses 1,2,3)				Grupo 2: convalescente precoce (meses 4,6,8)				Grupo 3: convalescente tardio (meses 10, 12)			
				n	pos	duv	neg	n	pos	duv	neg	n	pos	duv	neg
ELISA	IgM	Diagnóstico	a	80	100	0	0	88	96,6	1,1	2,3	62	85,5	8,1	6,5
		Ajustado	a,b	80	96,3	0	3,8	88	54,5	0	45,5	62	24,2	0	75,8
ELFA	IgM	Diagnóstico	a	79	100	0	0	88	96,6	1,1	2,3	60	88,3	5	6,7
		Ajustado	a,b	79	97,5	0	2,5	88	52,3	0	47,7	60	18,3	0	81,7
CF	IgM	Diagnóstico	a	83	100	0	0	88	75	0	25	62	53,2	0	46,8
		Ajustado	a,b	83	95,2	0	4,8	88	51,1	0	48,9	62	21	0	79
IFI	IgM	Diagnóstico	-	86	89,5	0	11	93	91,4	0	8,6	62	75,8	0	24,2
ELISA	IgA	Diagnóstico	-	80	73,8	18,8	7,5	88	45,5	19,3	35,2	61	29,5	16,4	54,1
CF	IgG1	Diagnóstico	a	83	98,8	0	1,2	88	100	0	0	62	100	0	0
CF	IgG2	Diagnóstico	a	83	100	0	0	88	100	0	0	62	100	0	0
CF	IgG3	Diagnóstico	a	82	97,6	0	2,4	88	90,9	0	9,1	62	72,6	0	27,4
CF	IgG3	Ajustado	b	82	91,5	0	8,5	88	71,6	0	28,4	62	45,2	0	54,8
CF	IgG4	Diagnóstico	a	83	100	0	0	88	100	0	0	62	100	0	0
ELFA	Avidez	Diagnóstico	a,b	71	97,2	2,8	0	85	45,9	31,8	22,4	59	11,9	25,4	62,7
		Ajustado	b	71	91,5	8,5	0	85	28,2	41,2	30,6	59	8,5	15,3	76,3
CF	Avidez	Ajustado	a,b	71	95,8	0	4,2	82	41,5	0	58,5	54	1,9	0	98,1

teste: a, primeira linha, >95% sensibilidade; b, segunda linha >90% de sensibilidade e menos de 50% de resultados falso positivos; -, não preencheu critério para teste diagnóstico de primeira ou segunda linha; resultados positivo, duvidoso e negativo em percentual

Tomados isoladamente, os resultados de desempenho dos testes apontaram os ensaios de avidéz de IgG por ELFA e CF como os melhores para discriminar infecção aguda da convalescente tardia. A avidéz ELFA, considerando-se os pontos de corte fornecidos pelo fabricante, apresentou 97,2% de sensibilidade e 62,7% de especificidade para o diagnóstico de infecção aguda. A utilização do ponto de corte ajustado para esta metodologia não foi vantajosa (91,5% de sensibilidade e 76,3% de especificidade). A avidéz CF apresentou 95,8% de sensibilidade e 98,1% de especificidade, o melhor desempenho dentre os testes.

A Tabela 42 (APÊNDICE D) apresenta o desempenho das combinações de testes (com os pontos de corte ajustados) 2 a 2, onde os testes de primeira linha (aqueles com >95% sensibilidade) foram combinados individualmente com os de segunda linha (aqueles com > 90% sensibilidade e < 50% resultados falso positivos). O melhor desempenho para o diagnóstico de infecção aguda foi observado quando a avidéz CF foi utilizada como teste de primeira linha, combinada com qualquer dos testes de segunda linha (91,4 a 95,7% de sensibilidade e 98,1% de especificidade). A Tabela 43 (APÊNDICE D) mostra o desempenho da combinação de testes 2 a 2 com os pontos de corte recomendados para o diagnóstico de doença.

Cinco testes foram classificados tanto como de primeira quanto de segunda linha: IgM ELISA, IgM ELFA, IgM CF, avidéz ELFA e avidéz CF, sendo este último mais vantajoso em relação aos demais.

5.5.2 Análise discriminante

Foram analisados 193 dados de 31 pacientes em 8 períodos de tempo (meses 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 e 12 meses) primeiramente e a seguir utilizando os dados agrupados em 3 períodos. O grupo 1, infecção aguda, reúne os meses 1, 2 e 3; o grupo 2, infecção convalescente precoce, os meses 4, 6 e 8; e o grupo 3, infecção convalescente tardia, os meses 10 e 12.

Dos 15 testes estudados, treze foram usados na análise discriminante. Foram excluídos da análise por IFI para anticorpos IgG e IgM anti *T. gondii*, que não se mostraram significantes em distinguir a fase de infecção nas análises feitas pelas curvas ROC e pelos testes de correlação de Pearson, além de não mostrarem variação temporal nos testes de Tukey (TAB. 4 e 5; TAB. 26 e 27 do APÊNDICE D).

Os resumos dos resultados da análise discriminante para vários modelos propostos (percentual de acerto da validação cruzada) podem ser observados nas Tabela 15 e Tabelas 32 a 39 (APÊNDICE D). A Tabela 16 mostra que a análise *step wise*

identificou a combinação de testes que produziu o melhor resultado, escolhendo 4 dentre os treze testes: avidéz CF, IgM ELFA, avidéz ELFA e IgG2 CF (modelo 4). Este modelo obteve em média 76,7% de acerto na classificação dos casos pertencentes ao grupo original e 75,6% (média) na validação cruzada. Apenas 1 caso sofreu reclassificação na validação cruzada, deslocando-se do grupo 2 para o grupo 3. O modelo mostrou ainda que 7/65 (10,8%) casos do grupo 1 e 11/49 (22,4%) do grupo 3 foram erroneamente classificados no grupo 2, ou seja, no grupo próximo ao de origem.

TABELA 15- Resultados da aplicação do modelo de análise discriminante para os 13 testes sorológicos *anti- T. gondii* com significância estatística, de acordo com os estágios de infecção

Modelo	Fase da doença	Método escolha das variáveis	Variáveis no modelo	% acerto na validação cruzada			
				total	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
1	todos meses	ENTER	Todas	24,10	-	-	-
2	todos meses (1 a 12)	STEP WISE	Avidéz CF IgM ELFA Avidéz ELFA IgG2 CF	36,80	-	-	-
3	Grupos 1, 2 e 3	ENTER	Todas	72,80	84,4	62	75
4	Grupos 1, 2 e 3	STEP WISE	Avidéz CF IgM ELFA Avidéz ELFA IgG2 CF	75,60	89,2	63,3	77,6
5	Grupos 1, 2 e 3	ENTER	Avidéz CF Avidéz ELFA IgM ELFA IgM ELISA IgM CF IgG3 CF	70,30	84,4	55,7	75,5
6	Grupos 1, 2 e 3	ENTER	IgM ELFA Avidéz ELFA	68,70	84,1	56,5	68,4
7	Grupos 1, 2 e 3	ENTER	IgM CF Avidéz CF	70,50	88,7	45,1	85,2
8	Grupos 1, 2 e 3	ENTER	IgM CF Avidéz CF IgG3 CF	70,40	88,6	48,8	79,6
9	Grupos 1, 2 e 3	ENTER	IgM CF IgG3 CF	61,60	81,7	40,9	64,5
10	Grupos 1, 2 e 3	ENTER	IgM CF IgG2 CF	48,40	25,0	41,5	17,8
11	Grupos 1, 2 e 3	ENTER	IgM CF IgG2 CF Avidéz CF	48,40	38,9	45,9	59,6
12	Grupos 1, 2 e 3	ENTER	Avidéz CF IgM ELFA Avidéz ELFA	75,10	89,2	60,8	79,6

ELISA, ensaio imunoenzimático; ELFA, ensaio imunoenzimático fluorimétrico; IFI, imunofluorescência indireta, CF, citometria de fluxo; G1- Infecção aguda; G2- Infecção convalescente precoce; G3- Infecção convalescente tardia

TABELA 16- Resultados da análise discriminante (Step Wise) com quatro testes: avidéz CF, IgM ELFA, avidéz ELFA e IgG2 CF (Modelo 4^{b,c})

		Grupos	Casos classificados por grupo (%)			Total
			1	2	3	
Grupo de origem	Grupos (%)	1	58 (89,2)	7 (10,8)	0 0	65 (100)
		2	11 (13,9)	51 (64,6)	17 (21,5)	79 (100)
		3	0 0	10 (20,4)	39 (79,6)	49 (100)
Validação cruzada ^a	Grupos (%)	1	58 (89,2)	7 (10,8)	0 0	65 (100)
		2	11 (13,9)	50 (63,3)	18 (22,8)	79 (100)
		3	0 0	11 (22,4)	38 (77,6)	49 (100)

ELFA, ensaio imunoenzimático fluorimétrico; CF, citometria de fluxo; G1- Infecção aguda; G2- Infecção convalescente precoce; G3- Infecção convalescente tardia

a. A validação cruzada é realizada apenas para os casos contidos na análise. Na validação cruzada, cada caso é classificado pela função derivada de todos os casos, retirado aquele em questão.

b. 76,7% dos casos do grupo original foram corretamente classificados

c. 75,6% dos casos foram corretamente classificados pela validação cruzada

A Tabela 17 apresenta os resultados da análise discriminante obtida com o modelo 4 pelo método *step wise*, em que foi excluída a IgG2, gerando o modelo 12. Este modelo, que excluiu a IgG2, mostra desempenho semelhante ao modelo 4.

TABELA 17- Resultados da análise discriminante com três testes: avidéz CF, IgM ELFA e avidéz ELFA (Modelo 12^{b,c})

		Grupos	Casos classificados por grupo (%)			Total
			1	2	3	
Grupo de origem	Grupos (%)	1	58 (89,2)	7 10,8	0 0	65 100
		2	11 (13,9)	48 60,8	20 25,3	79 100
		3	0 0	10 20,4	39 79,6	49 100
Validação cruzada ^a	Grupos (%)	1	58 89,2	7 10,8	0 0	65 100
		2	11 13,9	48 60,8	20 25,3	79 100
		3	0 0	10 20,4	39 79,6	49 100

ELFA, ensaio imunoenzimático fluorimétrico; CF, citometria de fluxo; G1- Infecção aguda; G2- Infecção convalescente precoce; G3- Infecção convalescente tardia

a. A validação cruzada é realizada apenas para os casos contidos na análise. Na validação cruzada, cada caso é classificado pela função derivada de todos os casos, retirado aquele em questão.

b. 75,1% dos casos do grupo original foram corretamente classificados

c. 75,1% dos casos foram corretamente classificados pela validação cruzada

DISCUSSÃO

6.DISCUSSÃO

Este estudo avaliou 72 pacientes, selecionando 32 que preencheram os critérios de infecção aguda por *T. gondii* e com disponibilidade de amostra de sangue dentro do primeiro trimestre. Esses pacientes foram acompanhados no período de um ano, tendo sido coletado sangue nos meses 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 e 12 após início dos sintomas. Apenas um paciente desistiu do estudo na quarta coleta, totalizando assim 31 pacientes no estudo.

Não foram encontrados estudos de imunodiagnóstico da toxoplasmose aguda com semelhante número de pacientes e coletas programadas num período de seguimento de 12 meses. Como também, não foram encontrados estudos utilizando a citometria de fluxo para determinação da avidéz e das subclasses de IgG.

Os soros foram testados para IgG, IgM, IgA, avidéz de IgG e subclasses de IgG anti-*T. gondii*, utilizando-se diferentes técnicas, totalizando quinze resultados de cada amostra.

Caracterização da coorte de pacientes

A distribuição da coorte quanto ao sexo mostrou predomínio de mulheres (58%). No Canadá, Bowie *et al.* (1997) relataram importante surto de toxoplasmose, sendo 78 mulheres (78%) entre os 100 casos que preencheram os critérios de definição de doença aguda. Embora alguns estudos epidemiológicos em populações não demonstrem diferença estatística na prevalência da infecção entre homens e mulheres (Cavalcante *et al.*, 2006), outros apontam predomínio entre indivíduos do sexo masculino (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003, Jones *et al.*, 2006). A fonte de infecção exerce papel determinante na distribuição entre os sexos.

Com relação à presença de sinais e sintomas, o de maior freqüência foi a linfadenopatia, presenciada em todos os pacientes, seguido de febre (90,3%), adinamia/mal estar (67,7%) e cefaléia (54,8%). Devido à gravidade da apresentação inicial da doença não diagnosticada, três pacientes necessitaram internação hospitalar. A abundância de sintomas concomitantes na coorte estudada pode ser explicada pelo critério clínico de inclusão, que foi a presença de no mínimo dois sinais/sintomas compatíveis com toxoplasmose aguda. Descrevendo aspectos clínicos e sorológicos de 120 casos de linfadenopatia, Durlach *et al.* (2003) relataram a ocorrência de astenia (69%), febre (45%) e de outros sintomas não quantificados como cefaléia, mialgia e artralgia. No surto relatado por Bowie *et al.* (1997), os 100

indivíduos com diagnóstico de toxoplasmose aguda corresponderiam a 1,3 a 3,6% dos 2894 a 7718 casos estimados de infecção. Foram descritos os seguintes sinais e sintomas: linfadenopatia (51%), doença ocular (19%), e outros compatíveis com toxoplasmose como febre, cefaléia e mal estar/cansaço (11%). Dezoito indivíduos destes 100 não apresentaram sintomas. Embora não tenha sido objetivo do estudo, o seguimento dos pacientes durante 1 ano, permitiu observar que a adinamia perdurou por vários meses em mais da metade dos indivíduos acompanhados e tornou um dos principais incômodos relatados durante os contatos.

No presente estudo, a doença ocular foi diagnosticada em 2 dos 31 casos (6,5%) de toxoplasmose aguda, um dos quais assintomático. Durante o surto de toxoplasmose ocorrido no Canadá, 20 casos de coriorretinite foram relatados (Burnett *et al.*, 1998), reforçando a importância da realização da fundoscopia em todos os casos de toxoplasmose aguda. Estudos brasileiros relatam alta prevalência de coriorretinite em nosso país e levantam a possibilidade de que cepas de *T. gondii* encontradas no Brasil sejam mais propensas a causar doença ocular quando comparadas àquelas identificadas nos países europeus (Glasner *et al.*, 1992). Quanto à época de contágio, acredita-se que tanto a toxoplasmose adquirida quanto a congênita estejam implicadas na gênese dos casos de coriorretinite diagnosticados na idade adulta (Glasner *et al.*, 1992; Gilbert & Stanford, 2000).

6.1 Correlação dos resultados de IgG, IgM e avides de IgG entre as diferentes técnicas

Os testes sorológicos são métodos diagnósticos indiretos que avaliam a imunidade humoral desenvolvida pelo hospedeiro em resposta à infecção por um dado microrganismo. A avaliação da resposta imune específica de indivíduos imunocompetentes em casos de infecção adquirida por *T. gondii* é feita com testes que detectam e/ou quantificam classes de imunoglobulinas, como IgG e suas subclasses, IgM, IgA e IgE, ou que avaliam aspectos peculiares da qualidade destes anticorpos, como a avides de IgG. As características dos insumos, em particular dos antígenos, e a metodologia utilizada em cada teste diagnóstico são importantes para análise dos resultados, pois, em grande parte, esses elementos determinam o tipo de anticorpo identificado. Métodos diferentes podem detectar diferentes grupos de anticorpos, merecendo análise à luz das especificidades que cada um apresenta.

Estudos de correlação entre títulos de anticorpos são encontrados para o teste de Sabin&Feldman, IFI e aglutinação direta (Van Nunen *et al.*, 1965; Desmonts & Remington, 1980). Esses três ensaios utilizam parasitos inteiros, com leitura determinada em títulos (recíproca da maior diluição com resultado positivo). As correlações qualitativas (concordância entre positivos e negativos), mais comumente utilizadas entre testes com metodologias distintas, são as mais encontradas. Sofrem menor influência do fator tempo, que é diretamente relacionado aos níveis de anticorpos, reflexo da evolução da resposta imune do hospedeiro frente à infecção parasitária. Estes testes hoje são cada vez menos utilizados por não permitirem automação.

Estudo recente comparou os resultados de dois testes comercial de avidéz de IgG (Platelia Toxo IgG Avidity, Bio-Rad, França e Liaison Toxo IgG Avidity II Diasorin, Itália), encontrou 75,3% de concordância total, 23,6% de discrepância parcial e 1,1% de discordância total (Lauchaud *et al.*, 2009). Os autores consideraram como discrepância parcial quando um resultado de um teste foi duvidoso e o outro positivo ou negativo. Concluíram que se um teste resulta duvidoso, um segundo teste poderia, caso negativo, afastar infecção aguda, evitando ansiedade e tratamento desnecessário de gestantes.

No presente estudo, a correlação entre os resultados de diferentes técnicas para cada classe de anticorpo não se revelou significativa, à exceção dos testes ELISA, ELFA e CF para anticorpos IgM anti- *T. gondii* (TAB. 05). Vale ressaltar que o teste de Pearson identifica correlação linear. Provavelmente este não é o caso dos resultados dos anticorpos estudados. As correlações encontradas apresentam limitações: diferentes antígenos são utilizados em cada teste; variações metodológicas caracterizam os testes; e os resultados de cada técnica expressam diferentes unidades de medida. Assim, o teste ELISA expressa resultados em índice (DO amostra/ DO *cut-off*), o teste ELFA em unidades internacionais/ml, enquanto a citometria de fluxo mede o percentual de parasitas fluorescentes positivos. Outro aspecto a ser considerado é a correlação entre resultados concordantes e a presença ou ausência de doença e, em especial, a definição da fase em que esta se encontra. A concordância entre dois resultados de baixa avidéz mostra a correlação dos testes laboratoriais e sugere o diagnóstico de fase aguda, porém não o confirma.

6.2 Estudo da dinâmica dos anticorpos IgG, IgM, IgA, e avidéz de IgG anti- *T. gondii* durante o período de doze meses do estudo longitudinal

Os anticorpos anti-IgG são detectados uma a três semanas após o início da infecção, dependendo da técnica sorológica utilizada, e atingem valores máximos num período variável de tempo (6 a 8 semanas), persistindo detectáveis por toda a vida. São muito utilizados na triagem de infecção passada (Remington *et al.*, 2006). Existem vários testes laboratoriais disponíveis para a detecção de IgG. Os mais utilizados são ELISA, IFI e ISAGA, aprimorados ao longo de décadas, desde o desenvolvimento do primeiro teste diagnóstico (DT) por Sabin & Feldman (1948).

Classicamente, o resultado de IgG aceito como positivo para o diagnóstico de infecção aguda por *T. gondii* é aquele em que se pode demonstrar aumento significativo nos títulos de anticorpos em amostras seriadas, obtidas com intervalo de duas a quatro semanas e analisadas em paralelo. No caso do DT e da IFI considera-se significativo o aumento dos títulos em quatro vezes entre as amostras pareadas.

Nossos resultados mostram que em média houve aumento dos níveis dos anticorpos da classe IgG para ELISA, ELFA e CF nos primeiros dois meses de infecção. A técnica de IFI não mostrou o aumento significativo dos títulos nesta época. Provavelmente para IFI o aumento da IgG é mais precoce. Depois do primeiro trimestre os títulos permaneceram altos, variando individualmente durante todo o primeiro ano após a infecção, não apresentando utilidade para diferenciar a época de evolução da infecção. Estudando o padrão sorológico evolutivo de toxoplasmose em população brasileira, Camargo & Leser (1976) incluíram IFI para anticorpos IgG e IgM, além de hemaglutinação e fixação de complemento. Mostraram que a IFI IgG apresentou títulos altos no primeiro mês da avaliação (pelo menos de 1:8.000), ao contrário da hemaglutinação, que aumenta por semanas ou meses. Os autores explicam que testes que utilizam componentes menos solúveis da parede do parasito, como é o caso da IFI, apresentam aumento rápido dos títulos quando comparados a outros que empregam constituintes mais solúveis, especialmente de origem citoplasmática como é o caso da hemaglutinação em seu estudo, e do ELISA e ELFA utilizados no nosso.

A avaliação da dinâmica dos anticorpos da classe IgG exige a formação de um painel de soros coletados longitudinalmente, conforme desenho do presente estudo. Tal premissa não foi cumprida nos diversos estudos que analisaram os títulos de

diferentes pacientes em diferentes momentos da infecção (Beghetto *et al.*, 2003; Durlach *et al.*, 2003; Kodym *et al.*, 2007; Flori *et al.*, 2008).

Nossos resultados mostram diferenças significativas entre as amostras do primeiro e segundo meses, para as técnicas ELISA e CF, e entre o dois primeiros meses e o terceiro para o ELFA IgG, reafirmando a existência de diferenças na dinâmica de IgG de acordo com a técnica utilizada e reforçando a possibilidade de se utilizar essa classe de imunoglobulinas para distinguir os dois primeiros meses de infecção. Para isso, pelo menos duas amostras de sangue devem ser analisadas de forma pareada, a coleta feita com intervalo de tempo em torno de duas a quatro semanas, conforme recomendado nos protocolos, sendo que esse intervalo não foi objeto de aferição em nosso desenho.

Os anticorpos da classe IgM podem ser detectados a partir de 7-14 dias do início da infecção, precedendo em 1-2 semanas o aparecimento da IgG. Seus níveis declinam mais rapidamente que os da IgG e na dependência do teste utilizado. Consequentemente, são amplamente utilizados como marcadores de infecção aguda para estimar o tempo de infecção, juntamente com outros resultados sorológicos como IgA, IgE, avidéz de IgG. Uma vez que a resposta imune para produção de anticorpos varia de indivíduo para indivíduo, a duração e os níveis de IgM não são utilizados para inferir o tempo de infecção. Entretanto, devido à boa sensibilidade dos testes disponíveis, a ausência de detecção de anticorpos IgM no soro praticamente afasta a ocorrência de toxoplasmose ocorrida nos últimos 6 meses, a não ser que o paciente se encontre no curto período que antecede sua produção após a infecção (Montoya, 2002).

Dois problemas têm chamado a atenção dos profissionais de saúde diante da detecção de anticorpos da classe IgM em pacientes com suspeita de infecção aguda. O primeiro diz respeito à baixa especificidade dos testes diagnósticos e o segundo à persistência da IgM por períodos prolongados de tempo.

Algumas investigações são clássicas quanto à baixa especificidade dos testes IgM detectados. Liesenfeld *et al.* (1997), analisando os resultados obtidos com o teste "IgM Platelia" realizados na investigação de um surto de toxoplasmose ocorrido na capital do distrito de *British Columbia*, no Canadá, mostraram que o teste era bastante sensível (99,4%) porém pouco específico (49,2%), com valor preditivo positivo de 51,9% e valor preditivo negativo de 99,3%. O estudo mostrou concordância de 67% com o teste IgM ELISA *in house* do laboratório de referência de Palo Alto (Califórnia,

USA). Com isso, reforçou a necessidade da utilização de testes confirmatórios de especificidade conhecida, de preferência em laboratórios de referência. Em meados da década de 1990 este e outros relatos de casos IgM falso-positivo foram encaminhados ao FDA. Como este é o órgão responsável pela liberação de testes para uso comercial nos Estados Unidos, promoveu a investigação de seis testes IgM, utilizados por 10 laboratórios participantes da prova de proficiência de 1995 para o diagnóstico de toxoplasmose do *College of American Pathology*. Avaliando o desempenho dos testes aplicados em 258 amostras de soros agudos, crônicos e positivos para o fator reumatóide, os autores mostraram especificidade variando entre 77,5 a 99,1% quando comparados ao padrão ouro (IgM ELISA) utilizado pelo Laboratório de Referência para o Diagnóstico de Toxoplasmose de Palo Alto, Califórnia (Wilson *et al.*, 1997). Embora o desenho do estudo não pudesse quantificar os resultados falso-positivos dos testes, podia apontar um indicador útil de especificidade relativa entre eles. Em outro estudo, Rorman *et al.* (2006) relataram a experiência do Centro de Referência Nacional em Toxoplasmose de Israel, no período de 1997-2002, em que apenas 17% \pm 2,6% das amostras de testes enviados para confirmação eram de fato IgM positivo (média anual de 747 amostras).

Em nosso estudo nós só incluímos pacientes com diagnóstico sorológico confirmado de toxoplasmose aguda, portanto os resultados dos testes IgM foram confirmados *a priori*. Para ELISA e ELFA os testes utilizaram a técnica de captura.

A persistência de anticorpos da classe IgM por períodos prolongados de tempo depois da infecção aguda é fartamente relatada em todo o mundo (Takahashi & Rossi, 1997; Ashburn *et al.*, 1998; Auer *et al.*, 2000; Roberts *et al.*, 2001; Kodym *et al.*, 2007). Ao cabo de um ano ou mais, cerca de 10-20% dos pacientes apresentam IgM detectável no sangue, variação dependente de vários fatores, dentre eles o nível de anticorpos produzidos individualmente e o tipo de teste aplicado. O teste que mais precocemente revela sororreversão de positivo para negativo com o passar dos meses é a IFI (Camargo *et al.*, 1976).

Nosso estudo mostrou que, transcorridos 12 meses do início dos sintomas, a permanência de testes IgM positivo foi de 83,8% para ELISA (26/31), 83,3% para ELFA (25/30), 32,6% para citometria de fluxo (16/31 pacientes) e 29% para IFI (9/31 pacientes).

Os anticorpos IgA são produzidos precocemente após infecção, paralelamente à resposta dos anticorpos da classe IgM e IgE. Em conjunto com IgM, são os anticorpos

de escolha na avaliação diagnóstica de infecção congênita, uma vez que não atravessam a barreira placentária. Sua utilização como marcador de infecção aguda adquirida foi bastante investigada, através de técnicas variadas, principalmente ELISA e ISAGA. De acordo com Ashburn *et al.* (1998), existem fortes indícios de que, para o objetivo de inferir o tempo de infecção, os anticorpos da classe IgA não devam ser utilizados isoladamente, mas em conjunto com outros marcadores de infecção aguda, devido à características relacionadas à sensibilidade dos testes e à persistência desses anticorpos após vários meses e mesmo anos depois da primoinfecção. Roberts *et al.* (2001) mostraram o desempenho de vinte testes utilizados para diagnóstico de infecção aguda em 12 centros de referência de países europeus. Seis testes dentre estes eram IgA, três ensaios imunoenzimáticos (2 comerciais e um *in house*) e três ISAGA (um teste comercial e dois *in house*). Neste estudo multicêntrico, a sensibilidade dos seis testes da classe IgA para o diagnóstico de infecção aguda em gestantes com infecção de menos de 3 meses de duração variou entre percentuais tão baixos quanto 39 e 68%, a valores intermediários de 81 a 90%. As amostras destas mesmas pacientes coletadas na fase convalescente (entre três e doze meses de infecção) apresentaram positividade para IgA entre 37 a 89 % dos casos. Para outros indivíduos, na fase crônica da infecção (>12 meses), a IgA permaneceu positiva em 1 a 30% das amostras analisadas, dependendo do teste. Kodym *et al.* (2007) mostraram dados semelhantes, no estudo conduzido em laboratório de referência na República Tcheca. Das 23 amostras de sangue coletadas entre 6,5 e 9 meses, e das 31 amostras coletadas entre 9,5-12 meses de infecção, a persistência de IgA foi observada em 48,6 e 38,7% respectivamente, em teste ELISA comercial.

Nossos resultados em pacientes acompanhados ao longo de 12 meses após o início dos sintomas de toxoplasmose aguda reafirmam as limitações do uso da IgA na avaliação temporal da infecção aguda. Estas limitações estão de acordo com os achados de autores já citados. Primeiramente no que diz respeito à baixa sensibilidade do teste na fase aguda. Nos meses 1,2 e 3 após o início dos sintomas, a positividade da IgA foi de 87,5% (21/24), 76% (19/25) e 58,6% (17/29) respectivamente. Em segundo lugar, pela persistência da IgA, que ao cabo de 12 meses do estudo esteve presente em 33,5% (10/30) dos pacientes.

O teste de avidéz de IgG foi introduzido há pelo menos duas décadas, para utilização na diferenciação entre infecção aguda e crônica em doenças virais como a rubéola (Hedman & Sepalla, 1988). O mesmo grupo de pesquisadores propôs a utilização do teste de avidéz de IgG para avaliar infecção por *T. gondii* (Hedman *et al.*, 1989) e a

partir de então tem sido usado principalmente na avaliação do tempo de infecção em gestantes (Lappalainen *et al.*, 1993), no diagnóstico de doença ocular e em pacientes com linfadenopatia causada por *T. gondii* (Paul, 1999). No mercado brasileiro e europeu podem ser encontrados testes comerciais, automatizados e semi-automatizados.

Resultados de vários estudos mostram que anticorpos de alta avidéz de IgG são encontrados predominantemente em casos de infecção crônica (Beghetto *et al.*, 2003; Montoya *et al.*, 2004; Kodym *et al.*, 2007). Entretanto, o mesmo consenso não é obtido com relação à detecção de anticorpos de baixa avidéz, uma vez que são identificados em percentual variável de indivíduos com mais de um ano de infecção (Beghetto, *et al.*, 2003; Montoya *et al.*, 2004; Lefevre-Petazzoni *et al.*, 2006). Os últimos autores analisaram um banco de dados hospitalar, identificando 120 pacientes (93 gestantes, 26 mulheres não grávidas e um homem) com seguimento sorológico entre 3 meses e 12,8 anos, encontrando anticorpos IgG de baixa avidéz em 55% dos pacientes com 3 a 6 meses de infecção e 26,4% em casos onde a infecção ocorrera há mais de 1 ano. Montoya *et al.* (2004) acompanharam uma coorte de 73 pacientes consecutivos (104 amostras de soro) com diagnóstico de linfadenopatia toxoplásmica (LT), com o objetivo de estudar a cinética da avidéz de IgG e sua utilidade clínica, utilizando a técnica ELFA. Os autores agruparam os pacientes mês a mês, considerando como ponto inicial o intervalo entre o início dos sintomas clínicos e a data da coleta do soro. Os dados mostraram que 97% dos resultados de baixa avidéz se encontravam dentro dos primeiros 6 meses de infecção e que 82% dos indivíduos que apresentaram anticorpos de alta avidéz tinham mais de 7 meses de doença. Embora o número de amostras analisadas para alguns meses tenha sido pequena (n= 4 a 5) e considerando as limitações subjetivas da percepção da linfadenopatia pelo paciente, os autores encontraram consistência entre os títulos médios de avidéz e uma tendência de aumento ao longo do tempo. Encontraram ainda boa correlação entre baixa avidéz e padrão agudo no perfil sorológico de vários testes utilizados no centro de referência para diagnóstico de toxoplasmose, em Palo Alto, Califórnia, onde o estudo foi conduzido. Resultados distintos foram relatados por outros autores. Paul (1999), avaliou 19 pacientes com LT utilizando um teste não comercial desenvolvido na Clínica de Doenças Parasitárias e Tropical na Polônia. Mostrou que apenas 53% dos indivíduos com resultados de alta avidéz tinham mais de 5 meses de doença. Em levantamento sistemático sobre avidéz de IgG em indivíduos com soroconversão documentada (gestantes ou pacientes imunocompetentes), Lefevre-Petazzoni *et al.* (2007) encontraram 0 a 66% de baixa avidéz em infecções crônicas entre os 11

estudos publicados. Mostraram ainda heterogeneidade na execução dos testes realizados nos estudos, tais como uso de técnicas *in house*, a forma de calcular o índice, variação grande no período de seguimento dos pacientes, definição do ponto de corte entre baixa e alta avidéz e sua correlação com o tempo, itens que prejudicam a comparação de resultados. Lefevre-Petazzoni *et al.* (2007) avaliaram o impacto do tratamento materno e idade gestacional na maturação da avidéz de IgG. Neste estudo 107 gestantes foram acompanhadas mensalmente durante o pré-natal soroconverteram na gravidez. Os autores encontraram correlação positiva entre o aumento da avidéz e o tempo de gestação, porém de forma heterogênea, o que eles atribuíram às diferentes idades gestacionais no momento da infecção (menor avidéz quanto mais avançada a gestação). Mostraram ainda a ocorrência de atraso na maturação dos anticorpos IgG provocada pelo uso materno de espiramicina. Num exemplo, mostraram que a avidéz de IgG variou de 9 a 30% para 95% das mulheres com 12 semanas após infecção, concluindo que os resultados de avidéz não poderiam ser utilizados para estimar o tempo de infecção em situações semelhantes.

No presente estudo, os resultados da curva de avidéz de IgG, obtidos com a técnica ELFA demonstrou evolução gradual e consistente ao longo dos 12 meses de seguimento sorológico. Com a técnica de CF o aumento foi mais marcante e acentuado, conforme mostrado no Gráfico 4. Outros estudos encontraram cinética semelhante (Montoya *et al.*, 2004, Fricker-Hidalgo *et al.*, 2006), porém com maior amplitude de variação entre resultados.

Contudo, os trabalhos encontrados em nosso levantamento de literatura foram realizados de forma retrospectiva, com coletas de soro em períodos variáveis de tempo, número de amostras reduzidas por paciente e exames e testes feitos de forma não pareada.

A citometria de fluxo para determinação de IgG, IgM e IGA anti-*T. gondii*, utilizando taquizoítas fixados e leitura imunofluorescente, foi descrita por Cozon *et al.* (1993), em estudo comparativo com a IFI, concluindo que o método provou ser sensível e útil para quantificar os anticorpos com as vantagens da possível automação em relação à imunofluorescência. Os mesmos autores (Cozon *et al.*, 1999) aplicaram a CF para automatizar o teste do corante de Sabin-Feldman. Para quantificar a avidéz de IgG e as subclasses de IgG anti- *T. gondii* por CF não foram encontrados estudos na literatura.

Nossos dados mostram que a técnica de CF no estudo das subclasses de IgG para o diagnóstico de infecção por *T. gondii* foi bastante sensível, diagnosticando a totalidade dos casos (a IgG2 e IgG4 são positivas em todos os casos no grupo 1). A IgG total e as subclasses IgG2 e IgG3 também podem diferenciar o grupo 1 do grupo 3 pela análise da curva ROC. A IgG1 apresenta comportamento semelhante ao da IgG total, dado que representa dois terços desta, sendo que apenas o primeiro mês se mostra estatisticamente diferente dos demais, porém não apresenta desempenho estatisticamente significativo na análise da curva ROC. Das subclasses de IgG, a IgG3 separa o 2, 3 e 4 mês do oitavo em diante e pode ser utilizada como teste de segunda linha com o ponto de corte ajustado.

6.3 Avaliação da técnica de citometria de fluxo no estudo das subclasses de IgG no diagnóstico temporal da infecção por *T. gondii*.

A concentração sérica das subclasses de IgG é de 9, 3, 1 e 0,5mg/ml para IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 respectivamente (Abbas *et al.*, 2008). Assim, o comportamento dos anticorpos da subclasse IgG1 reproduzem aqueles encontrados para a IgG total, já que esta subclasse é responsável por dois terços desta. Os taquizoítas extracelulares são rapidamente eliminados do organismo através da ação de anticorpos específicos e do complemento. Sendo a via clássica do complemento ativada principalmente por IgG1, IgG3 e IgM, esperamos que a resposta de Ig1 e IgG3, além da IgM, pudessem apresentar diferenças com relação ao tempo de infecção. *Derouin et al.* (1987) analisaram as subclasses de IgG por ELISA em 50 pacientes imunocompetentes em três períodos distintos da infecção por *T. gondii*; infecção aguda (< 10 semanas do início dos sintomas ou soroconversão), sub-aguda (3-12 meses) e latente (> 12 meses) encontrando predomínio de IgG1 nos três estágios, tendência a aumento de IgG2 e diminuição de IgG3 nas fases sub-aguda e latente da infecção. A IgG4 não foi detectada por esta técnica laboratorial, com algumas exceções. A IgG3 pode ainda mostrar diferenças em relação à infecção aguda e convalescente tardia. Conforme resultados encontrados por vários autores, os principais alvos para produção de anticorpos durante a fase aguda e crônica da infecção são antígenos presentes na membrana dos taquizoítas (Giraldo *et al.*, 2000), os quais foram utilizados íntegros e fixados no experimento da CF.

As subclasses IgG podem ser empregadas para o diagnóstico da infecção toxoplásmica, porém não trazem vantagens sobre a IgG total e não se prestam ao

diagnóstico da infecção aguda. A citometria de fluxo poderá ser utilizada para avaliação da avidéz de subclasses de IgG, não mostrada neste estudo, com potencial para refinar o teste de avidéz de IgG total.

6.4 Análise de desempenho dos testes na identificação da infecção aguda

A escolha dos intervalos de tempo baseou-se primeiramente no estudo da cinética dos anticorpos (ANOVA e Tukey). A escolha deste agrupamento teve o objetivo de contribuir com informações que possam ser aproveitadas na interpretação de resultados sorológicos obtidos em gestantes.

Com relação à cinética, vários estudos apontam perfis sorológicos clássicos de infecção aguda, intermediária e crônica (Camargo *et al.*, 1977; Suzuki *et al.*, 2001; Cozon *et al.*, 1998; Remington *et al.*, 2006). Embora não haja consenso quanto à classificação temporal da infecção por *T. gondii*, a maioria dos autores denomina como infecção aguda casos com duração menor ou igual a 3 meses (Suzuki *et al.*, 2001; Robert *et al.*, 2001) e crônica ou latente quando maior que 12 meses. Um período intermediário entre 3-12 meses foi nominado por Robert *et al.* (2001) de período convalescente, enquanto Camargo *et al.* (1977) descreveram um perfil sorológico que chamou de transição, intermediário entre o agudo e o crônico.

A importância médica do diagnóstico temporal da infecção aguda por *T. gondii* em pacientes imunocompetentes está relacionada às gestantes, ao diagnóstico diferencial das uveítes e linfadenopatias, além de casos de doença sistêmica aguda grave.

Com relação às gestantes, a despeito dos poucos estudos baseados em evidências científicas (Peyron *et al.*, 2000), a confirmação diagnóstica de soroconversão ocorrida durante a gravidez é ponto de partida para a instituição de medidas médicas, como tratamento materno e investigação fetal. Do ponto de vista da utilização destas informações para a assistência médica pré-natal, é importante saber que no Brasil, o início do pré-natal frequentemente ocorre após o primeiro trimestre. A propósito, Reis *et al.* (2006) relataram que a primeira visita ao pré-natal em Porto Alegre foi feita no primeiro trimestre em apenas 31,4% dos casos em que a idade gestacional era conhecida. O problema gerado a partir da realização tardia dos testes sorológicos anti-*T. gondii* é que a interpretação dos resultados e a tomada de decisão em casos suspeitos de infecção aguda fica prejudicada. Ocorre que a maioria dos testes de segunda linha (em especial, o de avidéz de IgG), solicitados em casos de gestantes

IgM positivas, só permite afastar infecção aguda quando anticorpos de alta avidéz são encontrados nas primeiras 12 a 20 semanas. Considerando a realidade brasileira, são desejáveis testes que também possam ser úteis quando realizados em períodos posteriores ao primeiro trimestre de gestação.

A análise dos resultados de amostras de soro em fase mais precoce da infecção (meses 1 e 2) levou em conta o fato de que a infecção precede os sintomas em cerca de 1 a 3 semanas. Como a nossa referência de tempo em relação às coletas de sangue foi o início dos sintomas, o mês três poderia encobrir uma real diferença entre os níveis de anticorpos dos meses 1 e 2 (fase mais aguda), tanto quanto o mês oito poderia fazê-lo em relação ao período convalescente precoce. Assim, foram retirados dos respectivos grupos com o intuito de minimizar a interferência destes meses na transição das fases aguda para a convalescente precoce e da convalescente precoce para a tardia. A análise da curva ROC (GRAF. 6), retirando-se o mês 3 do grupo 1 (infecção aguda) e o mês 8 do grupo dois (infecção convalescente precoce), reforçou que a IgG não é capaz de separar as diferentes fases do primeiro ano de infecção.

A análise dos resultados dos testes pela curva ROC (TAB. 31 do APÊNDICE D) aponta que os testes para IgM e avidéz de IgG podem separar os grupos 1 e 3 com valores sob a curva significantes. Exceto a IFI e com menor poder, também podem separar os grupos 1 e 2. Os testes de avidéz de IgG apresentam o melhor desempenho com vantagem sobre os testes para IgM e da CF sobre o ELFA na distinção do grupo 1 e 3.

6.5 Identificação da melhor combinação de testes que discrimina as fases da doença

Considerando o objetivo de separar os pacientes em três grupos distintos e levando em conta que a curva ROC permite a alocação dos casos em apenas dois grupos, optamos por utilizar a mesma estratégia proposta por Robert *et al.* (2001), que utilizaram a combinação de um teste de primeira linha, com sensibilidade maior que 95%, com um teste de segunda linha. Este último, além de sensível (maior que 90%) deveria apresentar fração de falso positivo menor que 50%. Índices diagnósticos convencionais como sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo são usados quando o resultado do teste é binário (doença presente ou ausente). De forma semelhante, definimos sensibilidade dos testes como o percentual de resultados positivos no grupo 1 (infecção aguda) e especificidade como percentagem de resultados negativos no grupo 3 (infecção convalescente tardia).

Valores positivos no grupo 3 foram considerados falso-positivos, e valores negativos no grupo 1 foram considerados falso-negativos. O ponto de corte escolhido foi aquele que garantiu mais de 95% de sensibilidade para o diagnóstico de infecção aguda (primeira linha) ou mais de 90% com fração de falso positivo menor que 50% (segunda linha).

Devido ao desenho do estudo, valores preditivos positivo e negativo não foram obtidos. Os testes escolhidos para esta análise foram os da classe IgM e IgA, além da avidéz de IgG, classicamente utilizados no diagnóstico de infecção aguda por *T. gondii*. As subclasses de IgG também foram analisadas, levando-se em conta que não existem estudos sobre o desempenho diagnóstico destes anticorpos pela técnica de CF na infecção aguda por *T. gondii*.

Os anticorpos da classe IgG não foram analisados devido à limitação do seu uso no diagnóstico da doença toxoplásmica aguda, restrito às situações onde ocorre soroconversão ou naquelas em que observa-se um aumento significativo dos títulos de anticorpos, de pelo menos duas vezes, medidos pelo teste do corante ou IFI.

Estratégia semelhante foi aplicada por Robert *et al.* (2001) em estudo que envolveu 11 centros de referência europeus para o diagnóstico de infecção primária por *T. gondii*. Os soros analisados por esses autores foram distribuídos em três grupos, constituídos de 73 indivíduos com menos de 3 meses de soroconversão (infecção aguda), 49 soros destes mesmos indivíduos com infecção datada entre 3 e 12 meses após a soroconversão (infecção convalescente) e 154 com infecção pregressa (mínimo de 12 meses). Os autores analisaram um grande número de soros de pacientes com infecção crônica, que não fizeram parte dos grupos iniciais. Isso favoreceu a discriminação dos grupos, porém distanciou da prática clínica, onde os pacientes que mais demandam esclarecimento diagnóstico são aqueles que apresentam positividade nos testes IgM, o que deve ocorrer majoritariamente no primeiro ano após a primoinfecção.

Nosso estudo analisou uma coorte de pacientes acompanhada ao longo de 1 ano, o que permitiu um seguimento sorológico do mesmo grupo. Sete testes de primeira linha foram combinados com 6 testes de segunda linha, gerando 42 modelos. Cinco testes (IgM ELISA, IgM ELFA, IgM CF, avidéz ELFA e avidéz CF) atenderam aos critérios de primeira ou segunda linha, na dependência dos pontos de corte. As melhores combinações de dois testes foram aquelas que partiram da avidéz CF como teste de

primeira linha, seguido da IgM ELISA (sensibilidade 95,7% e especificidade 98,1%) ou avidéz ELFA (sensibilidade 95,5% e especificidade de 98,1%).

A análise discriminante identifica o conjunto de testes que oferece o melhor desempenho. O modelo 4 gerado pelo método *step wise* identificou os testes avidéz CF, IgM ELFA, avidéz ELFA e IgG2 CF, permitindo 75,6% de acerto na classificação dos grupos. Quando se excluiu a IgG2 deste modelo (modelo 12) a média de acerto manteve-se no mesmo patamar (75,1%). Os erros de classificação dos modelos 4 e 12 ocorreram entre os grupos vizinhos. Ressalta-se que nenhum paciente do grupo 1 foi erroneamente classificado no grupo 3, e vice-versa. Portanto, os resultados desses modelos permitem excluir infecção convalescente tardia ou aguda se o caso é classificado no grupo 1 e 3 respectivamente.

Considerando por um lado o pequeno acréscimo no desempenho, e por outro o custo e as dificuldades técnicas para a dosagem de IgG2, esse último modelo (12) delineou-se como o melhor conjunto de testes para a discriminação dos grupos agudo e convalescente tardio.

O conjunto de testes deve considerar a disponibilidade de recursos técnicos dos laboratórios ou centros de referência. No entanto, não é limitação para o emprego da técnica de citometria de fluxo, hoje disponível e sub-utilizada na rede de pública de saúde, nos laboratórios de referência para HIV-AIDS.

LIMITAÇÕES

7.1. Dificuldades de definição de caso agudo (padrão-ouro)

As dificuldades relacionadas à definição de caso agudo se devem à: a) Critério clínico diagnóstico não aplicável. Compreende-se como fase aguda aquela na qual o indivíduo apresenta sintomas da doença. É praticamente nesta mesma época que começa ocorrer a resposta imune específica, com produção de anticorpos. O que acontece é que apenas cerca de 15% dos pacientes apresentam algum sintoma, os quais são inespecíficos e comuns a outras entidades nosológicas; b) padrão ouro laboratorial de difícil execução: ainda hoje o teste padrão ouro para definição de doença aguda por *T. gondii* é sorológico e se baseia na soroconversão ou aumento em 4 vezes dos títulos de anticorpos na reação de Sabin&Feldman (que mede anticorpos da classe IgG e IgM). Na ausência deste a IFI IgG pode substituí-lo. Uma das grandes dificuldades no estudo dos métodos sorológicos diagnósticos em toxoplasmose, reside no fato de que o fator **tempo de infecção** é um dos principais determinantes de seus resultados. A produção dos anticorpos é um fenômeno de particularidades individuais, tornando-se difícil se estabelecer níveis ou títulos absolutos de anticorpos capaz de assegurar um dado tempo de infecção. Tentando estabelecer parâmetros unificados para o diagnóstico sorológico da toxoplasmose a ser adotado em estudos, o grupo europeu capitaneado por Lebech *et al.* (1996) chamou de infecção primária ocorrida na gestação como definitiva quando a soroconversão ocorreu durante a gestação, a cultura foi positiva no sangue materno ou a doença congênita foi confirmada. Infecção primária provável na gestação a soroconversão ocorreu mas a primeira amostra foi coletada 2 meses antes da gravidez, aumento significativo de IgG na presença de IgM e/ou IgA, títulos altos de IgG e presença de IgM e/ou IgA e presença de linfadenopatia durante a gravidez, títulos altos de IgG e presença de IgM e/ou IgA na segunda metade da gravidez.

Sendo a doença assintomática na grande maioria dos casos (quando presentes, os sintomas são inespecíficos), torna-se difícil a uniformização de critérios. Os critérios universalmente aceitos, soroconversão ou o aumento dos títulos (4 vezes) de DT ou IFI, acontecem muito precocemente na infecção e são difíceis de serem cumpridos em amostras clínicas. Os estudos que surpreendem soroconversão são provenientes de países europeus, que seguem protocolo de triagem universal de gestantes. Nestes casos, a época da infecção é estabelecida como a média de tempo obtida entre as datas da última sorologia negativa e a primeira positiva (Roberts *et al.*, 2001). De qualquer maneira, são tempos aproximados.

7.2 Correlação de Pearson

A correlação buscada pelo teste de Pearson é linear, ou seja, ponto-a-ponto. Caso haja correlação não linear, esse teste não identifica, sendo necessário realizar uma correlação de curvas. Isso pode ter ocorrido principalmente com a IFI. A correlação de curvas será realizada, embora seus resultados provavelmente não interfiram com a utilidade de cada teste no diagnóstico da infecção aguda.

7.3 Limitações laboratoriais

Diferentes antígenos utilizados em cada teste, variações metodológicas e as diferentes unidades de medida que expressam os resultados de cada técnica são importantes limitantes à correlação desses resultados.

7.4 Validade externa

Os achados deste estudo se aplicam a pacientes com toxoplasmose aguda sintomática. A utilidade dos resultados para gestantes, crianças e indivíduos imunocomprometidos deverá ser validada.

CONCLUSÕES

8. CONCLUSÕES

8.1. Correlação dos resultados de IgG, IgM e avides de IgG entre as diferentes técnicas

À exceção da dosagem de IgM pelas técnicas de ELISA e ELFA, não houve correlação entre os resultados expressos pelas diferentes técnicas.

8.2. Dinâmica dos anticorpos IgG, IgM, IgA e avides de IgG anti- *T. gondii* durante o período de doze meses do estudo longitudinal

Ao final de um ano a permanência de testes IgM positivo foi de 83,8% para ELISA, 83,3% para ELFA, 32,6% para citometria de fluxo e 29% para IFI. A IgA variou de 89,5% no primeiro mês para 33,5% no 12º mês. Os resultados da curva de avides de IgG, obtidos com a técnica ELFA demonstraram incremento gradual e consistente ao longo dos 12 meses, enquanto pela técnica de CF o aumento da avides de IgG foi mais marcante e acentuado.

8.3. Técnica de citometria de fluxo no estudo de subclasses de IgG no diagnóstico temporal da infecção por *T. gondii*

As subclasses podem ser empregadas no diagnóstico da toxoplasmose, sem vantagens em relação à IgG total e sem utilidade para distinguir a fase da doença. Embora as subclasses IgG2 e IgG4 sejam positivas em todos os casos no grupo 1, não distinguem a fase de infecção já que permanecem positivas ao final de 12 meses. A IgG1 apresenta comportamento semelhante ao da IgG total e a IgG3 separa o 2, 3 e 4 mês do oitavo em diante e pode ser utilizada como teste de segunda linha na análise combinada de dois testes, com ponto de corte ajustado para o diagnóstico de infecção aguda.

8.4. Desempenho de cada teste na identificação da infecção aguda e propor pontos de corte.

Os testes para IgM e de avides de IgG podem separar os grupos 1 e 3 e com menor poder, exceto a IFI, também podem separar os grupos 1 e 2. Os testes de avides de

IgG apresentam melhor desempenho, com vantagem sobre os testes para IgM. A CF distingue melhor que o ELFA o grupo agudo do convalescente tardio.

8.5. Identificar a melhor combinação de testes que discrimina a as fases da doença.

A utilização do conjunto de testes - avidéz de IgG por citometria de fluxo, IgM ELFA (ou ELISA) e avidéz de IgG ELFA - em pacientes sintomáticos permite separar com média de acerto de 75,1% o grupo agudo do convalescente tardio, podendo contribuir na avaliação diagnóstica de casos suspeitos de toxoplasmose aguda.

Considerações finais

O painel de amostras seqüenciais, em que um mesmo indivíduo com doença aguda foi acompanhado desde o início dos sintomas e ao longo de um ano, resultando em sete coletas de sangue, constitui um importante diferencial entre os estudos encontrados na literatura. Tal painel permite classificar com segurança o tempo de evolução da doença e estabelecer sua relação com os resultados laboratoriais.

Este estudo avaliou pela primeira vez a técnica de CF para detecção da avidéz de IgG, subclasses de IgG e IgM anti-Toxoplasma, e demonstrou que essa poderá ser importante ferramenta para o diagnóstico sorológico das fases aguda e convalescente tardia da toxoplasmose humana sintomática.

PROPOSIÇÕES

9. PROPOSIÇÕES

Embora inespecíficos, os sintomas da toxoplasmose aguda reforçam a necessidade de inclusão desta infecção no diagnóstico diferencial das adenomegalias, febris ou não, e dos casos que cursam com gravidade acompanhada de cansaço/mal estar/adinamia, cefaléia, mialgia e comprometimento do estado geral. O exame de fundo de olho deve fazer parte da avaliação inicial e do acompanhamento destes pacientes.

A alta prevalência de adinamia e o incomodo trazido aos pacientes ao longo da evolução impõe esta abordagem nos protocolos de atendimento, já à primeira entrevista.

A ausência de correlação linear, para o caso de avaliações que se alteram no tempo (estudos longitudinais) exige uma abordagem apropriada.

Otimizar o uso dos citômetros de fluxo dos laboratórios de referência da rede pública de saúde, implantando o teste de avidéz de IgG por CF para o diagnóstico diferencial da infecção aguda por *Toxoplasma gondii*.

REFERÊNCIAS

10. REFERÊNCIAS

- Abbas Ak, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 6ª ed., Philadelphia: Elsevier Saunders; 2008. p. 32.
- Amendoeira MR, Sobral CA, Teva A, de Lima JN, Klein CH. Serological survey of *Toxoplasma gondii* infection in isolated Amerindians, Mato Grosso. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003 Nov-Dec;36(6):671-6.
- Areal KR. Estudo de soroprevalência de toxoplasmose em gestantes atendidas na rede municipal de saúde de Vitória, ES [dissertação]. Vitória (ES): Universidade Federal do Espírito Santo, 2007.
- Ajzenberg D, Bañuls AL, Su C, Dumètre A, Demar M, Carme B, Dardé ML. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*. 2004 Sep;34(10):1185-96.
- Ashburn D, Joss AW, Pennington TH, Ho-Yen DO. Do IgA, IgE, and IgG avidity tests have any value in the diagnosis of toxoplasma infection in pregnancy? *J Clin Pathol*. 1998 Apr;51(4):312-5.
- Auer H, Vander-Möse A, Picher O, Walochnik J, Aspöck H. Clinical and diagnostic relevance of the *Toxoplasma* IgG avidity test in the serological surveillance of pregnant women in Austria. *Parasitol Res*. 2000 Dec;86(12):965-70.
- Bahia-Oliveira LM, Jones JL, Azevedo-Silva J, Alves CC, Oréfica F, Addiss DG. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2003 Jan;9(1):55-62.
- Barbosa IR, de Carvalho Xavier Holanda CM, de Andrade-Neto VF. Toxoplasmosis screening and risk factors amongst pregnant females in Natal, northeastern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2009 Apr;103(4):377-82.
- Baril L, Ancelle T, Goulet V, Thulliez P, Tirard-Fleury V, Carme B. Risk factors for *Toxoplasma* infection in pregnancy: a case-control study in France. *Scand J Infect Dis*. 1999;31(3):305-9.
- Barros GC, Sessa PA, Barros RC. Toxoplasmosis in medical students. *Rev Inst Med Trop*. 1979 Jul-Aug;21(4):198-201.
- Beghetto E, Buffolano W, Spadoni A, Del Pezzo M, Di Cristina M, Minenkova O, Petersen E, Felici F, Gargano N. Use of an immunoglobulin G avidity assay based on recombinant antigens for diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *J Clin Microbiol*. 2003 Dec;41(12):5414-8.
- Bobić B, Sibalić D, Djurković-Djaković O. High levels of IgM antibodies specific for *Toxoplasma gondii* in pregnancy 12 years after primary toxoplasma infection. *Gynecol Obstet Invest*. 1991;31(3):182-4.
- Bóia MN, Carvalho-Costa FA, Sodrê FC, Pinto GM, Amendoeira MR. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among indian people living in Iauaretê, São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2008 Jan-Feb;50(1):17-20.

Bowie WR, King AS, Werker DH, Isaac-Renton JL, Bell A, Eng SB, Marion SA. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. The BC Toxoplasma Investigation Team. *Lancet*. 1997 Jul 19;350(9072):173-7.

Burnett AJ, Shortt SG, Isaac-Renton J, King A, Werker D, Bowie WR. Multiple cases of acquired toxoplasmosis retinitis presenting in an outbreak. *Ophthalmology*. 1998 Jun;105(6):1032-7.

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

Camargo ME, Leser PG. Diagnostic information from serological tests in human toxoplasmosis. II Evolutionary study of antibodies and serological patterns in acquired toxoplasmosis, as detected by hemagglutination, complement fixation, IgG and IgM-immunofluorescence tests. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1976 Jul-Aug;18(4):227-38.

Candolfi E, Pastor R, Huber R, Filisetti D, Villard O. IgG avidity assay firms up the diagnosis of acute toxoplasmosis on the first serum sample in immunocompetent pregnant women. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007 May;58(1):83-8. Epub 2007 Mar 21.

Cavalcante GT, Aguilar DM, Camargo LM, Labruna MB, de Andrade HF, Meireles LR, Dubey JP, Thulliez P, Dias RA, Gennari SM. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in humans from rural Western Amazon, Brazil. *J Parasitol*. 2006 Jun;92(3):647-9.

Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for preventing opportunistic infections among HIV-infected persons 2002 recommendation of the U.S. Public Health Service and the Infectious Diseases Society of America. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2002; 51(No.1 RR-8):1.

Choi WY, Nam HW, Kwak NH, Huh W, Kim YR, Kang MW, Cho SY, Dubey JP. Foodborne outbreaks of human toxoplasmosis. *J Infect Dis*. 1997 May;175(5):1280-2.

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

Contreras M, Schenone H, Salinas P, Sandoval L, Rojas A, Villarroel F, Solis F. Seroepidemiology of human toxoplasmosis in Chile. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1996 Nov-Dec;38(6):431-5.

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

Cozon G, Roure C, Lizard G, Greenland T, Larget-Piet D, Gandilhon F, Peyron F. An improved assay for the detection of *Toxoplasma gondii* antibodies in human serum by flow cytometry. *Cytometry*. 1993;14(5):569-75.

Cozon GJ, Ferrandiz J, Thulliez P, Peyron F. Flow cytometric application of the Sabin and Feldman dye test in the diagnosis of toxoplasmosis. *J Microbiol Methods*. 1999 Oct;38(1-2):131-6

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

Cox FE. History of human parasitic diseases. *Infect Dis Clin North Am*. 2004 Jun;18(2):171-88

Dannemann BR, Vaughan WC, Thulliez P, Remington JS. Differential agglutination test for diagnosis of recently acquired infection with *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol*. 1990 Sep;28(9):1928-33.

Dardé ML. Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. *Ann Ist Super Sanita*. 2004;40(1):57-63.

Dardé ML. *Toxoplasma gondii*, "new" genotypes and virulence. *Parasite*. 2008 Sep;15(3):366-71.

de Moura L, Bahia-Oliveira LM, Wada MY, Jones JL, Tuboi SH, Carmo EH, Ramalho WM, Camargo NJ, Trevisan R, Graça RM, da Silva AJ, Moura I, Dubey JP, Garrett DO. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. *Emerg Infect Dis*. 2006 Feb;12(2):326-9.

Demar M, Ajzenberg D, Maubon D, Djossou F, Panchoe D, Punwasi W, Valery N, Peneau C, Daigre JL, Aznar C, Cottrelle B, Terzan L, Dardé ML, Carme B. Fatal outbreak of human toxoplasmosis along the Maroni River: epidemiological, clinical, and parasitological aspects. *Clin Infect Dis*. 2007 Oct 1;45(7):e88-95.

Denkers E Y., Gazzinelli RT. Regulation and Function of T-Cell-Mediated Immunity during *Toxoplasma gondii* Infection. *Clin Microbiol Rev*. 1998 October; 11(4): 569–588.

Derouin F, Sulcebe G, Ballet JJ. Sequential determination of IgG subclasses and IgA specific antibodies in primary and reactivating toxoplasmosis. *Biomed Pharmacother*. 1987;41(8):429-33.

Desmonts G, Couvreur J, Alison F, Baudelot J, Gerbeaux J, Lelong M. Epidemiological study on toxoplasmosis: the influence of cooking slaughter-animal meat on the incidence of human infection. *Rev Fr Etud Clin Biol*. 1965 Nov;10(9):952-8.

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

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

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

Dubey JP, Navarro IT, Sreekumar C, Dahl E, Freire RL, Kawabata HH, Vianna MC, Kwok OC, Shen SK, Thulliez P, Lehmann T. *Toxoplasma gondii* infections in cats from Paraná, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. *J Parasitol*. 2004 Aug;90(4):721-6

Dubey JP, Velmurugan GV, Chockalingam A, Pena HF, de Oliveira LN, Leifer CA, Gennari SM, Bahia Oliveira LM, Su C. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil. *Vet Parasitol*. 2008 Nov 7;157(3-4):299-305.

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

Durlach RA, Kaufer F, Carral L, Hirt J Toxoplasmic lymphadenitis--clinical and serologic profile. *Clin Microbiol Infect*. 2003 Jul;9(7):625-31.

Elbez-Rubinstein A, Ajzenberg D, Dardé ML, Cohen R, Dumètre A, Yera H, Gondon E, Janaud JC, Thulliez P. Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: case report, strain characterization, experimental model of reinfection, and review. *J Infect Dis*. 2009 Jan 15;199(2):280-5.

Elnahas A, Gerais AS, Elbashir MI, Eldien ES, Adam I. Toxoplasmosis in pregnant Sudanese women. *Saudi Med J*. 2003 Aug;24(8):868-70.

Evengård B, Petersson K, Engman ML, Wiklund S, Ivarsson SA, Teär-Fahnehjelm K, Forsgren M, Gilbert R, Malm G. Low incidence of toxoplasma infection during pregnancy and in newborns in Sweden. *Epidemiol Infect*. 2001 Aug;127(1):121-7.

Ferreira Ade M, Vitor RW, Gazzinelli RT, Melo MN. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. *Infect Genet Evol*. 2006 Jan;6(1):22-31.

Figueiró-Filho EA, Senefonte FR, Lopes AH, de Moraes OO, Souza Júnior VG, Maia TL, Duarte G Frequency of HIV-1, rubella, syphilis, toxoplasmosis, cytomegalovirus, simple herpes virus, hepatitis B, hepatitis C, Chagas disease and HTLV I/II infection in pregnant women of State of Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007 Mar-Apr;40(2):181-7.

Fleis JL. Statistical methods for rates and proportions. 2 ed. John Wiley & Sons, New York, 1981.

Flori P, Belleste B, Crampe C, Maudry A, Patural H, Chauleur C, Hafid J, Raberin H, Tran Manh Sung R. A technique for dating toxoplasmosis in pregnancy and comparison with the Vidas anti-toxoplasma IgG avidity test. *Clin Microbiol Infect*. 2008 Mar;14(3):242-9.

França, JL. Manual para normalização de publicações técnico-científicas. 8ª ed. revista e aumenta. Belo Horizonte, Editora UFMG, 2007. 255p.

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

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

Fricker-Hidalgo H, Saddoux C, Suchel-Jambon AS, Romand S, Foussadier A, Pelloux H, Thulliez P. New Vidas assay for *Toxoplasma*-specific IgG avidity: evaluation on 603 sera. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2006 Oct;56(2):167-72.

Friedmann CT, Knox DL. Variations in recurrent active toxoplasmic retinochoroiditis. *Arch Ophthalmol*. 1969 Apr;81(4):481-93.

Gallino A, Maggiorini M, Kiowski W, Martin X, Wunderli W, Schneider J, Turina M, Follath F. Toxoplasmosis in heart transplant recipients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1996 May;15(5):389-93.

Gilbert RE, Stanford MR. Is ocular toxoplasmosis caused by prenatal or postnatal infection? *Br J Ophthalmol*. 2000 Feb;84(2):224-6.

Gilbert RE, See SE, Jones LV, Stanford MS. Antibiotics versus control for toxoplasma retinochoroiditis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2002.

Giraldo M, Cannizzaro H, Ferguson MAJ, Almeida IC, Gazzinelli RT. Fractionation of membrane components from tachyzoite forms of *Toxoplasma gondii*: Differential recognition by immunoglobulin M (IgM) and IgG present in sera from patients with acute or chronic toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*. 2000 Apr 38 (4): 1453-60.

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

Gras L, Gilbert RE, Wallon M, Peyron F, Cortina-Borja M. Duration of the IgM response in women acquiring *Toxoplasma gondii* during pregnancy: implications for clinical practice and cross-sectional incidence studies. *Epidemiol Infect*. 2004 Jun;132(3):541-8.

Guerina NG, Hsu HW, Meissner HC, Maguire JH, Lynfield R, Stechenberg B, Abrams I, Pasternack MS, Hoff R, Eaton RB, *et al*. Neonatal serologic screening and early treatment for congenital *Toxoplasma gondii* infection. The New England Regional Toxoplasma Working Group. *N Engl J Med*. 1994 Jun 30;330(26):1858-63.

Hedman K, Seppälä I. Recent rubella virus infection indicated by a low avidity of specific IgG. *J Clin Immunol*. 1988 May;8(3):214-21.

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

Hohlfeld P., Daffos F, Costa JM, Thulliez P., Aufrant C., Couvreur J., MacAleese J., Descombey D., Forestier F. Fetal toxoplasmosis: outcome of pregnancy and infant follow-up after in utero treatment. *P. Pediatr* 115: 765-69, 1989.

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

Hung CC, Chen MY, Hsieh SM, Hsiao CF, Sheng WH, Chang SC. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection and incidence of toxoplasma encephalitis in non-haemophilic HIV-1-infected adults in Taiwan. *Int J STD AIDS*. 2005 Apr;16(4):302-6.

Huskinson J, Stepick-Biek PN, Araujo FG, Thulliez P, Suzuki Y, Remington JS. Toxoplasma antigens recognized by immunoglobulin G subclasses during acute and chronic infection. *J Clin Microbiol*. 1989 Sep;27(9):2031-8

Hussain R, Grogl M, Ottesen EA. IgG antibody subclasses in human filariasis. Differential subclasses recognition of parasites antigens correlates with different clinical manifestations of infection. *J Immunol*. 1987 Oct 15;139(8):2794-8

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

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements of Manuscripts submitted to Biomedical Journals. WWW.icmje.org. Acesso em 22/11/2005.

Jenun PA, Stray-Petersen B, Gundersen AG. Improved diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in early pregnancy by determination of antitoxoplasma immunoglobulin G avidity. *J Clin Microbiol* 35: 1972-77, 1997.

Jenum PA, Stray-Pedersen B, Melby KK, Kapperud G, Whitelaw A, Eskild A, Eng J. Incidence of *Toxoplasma gondii* infection in 35,940 pregnant women in Norway and pregnancy outcome for infected women. *J Clin Microbiol*. 1998 Oct;36(10):2900-6.

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

Jones JL, Kruszon-Moran D, Wilson M. *Toxoplasma gondii* infection in the United States, 1999-2000. *Emerg Infect Dis*. 2003 Nov;9(11):1371-4.

Jones JL, Muccioli C, Belfort R Jr, Holland GN, Roberts JM, Silveira C. Recently acquired *Toxoplasma gondii* infection, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2006 Apr;12(4):582-7

Johnson, RAE, Wichern, D. W. Applied Multivariate Statistical Analysis. New Jersey: Prentice-Hall, 1992.

Kaplan JE, Benson C, Holmes KH, Brooks JT, Pau A, Masur H; Centers for Disease Control and Prevention (CDC); National Institutes of Health; HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. Guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. *MMWR Recomm Rep*. 2009 Apr 10;58(RR-4):1-207.

Khan A, Jordan C, Muccioli C, Vallochi AL, Rizzo LV, Belfort R Jr, Vitor RW, Silveira C, Sibley LD. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2006 Jun;12(6):942-9.

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

Koppe JG, Loewer-Sieger DH, de Roever-Bonnet H. Results of 20-year follow-up of congenital toxoplasmosis. *Lancet*. 1986 Feb 1;1(8475):254-6.

Lang C, Gross U, Lüder CG. Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res*. 2007 Jan;100(2):191-203.

Lappalainen M, Koskela P, Koskiniemi M, Ammälä P, Hiilesmaa V, Teramo K, Raivio KO, Remington JS, Hedman K. Toxoplasmosis acquired during pregnancy: improved serodiagnosis based on avidity of IgG. *J Infect Dis.* 1993 Mar;167(3):691-7.

Lachaud L, Calas O, Picot MC, Albaba S, Bourgeois N, Pratlong F. Value of 2 IgG avidity commercial tests used alone or in association to date toxoplasmosis contamination. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009 Jul;64(3):267-74.

Lefevre-Pettazzoni M, Le Cam S, Wallon M, Peyron F. Delayed maturation of immunoglobulin G avidity: implication for the diagnosis of toxoplasmosis in pregnant women. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2006 Nov;25(11):687-93.

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

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

Lindström I, Kaddu-Mulindwa DH, Kironde F, Lindh J. Prevalence of latent and reactivated *Toxoplasma gondii* parasites in HIV-patients from Uganda. *Acta Trop.* 2006 Dec;100(3):218-22.

Lopes FM, Gonçalves DD, Dos Reis CR, Breganó RM, Freire RL, de Freitas JC, Navarro IT. Presence of domesticated cats and visual impairment associated to *Toxoplasma gondii* serum positive children at an elementary school in Jataizinho, state of Paraná, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2008 Jan-Mar;17(1):12-5.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951 Nov;193(1):265-75.

Luft BJ, Conley F, Remington JS, Laverdiere M, Wagner KF, Levine JF, Craven PC, Strandberg DA, File TM, Rice N, Meunier-Carpentier F. Outbreak of central-nervous-system toxoplasmosis in western Europe and North America. *Lancet.* 1983 Apr 9;1(8328):781-4.

Luft BJ, Brooks RG, Conley FK, McCabe RE, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immune deficiency syndrome. *JAMA.* 1984 Aug 17;252(7):913-7.

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

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

Marx-Chemla C, Puygauthier-Toubas D, Foudrinier F, Dorangeon PH, Leulier J, Quereux C, Leroux B, Pinon JM. Should immunologic monitoring of toxoplasmosis seronegative pregnant women stop at delivery? *Presse Med.* 1990 Mar 3;19(8):367-8.

Maubon D, Ajzenberg D, Brenier-Pinchart MP, Dardé ML, Pelloux H. What are the respective host and parasite contributions to toxoplasmosis? *Trends Parasitol.* 2008 Jul;24(7):299-303.

Masur H, Jones TC, Lempert JA, Cherubini TD. Outbreak of toxoplasmosis in a family and documentation of acquired retinochoroiditis. *Am J Med.* 1978 Mar;64(3):396-402

McCabe RE, Brooks RG, Dorfman RF, Remington JS. Clinical spectrum in 107 cases of toxoplasmic lymphadenopathy. *Rev Infect Dis.* 1987 Jul-Aug;9(4):754-74.

McQuillan GM, Kruszon-Moran D, Kottiri BJ, Curtin LR, Lucas JW, Kington RS. Racial and ethnic differences in the seroprevalence of 6 infectious diseases in the United States: data from NHANES III, 1988-1994. *Am J Public Health.* 2004 Nov;94(11):1952-8.

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

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

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

Montoya JG, Huffman HB, Remington JS. Evaluation of the immunoglobulin G avidity test for diagnosis of toxoplasmic lymphadenopathy. *J Clin Microbiol.* 2004 Oct;42(10):4627-31.

Montoya JG, Remington JS. *Toxoplasma gondii*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R eds, Mandell, Douglas, and Bennetts' Principles and Practice of Infectious Disease, 5th Ed. Philadelphia: Chirchill Livingstone, 2000, pp 2858-2888.

Morisset S, Peyron F, Lobry JR, Garweg J, Ferrandiz J, Musset K, Gomez-Marin JE, de la Torre A, Demar M, Carme B, Mercier C, Garin JF, Cesbron-Delauw MF. Serotyping of *Toxoplasma gondii*: striking homogeneous pattern between symptomatic and asymptomatic infections within Europe and South America. *Microbes Infect.* 2008 Jun;10(7):742-7.

Nissapatorn V, Noor Azmi MA, Cho SM, Fong MY, Init I, Rohela M, Khairul Anuar A, Quek KF, Latt HM. Toxoplasmosis: prevalence and risk factors. *J Obstet Gynaecol.* 2003 Nov;23(6):618-24.

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

Naot Y, Guptill DR, Mullenax J, Remington JS. Characterization of *Toxoplasma gondii* antigens that react with human immunoglobulin M and immunoglobulin G antibodies. *Infect Immun.* 1983 Jul;41(1):331-8.

O'Connell S, Guy EC, Dawson SJ, Francis JM, Joynson DH. Chronic active toxoplasmosis in an immunocompetent patient. *J Infect.* 1993 Nov;27(3):305-10.

Ottesen, EA, Skvavil F, Tripathy SP, Poindexter RW, Hussain R. Proeminence of IgG4 in the IgG antibody response to human filariasis. *J Immunol.* 1985 Apr;134(4):2707-12.

Paul M. Immunoglobulin G avidity in diagnosis of toxoplasmic lymphadenopathy and ocular toxoplasmosis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1999 Jul;6(4):514-8.

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

Pena HF, Gennari SM, Dubey JP, Su C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *Int J Parasitol*. 2008 Apr;38(5):561-9.

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

Peyron F, Wallon M, Liou C, Garner P. Treatments for toxoplasmosis in pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2000;(2):CD001684.

Pinon JM, Toubas D, Marx C, Mougeot G, Bonnin A, Bonhomme A, Villaume M, Foudrinier F, Lèpan H. Detection of specific immunoglobulin E in patients with toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*. 1990 Aug;28(8):1739-43

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

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

Räisänen S. Toxoplasmosis transmitted by blood transfusions. *Transfusion*. 1978 May-Jun;18(3):329-32.

Reiter-Owona I, Petersen E, Joynson D, Aspöck H, Dardé ML, Disko R, Dreazen O, Dumon H, Grillo R, Gross U, Hayde M, Holliman R, Ho-Yen DO, Janitschke K, Jenum PA, Naser K, Olszewski M, Thulliez P, Seitz HM. The past and present role of the Sabin-Feldman dye test in the serodiagnosis of toxoplasmosis. *Bull World Health Organ*. 1999;77(11):929-35.

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

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

Reynolds ES, Walls KW, Pfeiffer RI. Generalized toxoplasmosis following renal transplantation. Report of a case. *Arch Intern Med*. 1966 Oct;118(4):401-5.

Roberts A, Hedman K, Luyasu V, Zufferey J, Bessièeres MH, Blatz RM, Candolfi E, Decoster A, Enders G, Gross U, Guy E, Hayde M, Ho-Yen D, Johnson J, Lécolier B, Naessens A, Pelloux H, Thulliez P, Petersen E. Multicenter evaluation of strategies for serodiagnosis of primary infection with *Toxoplasma gondii*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2001 Jul;20(7):467-74

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

Sabin AB. Toxoplasmic encephalitis in children. *JAMA.* 1941 116: 801-807.

Sabin AB, Feldman HA. Dyes as Microchemical Indicators of a New Immunity Phenomenon Affecting a Protozoon Parasite (*Toxoplasma*). *Science.* 1948 Dec 10;108(2815):660-663.

Sacktor N, Lyles RH, Skolasky R, Kleeberger C, Selnes OA, Miller EN, Becker JT, Cohen B, McArthur JC; Multicenter AIDS Cohort Study. HIV-associated neurologic disease incidence changes. Multicenter AIDS Cohort Study, 1990-1998. *Neurology.* 2001 Jan 23;56(2):257-60.

Sáfadi MA, Berezin EN, Farhat CK, Carvalho ES. Clinical presentation and follow up of children with congenital toxoplasmosis in Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2003 Oct;7(5):325-31

Spalding SM, Amendoeira MR, Ribeiro LC, Silveira, C, Garcia AP, Camilo-Coura L. Estudo prospectivo de gestantes e seus bebês com risco de transmissão de toxoplasmose congênita em município do Rio Grande do Sul. *Soc Bras Med Trop* 2003 Jul-Aug;36(4):483-91.

Stepick-Biek P, Thulliez P, Araujo FG, Remington JS. IgA antibodies for diagnosis of acute congenital and acquired toxoplasmosis. *J Infect Dis.* 1990 Jul;162(1):270-3.

Silveira C, Belfort R Jr, Muccioli C, Abreu MT, Martins MC, Victora C, Nussenblatt RB, Holland GN. A follow-up study of *Toxoplasma gondii* infection in southern Brazil. *Am J Ophthalmol.* 2001 Mar;131(3):351-4

Singh S, Pandit AJ. Incidence and prevalence of toxoplasmosis in Indian pregnant women: a prospective study. *Am J Reprod Immunol.* 2004 Oct;52(4):276-83

Strom J. Toxoplasmosis due to laboratory infection in two adults. *Acta Med Scand.* 1951;139(3):244-52.

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

Suzuki Y, Thulliez P, Desmonts G, Remington JS. Antigen(s) responsible for immunoglobulin G responses specific for the acute stage of *Toxoplasma* infection in humans. *J Clin Microbiol.* 1988 May;26(5):901-5.

Takahashi EE, Rossi CL. IgM and IgA antibody responses in 12 cases of human acquired toxoplasmosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1997 Nov-Dec;39(6):327-31

Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol.* 2000 Nov;30(12-13):1217-58.

Thulliez P, Daffos F, Forestier F. Diagnosis of *Toxoplasma* infection in the pregnant woman and the unborn child: current problems. *Scand J Infect Dis Suppl.* 1992;84:18-22.

Torrey EF, Yolken RH. *Toxoplasma gondii* and schizophrenia. *Emerg Infect Dis*. 2003 Nov;9(11):1375-80.

Uneke CJ, Duhlińska DD, Njoku MO, Ngwu BA. Seroprevalence of acquired toxoplasmosis in HIV-infected and apparently healthy individuals in Jos, Nigeria. *Parassitologia*. 2005 Jun;47(2):233-6.

van Nunen MC, van der Veen J. Examination for toxoplasmosis by the fluorescent antibody technique. *Trop Geogr Med*. 1965 Sep;17(3):246-53.

Vogel N, Kirisits M, Michael E, Bach H, Hostetter M, Boyer K, Simpson R, Holfels E, Hopkins J, Mack D, Mets MB, Swisher CN, Patel D, Roizen N, Stein L, Stein M, Withers S, Mui E, Egwuagu C, Remington J, Dorfman R, McLeod R. Congenital toxoplasmosis transmitted from an immunologically competent mother infected before conception. *Clin Infect Dis*. 1996 Nov;23(5):1055-60.

Wagner, DK, Nelson, EE, Walsh, CB, Reimer, CB, Hederson, FW, Murphy BR. Differential immunoglobulin G subclasses antibody titers to respiratory syncytial virus F and G glycoproteins in adults. *J Clin Microbiol*. 1987 Apr;25(4):748-50.

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

Wong SY, Hajdu MP, Ramirez R, Thulliez P, McLeod R, Remington JS. Role of specific immunoglobulin E in diagnosis of acute toxoplasma infection and toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*. 1993 Nov;31(11):2952-9.

Wong SY, Remington JS. Toxoplasmosis in pregnancy. *Clin Infect Dis*. 1994 Jun;18(6):853-61;

APÊNDICES

Apêndice A

TERMO DE CONSENTIMENTO ESCLARECIDO

TÍTULO DO PROJETO

Dinâmica de marcadores sorológicos na infecção aguda recente por *Toxoplasma gondii*

SEUS DIREITOS

Este termo de consentimento irá informá-lo sobre a pesquisa para a qual você está sendo convidado a participar. Esta pesquisa irá determinar se exames de sangue em épocas diferentes podem estimar a época em que ocorreu a infecção da toxoplasmose. Após suas perguntas e dúvidas em relação ao estudo terem sido respondidas e se você concordar em participar do estudo, você será solicitado a assinar este termo de consentimento. Você também receberá uma cópia deste documento para guardar. Sua participação neste estudo é voluntária. Você poderá deixar o estudo em qualquer momento. A sua decisão em não participar ou de se retirar do estudo depois do mesmo já ter se iniciado não acarretará nenhum prejuízo ao tratamento médico da sua doença ou de seus familiares em nosso hospital, hoje ou no futuro. Você deve tirar todas as dúvidas que possam surgir após ter lido e ouvido a explicações deste termo de consentimento.

JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

A toxoplasmose é uma doença infecciosa causada por um germe (protozoário) chamado *Toxoplasma gondii* muito comum no Brasil. Na maioria dos casos a toxoplasmose é uma doença branda e não traz maiores conseqüência à saúde. Entretanto em um pequeno número de casos a doença pode ser grave e afetar os olhos, cérebro, coração e outras partes do corpo. A maioria dos casos da doença produz pouco ou nenhum sintoma. Os principais sintomas da toxoplasmose são, febre, dor de garganta, dor no corpo e aumento dos gânglios no pescoço, nas virilhas e debaixo do braço. As pessoas adquirem a doença comendo carne crua ou mal cozida ou comendo alimentos contaminados pelos germes eliminados nas fezes de gatos. A Dra. Geisa B. Barros está fazendo uma pesquisa para averiguar se exames de sangue repetidos são capazes de estimar a data da infecção. Isto é importante em situações como na gravidez em que a mãe pode passar a doença para o feto se o diagnóstico e tratamento adequados não forem feitos.

PROCEDIMENTOS

Avaliações do estudo: Se você concordar em participar do estudo, você fará exames de sangue para confirmar o seu diagnóstico clínico de toxoplasmose e para excluir doenças infecciosas com quadro clínico parecido ou que possam comprometer as defesas do organismo. Se este exame for positivo novos exames de sangue serão feitos em você a cada mês nos primeiros quatro meses, a cada dois meses entre o quarto e o 12º mês. Portanto serão feitos ao todo 8 exames de sangue. Em cada exame de sangue serão retirados aproximadamente 10 mililitros de sangue da veia do seu braço, o correspondente a 1 colher das de sopa. Esse sangue será utilizado para fazer exames que irão diagnosticar sua doença e acompanhar o processo de cura da mesma. No momento da primeira consulta também será realizado exame de fundo de olho para saber se a doença também atingiu a retina do seu olho. Caso isto tenha ocorrido, e houver sinais de doença em atividade, você será tratado e poderá continuar a participar do estudo.

RISCOS POR PARTICIPAR DO ESTUDO

Possíveis reações da Coleta de Sangue As reações da coleta de sangue incluem dor no local da punção, hematoma e, raramente, infecção. Confidencialidade Suas informações pessoais, os resultados dos seus exames (informações médicas) e o seu número de registro de participação no estudo serão mantidos confidenciais. Seu nome não será usado em nenhum relatório ou publicação sobre este estudo.

BENEFÍCIOS POR PARTICIPAR DO ESTUDO

Você não terá benefícios diretos pela sua participação neste estudo. Contudo, informações obtidas a partir desta pesquisa poderão ajudar pacientes com toxoplasmose no futuro.

CUSTOS

Você não terá despesas por participar do estudo. Todos os gastos com os exames de sangue serão pagos pelo estudo. Você não receberá nenhum tipo de pagamento pela sua participação no mesmo.

PERGUNTAS

Se você tiver qualquer dúvida sobre a sua participação no estudo, você poderá entrar em contato com a Dra Geisa no telefone 27-3335-7210 ou 9979-5067. Se você tiver

alguma dúvida ou perguntas sobre os seus direitos como voluntário desta pesquisa, você poderá entrar em contato com o Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira, Presidente do Comitê de Ética do Centro Biomédico da UFES no telefone 27-3335- 7243.

CONSENTIMENTO A SUA PARTICIPAÇÃO NESTE ESTUDO É VOLUNTÁRIA

Você tem o direito de recusar ou de se retirar do estudo a qualquer momento sem riscos para o seu tratamento médico. Termo de consentimento Livre e Esclarecido: Eu recebi uma cópia deste termo de consentimento e sei que uma cópia ficará guardada no meu arquivo do estudo. Eu entendo que posso deixar o estudo a qualquer momento que quiser ou que o médico do estudo pode me pedir para deixar o estudo se ele entender que esta decisão é melhor para os meus interesses. Eu entendo que se eu assinar ou colocar minha impressão digital no espaço abaixo, eu estou concordando em participar do estudo e a realizar todos os procedimentos do mesmo estabelecidos neste documento.

_____ Assinatura do
voluntário Nome do voluntário (impresso) Data/Hora

Eu expliquei os objetivos deste estudo para o voluntário. Tenho plena convicção que ele/ela entendeu os objetivos, riscos e benefícios da sua participação no estudo.

_____ Assinatura
do Investigador Nome do Investigador (impresso) Data/Hora

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA
MENORES DE IDADE.

Eu, _____ com 18 anos de
(nome do pai ou responsável),

idade ou mais, detentor de integral competência para dar consentimento a _____
_____, faço deste menor voluntário para
(nome do paciente menor)

participar do estudo denominado **de marcadores sorológicos na infecção aguda recente pelo *Toxoplasma gondii***. As implicações e sua participação voluntária, incluindo a natureza, duração e objetivo do estudo, os métodos e meios através dos quais ele será conduzido, assim como as inconveniências e riscos esperados foram explicados a mim. Tive a oportunidade de esclarecer todas as dúvidas que eu tinha a respeito do estudo. Entendo que em qualquer momento **posso** desistir da participação do meu filho/filha no estudo sem sofrer nenhuma punição ou perda de direitos ou Benefício a que ele tem direito. Eu recebi urna copia deste termo de consentimento.

Nome do voluntário

Ass. do Pai ou Responsável

Data/Hora

Apêndice B- Filha Clínica

**Dinâmica de marcadores sorológicos na infecção aguda recente pelo
*Toxoplasma gondii***

Nome: _____

Data de Nascimento: ____/____/____ Idade: _____ Sexo: _____

Data do Atendimento: ____/____/____

Endereço/telefone: _____
_____HDA: _____
_____ Febre Adenomegalia
(Localização) _____ Mal estar Adinamia
(outros) _____**História**Epidemiológica: _____
_____ Animais em casa _____ Hábitos alimentares: carne crua / mal passada, quibe cru

Quintal / Jardinagem: _____

Exame físico: _____

Fundo de olho: _____

Exames:

Hemograma- _____

Exames laboratoriais (diagnóstico diferencial) _____

_____**Datas programadas para coleta:**

1ª Amostra ____/____/____	2ª Amostra ____/____/____	3ª Amostra ____/____/____	4ª Amostra ____/____/____
5ª Amostra ____/____/____	6ª Amostra ____/____/____	7ª Amostra ____/____/____	8ª Amostra ____/____/____

Apêndice C: GRÁFICOS

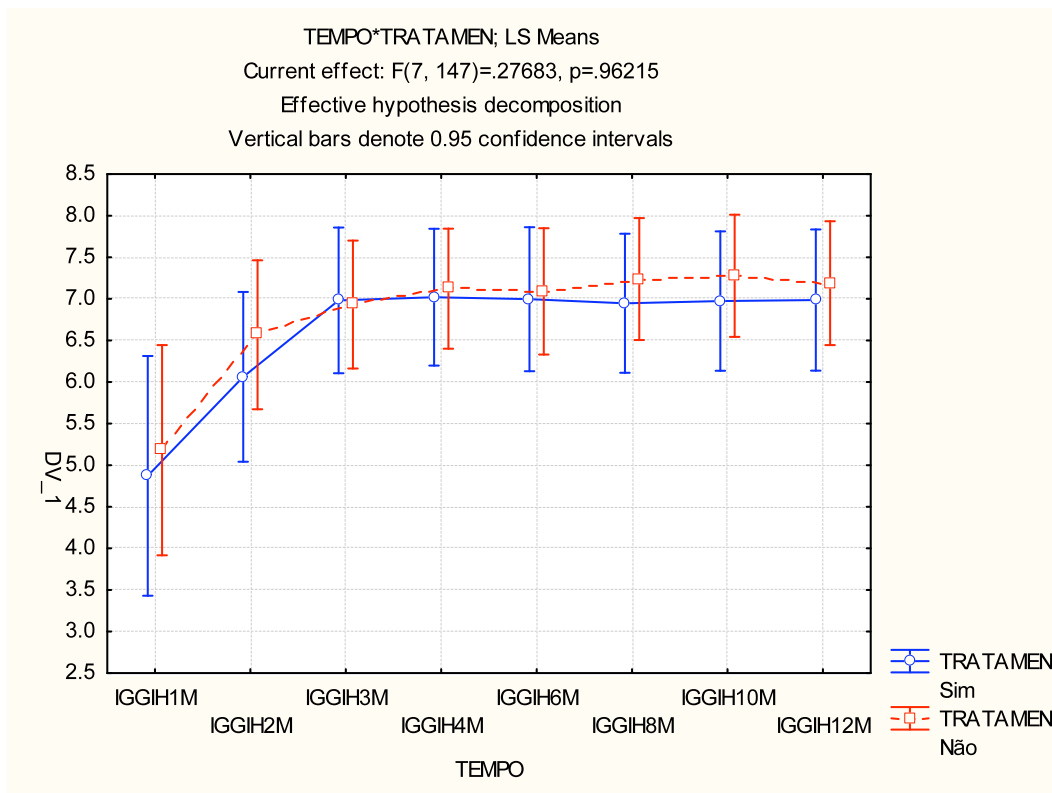


GRAFICO 15- Médias de anticorpos IgG ELISA *in house* (índice) por mês e por grupo de tratamento

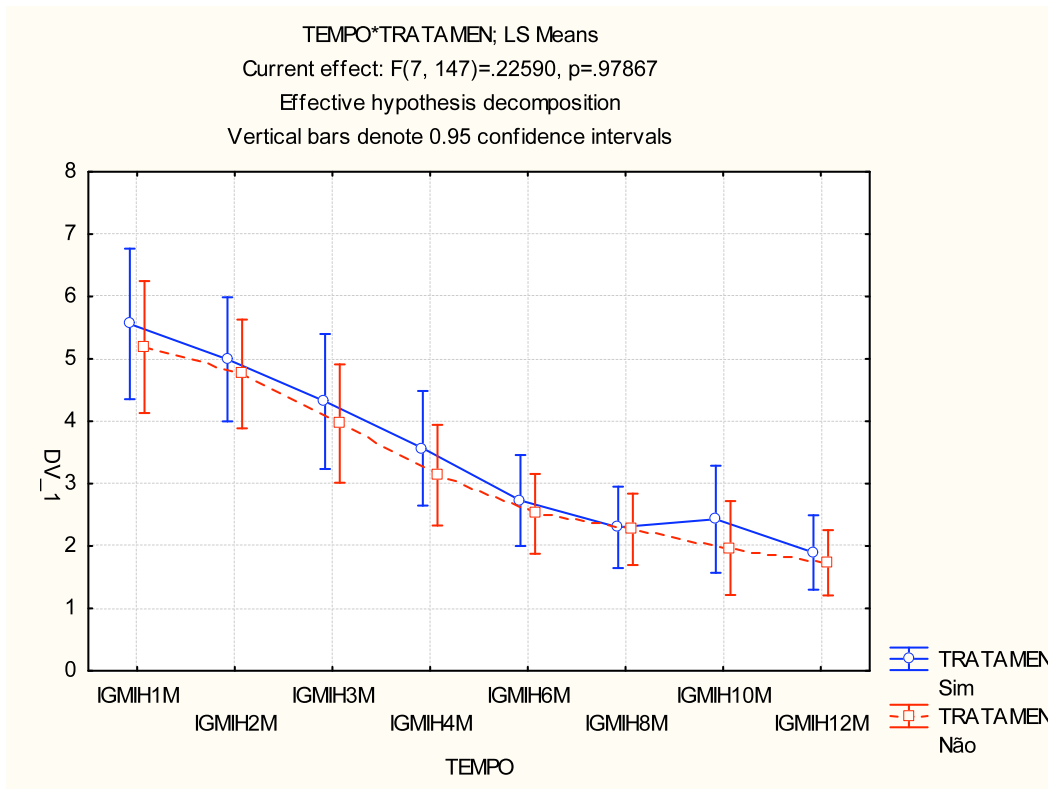


GRÁFICO 16- Médias de anticorpos IgM ELISA *in house* (índice) por mês e por grupo de tratamento

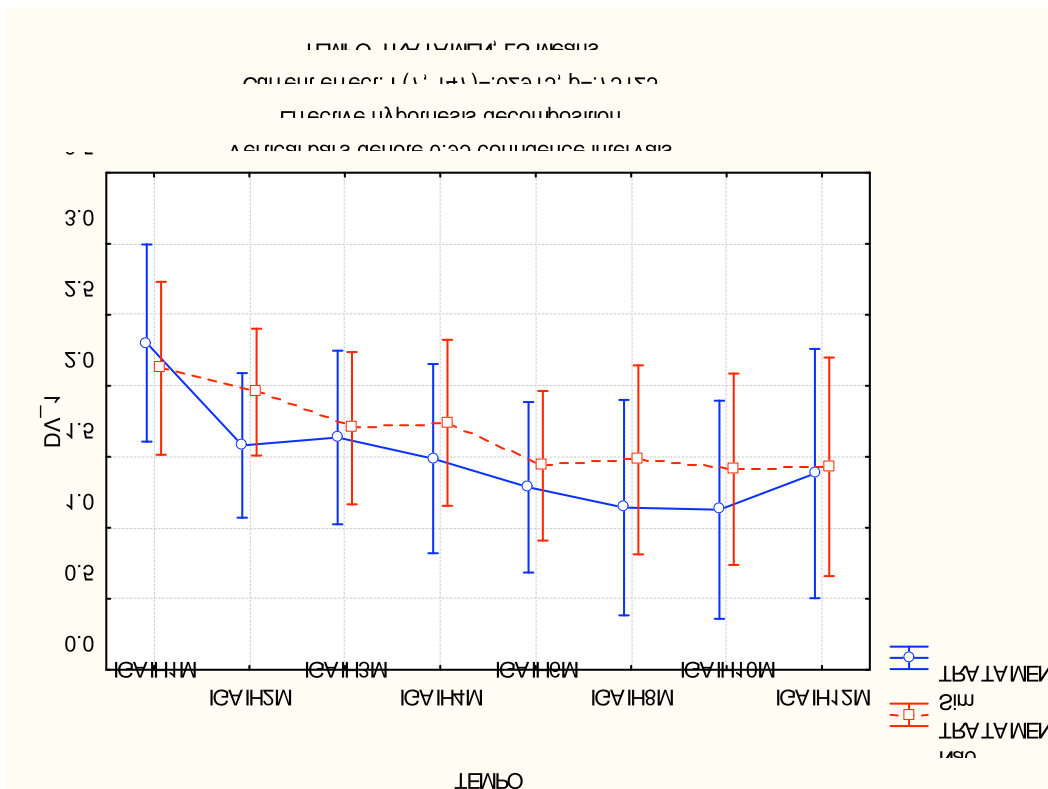


GRÁFICO 17- Médias de anticorpos IgA ELISA *in house* (índice) por mês e por grupo de tratamento

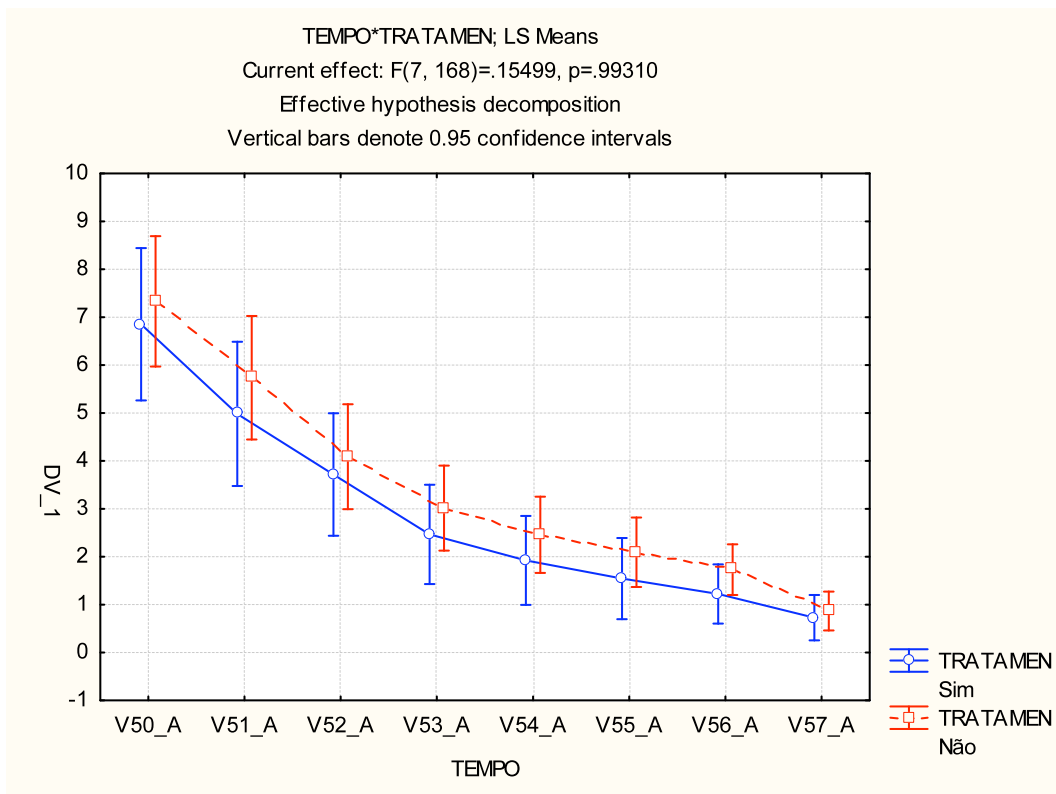


GRÁFICO 18: Médias de anticorpos IgM (ELFA) por mês e por grupo de tratamento

Apêndice D: Tabelas

TABELA 18 – Análise do impacto do tratamento e do tempo nos resultados sorológicos, UFES, 2005-2008

Variáveis	Fator	F	p-valor
IgG ELISA	tratamento	0.168	0.686
	Tempo	20.330	0.000
	tempo*tratamento	0.277	0.962
IgM ELISA	tratamento	0.321	0.577
	Tempo	74.157	0.000
	tempo*tratamento	0.226	0.979
IgA ELISA	tratamento	0.186	0.671
	Tempo	7.330	0.000
	tempo*tratamento	0.629	0.731
IgM ELFA	tratamento	0.741	0.398
	Tempo	92.151	0.000
	tempo*tratamento	0.155	0.993

ELISA, ensaio imunoenzimático; ELFA, ensaio imunoenzimático fluorimétrico; IFI, imunofluorescência indireta, CF, citometria de fluxo;* relação tempo x tratamento

TABELA 19a-Variáveis analisadas com e sem imputação de dados

Variáveis	Tempo	imputados			não imputados			Números imputados
		válidos	Média	DP	válidos	Média	DP	
IgG ELISA	1m	24	5,16	2,18	24	5,16	2,18	0
	2m	29	6,53	1,53	26	6,69	1,48	3
	3m	31	7,06	1,26	30	7,06	1,28	1
	4m	31	7,15	1,21	28	7,04	1,22	3
	6m	31	7,21	1,22	29	7,28	1,18	2
	8m	31	7,26	1,16	31	7,26	1,16	0
	10m	31	7,33	1,19	31	7,33	1,19	0
	12m	31	7,29	1,20	31	7,29	1,20	0
IgM ELISA	1m	24	5,45	1,83	24	5,45	1,83	0
	2m	29	5,12	1,47	26	5,17	1,48	3
	3m	31	4,26	1,54	30	4,32	1,52	1
	4m	31	3,40	1,32	28	3,43	1,37	3
	6m	31	2,69	1,07	29	2,75	1,08	2
	8m	31	2,35	0,95	31	2,35	0,95	0
	10m	31	2,23	1,19	31	2,23	1,19	0
	12m	31	1,93	0,87	31	1,93	0,87	0
IgA ELISA	1m	24	2,21	1,01	24	2,21	1,01	0
	2m	29	1,88	0,77	26	1,88	0,79	3
	3m	31	1,76	0,92	30	1,76	0,93	1
	4m	31	1,70	1,06	28	1,72	1,09	3
	6m	31	1,44	0,95	29	1,46	0,97	2
	8m	31	1,37	1,10	31	1,37	1,10	0
	10m	31	1,31	1,10	31	1,31	1,10	0
	12m	30	1,30	1,11	30	1,30	1,11	0
IgG ELFA	1m	24	289,04	434,23	24	289,04	434,23	0
	2m	29	1303,34	1616,06	26	1356,58	1690,72	3
	3m	31	3635,13	3868,76	29	3811,52	3941,30	2
	4m	31	4719,42	4219,30	27	4555,59	3943,10	4
	6m	31	5459,97	4790,89	28	5515,96	4862,75	3
	8m	31	5378,48	4381,28	30	5523,70	4379,64	1
	10m	31	4772,26	4199,66	30	4906,23	4203,53	1
	12m	31	4551,71	4412,75	30	4690,43	4418,90	1
IgM ELFA	1m	24	7,96	2,45	24	7,96	2,45	0
	2m	28	7,24	2,60	25	7,29	2,63	3
	3m	31	5,53	2,50	30	5,65	2,46	1
	4m	31	4,05	2,23	28	4,11	2,34	3
	6m	31	2,92	1,89	29	2,95	1,93	2
	8m	31	2,31	1,54	31	2,31	1,54	0
	10m	31	1,95	1,41	31	1,95	1,41	0
	12m	29	1,55	1,01	29	1,55	1,01	0
Avidéz de IgG ELFA	1m	16	0,07	0,06	16	0,07	0,06	0
	2m	29	0,06	0,04	26	0,06	0,04	3
	3m	31	0,09	0,05	29	0,09	0,05	2
	4m	31	0,14	0,07	27	0,14	0,07	4
	6m	31	0,23	0,08	28	0,22	0,08	3
	8m	31	0,29	0,11	30	0,28	0,11	1
	10m	31	0,32	0,12	30	0,32	0,12	1
	12m	30	0,35	0,11	29	0,34	0,11	1
IgG IFI	1m	24	45056,00	47568,22	24	45056,00	47568,22	0
	2m	28	49298,29	46186,25	28	49298,29	46186,25	0
	3m	29	48304,55	45629,24	29	48304,55	45629,24	0
	4m	30	42871,47	32816,22	30	42871,47	32816,22	0
	6m	29	43784,83	33223,86	29	43784,83	33223,86	0
	8m	31	38053,16	32651,63	31	38053,16	32651,63	0
	10m	29	32485,52	27627,53	29	32485,52	27627,53	0
	12m	31	27945,29	27418,47	31	27945,29	27418,47	0

(continua)

TABELA 19b-Variáveis analisadas com e sem imputação de dados (continuação)

Variáveis	Tempo	imputados			não imputados			Números imputados
		válidos	Média	DP	válidos	Média	DP	
IgM IFI	1m	25	652,48	867,54	25	652,48	867,54	0
	2m	30	538,40	804,99	30	538,40	804,99	0
	3m	31	371,74	358,56	31	371,74	358,56	0
	4m	31	363,35	334,55	31	363,35	334,55	0
	6m	31	289,03	315,54	31	289,03	315,54	0
	8m	31	284,39	338,50	31	284,39	338,50	0
	10m	31	234,84	288,81	31	234,84	288,81	0
	12m	31	162,00	170,53	31	162,00	170,53	0
IgG CF	1m	26	68,21	34,78	26	68,21	34,78	0
	2m	29	91,78	14,47	26	92,69	14,31	3
	3m	31	96,52	3,74	30	96,46	3,79	1
	4m	31	95,98	3,97	28	95,77	4,09	3
	6m	31	93,06	11,77	29	92,66	12,08	2
	8m	31	90,60	14,81	31	90,60	14,81	0
	10m	31	87,05	17,12	31	87,05	17,12	0
	12m	31	84,34	19,31	31	84,34	19,31	0
IgM CF	1m	26	95,05	6,55	26	95,05	6,55	0
	2m	30	83,84	18,44	27	85,47	17,48	3
	3m	31	67,79	29,45	30	67,90	29,95	1
	4m	31	54,52	31,22	28	53,14	31,81	3
	6m	31	41,00	30,74	29	41,48	31,50	2
	8m	31	30,21	26,30	31	30,21	26,30	0
	10m	31	24,87	23,66	31	24,87	23,66	0
	12m	31	17,93	19,83	31	17,93	19,83	0
Avidéz de IgG CF	1m	19	29,57	15,20	19	29,57	15,20	0
	2m	29	27,50	14,00	24	24,98	13,76	5
	3m	30	36,46	17,18	28	37,23	17,53	2
	4m	30	47,38	21,25	26	47,33	22,31	4
	6m	30	66,87	22,34	28	68,00	22,35	2
	8m	30	79,71	15,75	28	78,42	15,51	2
	10m	30	84,92	11,87	25	85,20	13,00	5
	12m	29	90,04	9,07	29	90,04	9,07	0
IgG1 CF	1m	26	87,32	27,80	26	87,32	27,80	0
	2m	30	99,02	1,40	27	99,23	0,67	3
	3m	31	99,46	0,23	30	99,45	0,23	1
	4m	31	99,36	0,28	28	99,37	0,28	3
	6m	31	99,35	0,43	29	99,35	0,45	2
	8m	31	99,35	0,44	31	99,35	0,44	0
	10m	31	99,30	0,43	31	99,30	0,43	0
	12m	31	99,09	0,76	31	99,09	0,76	0
IgG2 CF	1m	26	88,13	22,31	26	88,13	22,31	0
	2m	30	96,46	5,97	27	97,28	3,52	3
	3m	31	96,64	9,58	30	96,53	9,73	1
	4m	31	95,69	13,02	28	95,39	13,68	3
	6m	31	95,08	14,06	29	95,02	14,54	2
	8m	31	93,92	14,75	31	93,92	14,75	0
	10m	31	88,00	20,82	31	88,00	20,82	0
	12m	31	85,66	22,59	31	85,66	22,59	0
IgG3 CF	1m	26	74,81	32,60	26	74,81	32,60	0
	2m	29	86,62	20,69	26	89,59	15,39	3
	3m	31	86,83	27,37	30	88,83	25,41	1
	4m	31	79,12	32,48	28	78,75	33,39	3
	6m	31	70,69	38,27	29	68,90	38,95	2
	8m	31	62,08	41,29	31	62,08	41,29	0
	10m	31	53,08	40,71	31	53,08	40,71	0
	12m	31	39,31	43,24	31	39,31	43,24	0
IgG4 CF	1m	26	92,14	19,43	26	92,14	19,43	0
	2m	30	98,98	1,59	27	98,94	1,67	3
	3m	31	99,38	0,77	30	99,39	0,78	1
	4m	31	99,13	1,14	28	99,09	1,18	3
	6m	31	96,86	12,19	29	96,67	12,59	2
	8m	31	96,13	12,79	31	96,13	12,79	0
	10m	31	95,93	13,41	31	95,93	13,41	0
	12m	31	94,28	15,60	31	94,28	15,60	0

ELISA, ensaio imunoenzimático, resultado expresso em índice; ELFA, ensaio imunofluorimétrico, resultado expresso em UI/ml; IFI, imunofluorescência indireta, resultado expresso em título; CF, citometria de fluxo, resultado expresso em

TABELA 20 – Médias e desvios padrões dos resultados com imputação por tratamento

Variáveis	Tempo	Tratamento					
		Sim		Não		Total	
		Média	DP	Média	DP	Média	DP
IgG ELISA (n=23)	1m	4.87	2.19	5.18	2.19	5.05	2.15
	2m	6.06	1.63	6.57	1.49	6.35	1.54
	3m	6.98	1.37	6.93	1.31	6.95	1.30
	4m	7.02	1.40	7.12	1.12	7.08	1.22
	6m	7.00	1.45	7.09	1.21	7.05	1.29
	8m	6.95	1.41	7.24	1.16	7.11	1.25
	10m	6.97	1.41	7.28	1.16	7.15	1.25
	12m	6.99	1.26	7.19	1.31	7.10	1.26
IgM ELISA (n=23)	1m	5.56	2.16	5.19	1.54	5.35	1.80
	2m	4.99	1.86	4.76	1.19	4.86	1.48
	3m	4.32	2.18	3.96	1.09	4.12	1.62
	4m	3.57	1.87	3.14	0.89	3.32	1.38
	6m	2.73	1.46	2.52	0.74	2.61	1.09
	8m	2.30	1.21	2.27	0.79	2.28	0.97
	10m	2.43	1.83	1.97	0.69	2.17	1.30
	12m	1.90	1.19	1.73	0.62	1.80	0.89
IgA ELISA (n=23)	1m	2.30	1.21	2.12	0.92	2.20	1.04
	2m	1.58	0.62	1.96	0.87	1.79	0.78
	3m	1.64	0.71	1.70	1.07	1.67	0.91
	4m	1.49	0.59	1.74	1.24	1.63	1.00
	6m	1.29	0.44	1.44	1.15	1.37	0.90
	8m	1.14	0.29	1.48	1.51	1.33	1.14
	10m	1.13	0.28	1.41	1.53	1.29	1.15
	12m	1.38	0.97	1.43	1.55	1.41	1.30
IgM ELFA (n = 23)	1m	7.68	1.91	8.09	2.94	7.91	2.50
	2m	6.70	2.32	7.15	2.75	6.95	2.52
	3m	5.05	2.26	5.49	2.50	5.30	2.35
	4m	3.91	2.02	3.74	1.73	3.81	1.82
	6m	2.65	1.63	2.68	1.30	2.67	1.42
	8m	2.05	1.40	2.19	1.29	2.13	1.31
	10m	1.64	1.23	1.82	1.20	1.74	1.19
	12m	1.29	0.80	1.48	0.81	1.40	0.80

TABELA 21- Valores mínimos, médias, desvios padrões e limites inferiores e superiores dos resultados de IgG anti- *T. gondii* obtidos por diferentes técnicas

IgG	Tempo	mínimo	máximo	média	dp	LI 95%	LS 95%
ELISA	1m	1,0	8,8	5,2	2,2	4,2	6,1
	2m	3,4	9,1	6,5	1,6	5,8	7,1
	3m	4,5	9,4	7,1	1,4	6,5	7,6
	4m	4,7	9,3	7,2	1,3	6,6	7,7
	6m	4,9	9,3	7,1	1,3	6,6	7,7
	8m	5,0	9,3	7,2	1,3	6,7	7,8
	10m	4,8	9,4	7,2	1,3	6,7	7,8
	12m	5,2	9,4	7,2	1,3	6,6	7,8
ELFA	1m	0	1436	289	434	106	472
	2m	23	7.751	1.241	1.541	590	1.892
	3m	243	15.000	3.766	4.061	2.051	5.480
	4m	150	15.000	5.001	4.456	3.120	6.883
	6m	69	15.000	5.664	4.935	3.581	7.748
	8m	134	14.301	5.427	4.541	3.510	7.345
	10m	200	15.000	4.766	4.235	2.978	6.554
	12m	123	15.000	4.501	4.243	2.709	6.292
IFI	1m	4.096	131.072	45.056	47.116	23.005	67.107
	2m	4.096	131.072	54.272	47.931	31.840	76.704
	3m	16.384	131.072	55.706	47.664	33.398	78.013
	4m	16.384	131.072	48.333	35.450	31.742	64.924
	6m	8.192	131.072	46.694	35.669	30.001	63.388
	8m	8.192	131.072	42.598	35.718	25.882	59.315
	10m	8.192	131.072	35.635	28.660	22.222	49.048
	12m	8.192	131.072	31.130	29.188	17.469	44.790
CF	1m	1,88	98,43	68,21	34,78	54,16	82,26
	2m	32,02	99,20	91,00	15,11	84,90	97,10
	3m	88,63	99,49	96,78	2,87	95,62	97,94
	4m	85,44	99,49	95,90	4,19	94,21	97,60
	6m	41,48	99,77	92,14	12,66	87,03	97,26
	8m	39,28	99,58	90,16	15,81	83,77	96,54
	10m	27,68	99,80	86,92	17,92	79,68	94,16
	12m	15,29	99,60	84,45	19,66	76,51	92,39

TABELA 22- Valores mínimos, máximos, médias, desvios padrões e limites inferiores e superiores dos resultados de IgM anti- *T. gondii* obtidos por diferentes técnicas

IgG	Tempo	mínimo	máximo	média	dp	LI 95%	LS 95%
ELISA	1m	1,0	8,8	5,2	2,2	4,2	6,1
	2m	3,4	9,1	6,5	1,6	5,8	7,1
	3m	4,5	9,4	7,1	1,4	6,5	7,6
	4m	4,7	9,3	7,2	1,3	6,6	7,7
	6m	4,9	9,3	7,1	1,3	6,6	7,7
	8m	5,0	9,3	7,2	1,3	6,7	7,8
	10m	4,8	9,4	7,2	1,3	6,7	7,8
	12m	5,2	9,4	7,2	1,3	6,6	7,8
ELFA	1m	0	1436	289	434	106	472
	2m	23	7.751	1.241	1.541	590	1.892
	3m	243	15.000	3.766	4.061	2.051	5.480
	4m	150	15.000	5.001	4.456	3.120	6.883
	6m	69	15.000	5.664	4.935	3.581	7.748
	8m	134	14.301	5.427	4.541	3.510	7.345
	10m	200	15.000	4.766	4.235	2.978	6.554
	12m	123	15.000	4.501	4.243	2.709	6.292
IFI	1m	4.096	131.072	45.056	47.116	23.005	67.107
	2m	4.096	131.072	54.272	47.931	31.840	76.704
	3m	16.384	131.072	55.706	47.664	33.398	78.013
	4m	16.384	131.072	48.333	35.450	31.742	64.924
	6m	8.192	131.072	46.694	35.669	30.001	63.388
	8m	8.192	131.072	42.598	35.718	25.882	59.315
	10m	8.192	131.072	35.635	28.660	22.222	49.048
	12m	8.192	131.072	31.130	29.188	17.469	44.790
CF	1m	1,88	98,43	68,21	34,78	54,16	82,26
	2m	32,02	99,20	91,00	15,11	84,90	97,10
	3m	88,63	99,49	96,78	2,87	95,62	97,94
	4m	85,44	99,49	95,90	4,19	94,21	97,60
	6m	41,48	99,77	92,14	12,66	87,03	97,26
	8m	39,28	99,58	90,16	15,81	83,77	96,54
	10m	27,68	99,80	86,92	17,92	79,68	94,16
	12m	15,29	99,60	84,45	19,66	76,51	92,39

TABELA 23- Valores mínimos, máximos, médias, desvios padrões e limites inferiores e superiores dos resultados de IgA anti- *T. gondii* obtidos por ELISA

IgA	Tempo	mínimo	máximo	média	dp	LI 95%	LS 95%
ELISA	1m	0,8	4,4	2,1	1,0	1,7	2,6
	2m	1,0	4,4	1,8	0,8	1,4	2,1
	3m	0,8	4,9	1,7	0,9	1,3	2,1
	4m	0,8	4,9	1,7	1,0	1,2	2,1
	6m	0,8	5,1	1,4	0,9	1,0	1,8
	8m	0,8	6,4	1,3	1,1	0,9	1,8
	10m	0,7	6,4	1,3	1,2	0,8	1,8
	12m	0,7	6,5	1,3	1,2	0,8	1,8

TABELA 24- Valores mínimos, máximos, médias, desvios padrões e limites inferiores e superiores dos resultados de Avidéz de IgG anti- *T. gondii* obtidos pelas técnicas ELFA e CF

Avidéz IgG	Tempo	mínimo	máximo	média	dp	LI 95%	LS 95%
ELFA	1m	0,007	0,178	0,070	0,060	0,040	0,100
	2m	0,013	0,148	0,070	0,040	0,050	0,090
	3m	0,020	0,221	0,100	0,060	0,070	0,140
	4m	0,045	0,319	0,160	0,080	0,120	0,210
	6m	0,065	0,389	0,230	0,080	0,190	0,280
	8m	0,107	0,591	0,290	0,110	0,230	0,350
	10m	0,204	0,525	0,340	0,120	0,270	0,400
	12m	0,141	0,507	0,330	0,100	0,280	0,390
CF	1m	6,04	58,45	29,57	15,20	21,66	37,21
	2m	4,42	60,05	27,50	14,00	26,29	40,09
	3m	6,19	74,36	36,46	17,18	34,14	51,44
	4m	8,55	95,21	47,38	21,25	38,37	59,17
	6m	17,19	100,00	66,87	22,34	61,51	80,50
	8m	44,93	100,00	79,71	15,75	70,38	85,03
	10m	58,69	100,00	84,92	11,87	80,54	93,03
	12m	71,24	100,00	90,04	9,07	83,70	93,57

TABELA 25- Valores mínimos, máximos, médias, desvios padrões e limites inferiores e superiores dos resultados de Subclasses de IgG obtidos por Citometria de Fluxo

Subclasses de IgG	Tempo	mínimo	máximo	média	dp	LI 95%	LS 95%
IgG1	1m	1,01	99,70	87,32	27,80	76,09	98,55
	2m	92,45	99,88	98,95	1,49	98,35	99,56
	3m	99,02	99,93	99,47	0,24	99,37	99,56
	4m	98,43	99,82	99,34	0,30	99,22	99,46
	6m	97,80	99,76	99,33	0,46	99,14	99,52
	8m	98,09	99,93	99,32	0,47	99,13	99,52
	10m	98,06	99,79	99,28	0,46	99,10	99,46
	12m	96,97	99,88	99,07	0,77	98,76	99,38
IgG2	1m	12,64	99,74	88,13	22,31	79,11	97,14
	2m	70,31	99,87	96,25	6,33	93,69	98,80
	3m	45,95	99,89	96,28	10,44	92,07	100,50
	4m	26,25	99,84	95,26	14,19	89,53	100,99
	6m	21,93	99,86	94,53	15,31	88,34	100,71
	8m	19,80	99,92	93,10	16,01	86,64	99,57
	10m	17,67	99,87	89,01	18,11	81,69	96,33
	12m	15,01	99,87	86,53	20,88	78,10	94,96
IgG3	1m	1,34	99,92	74,81	32,60	61,64	87,97
	2m	11,38	99,69	85,33	21,51	76,64	94,01
	3m	5,97	99,79	85,79	29,73	73,78	97,80
	4m	1,94	99,83	80,77	32,13	67,79	93,74
	6m	1,35	99,70	71,25	38,77	55,59	86,90
	8m	1,95	99,78	61,68	41,07	45,09	78,27
	10m	1,81	99,50	54,32	42,05	37,33	71,30
	12m	1,27	99,74	41,93	43,81	24,24	59,62
IgG4	1m	18,99	99,87	92,14	19,43	84,30	99,99
	2m	92,17	99,87	98,91	1,70	98,22	99,59
	3m	95,65	99,89	99,33	0,83	98,99	99,66
	4m	95,11	99,95	99,11	1,16	98,64	99,58
	6m	31,64	99,88	96,36	13,29	90,99	101,73
	8m	28,62	99,93	95,48	13,91	89,86	101,10
	10m	25,59	99,90	95,31	14,61	89,41	101,21
	12m	21,87	99,88	93,32	16,91	86,49	100,15

TABELA 26- Análise dos resultados de anticorpos IgG anti- *T. gondii* comparados mês a mês, obtida com o teste de Tukey

Variável	Tempo	2m	3m	4m	6m	8m	10m	12m
ELISA	1m	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	2m		0,1067	0,0222	0,0335	0,0128	0,0071	0,0149
	3m			0,9994	0,9999	0,9970	0,9889	0,9980
	4m				1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	6m					1,0000	0,9998	1,0000
	8m						1,0000	1,0000
	10m							1,0000
	12m							
ELFA	1m	0,9317	0,0003	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	2m		0,0312	0,0001	0,0000	0,0000	0,0003	0,0010
	3m			0,7747	0,2429	0,4167	0,9126	0,9835
	4m				0,9910	0,9995	1,0000	0,9985
	6m					1,0000	0,9495	0,8242
	8m						0,9912	0,9406
	10m							1,0000
	12m							
IFI	1m	0,9404	0,8785	0,9999	1,0000	1,0000	0,9332	0,6415
	2m		1,0000	0,9952	0,9796	0,8171	0,2577	0,0651
	3m			0,9825	0,9470	0,7103	0,1751	0,0382
	4m				1,0000	0,9962	0,7429	0,3609
	6m					0,9996	0,8556	0,4977
	8m						0,9875	0,8304
	10m							0,9992
	12m							
CF	1m	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001	0,0018
	2m		0,8500	0,9319	1,0000	1,0000	0,9745	0,7463
	3m			1,0000	0,9488	0,7359	0,2328	0,0511
	4m				0,9841	0,8537	0,3504	0,0929
	6m					0,9997	0,9063	0,5601
	8m						0,9935	0,8578
	10m							0,9988
	12m							

TABELA 29- Análise dos resultados de Aidez de anticorpos IgG anti- *T. gondii* comparados mês a mês, obtida com o teste de Tukey

Variável	Tempo	2m	3m	4m	6m	8m	10m	12m
ELFA	1m	1,0000	0,8740	0,0078	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
	2m		0,8820	0,0084	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
	3m			0,2763	0,0002	0,0001	0,0001	0,0001
	4m				0,1462	0,0002	0,0001	0,0001
	6m					0,3214	0,0037	0,0057
	8m						0,7059	0,7850
	10m							1,0000
CF	1m	0,9919	0,0815	0,0013	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
	2m		0,4301	0,0209	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
	3m			0,8971	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
	4m				0,0002	0,0001	0,0001	0,0001
	6m					0,8289	0,0184	0,0049
	8m						0,5041	0,2630
	10m							0,9999

TABELA 30- Análise dos resultados de subclasses de IgG anti- *T. gondii* por citometria de fluxo comparados mês a mês, obtida com o teste de Tukey

Variável	Tempo	2m	3m	4m	6m	8m	10m	12m
IgG1	1m	0,0006	0,0003	0,0003	0,0003	0,0003	0,0003	0,0005
	2m		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	3m			1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	4m				1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	6m					1,0000	1,0000	1,0000
	8m						1,0000	1,0000
	10m							1,0000
IgG2	1m	0,1817	0,1770	0,3364	0,4845	0,7784	1,0000	0,9997
	2m		1,0000	1,0000	0,9995	0,9774	0,3178	0,0500
	3m			1,0000	0,9994	0,9758	0,3110	0,0483
	4m				1,0000	0,9977	0,5164	0,1154
	6m					0,9999	0,6738	0,1975
	8m						0,9074	0,4469
	10m							0,9944
IgG3	1m	0,7733	0,7316	0,9875	0,9995	0,5165	0,0483	0,0001
	2m		1,0000	0,9976	0,4209	0,0106	0,0001	0,0000
	3m			0,9956	0,3764	0,0082	0,0001	0,0000
	4m				0,8513	0,0867	0,0022	0,0000
	6m					0,8481	0,1895	0,0004
	8m						0,9585	0,0663
	10m							0,5930
IgG4	1m							
	2m							
	3m							
	4m							
	6m							
	8m							
	10m							

Teste ANOVA não mostrou significância estatística

TABELA 31- Curva ROC dos resultados obtidos para anticorpos IgG anti-*T. gondii* nos meses 1 e 2 comparados aos meses 10 e 12

Comparação	Variável	ASC	p-valor	Ponto Corte	Sensib.	Espec.
(1 e 2 meses) x (4 e 6 meses)	IgG ELISA	0,3353	0,0069	6,66	0,3684	0,3750
	IgG ELFA	0,1353	<0,0001	1283,00	0,1842	0,1964
	IgG CF	0,3992	0,0984	97,12	0,4474	0,4643
	IgG IFI	0,4521	0,4320	49152,00	0,2895	0,5714
(1 e 2 meses) x (10 e 12 meses)	IgG ELISA	0,3331	0,0066	6,71	0,3684	0,3704
	IgG ELFA	0,1460	<0,0001	1098,50	0,2105	0,2037
	IgG CF	0,5743	0,2266	94,655	0,6053	0,5926
	IgG IFI	0,5694	0,2585	24576	0,4737	0,4444

ASC, area sob a curva; ELISA, ensaio imunoenzimático; ELFA, ensaio imunoenzimático fluorimétrico; IFI, imunofluorescência indireta, CF, citometria de fluxo

TABELA 32- Resultados da análise discriminante para o modelo que utilizou todas as variáveis em todos os tempos (Modelo 1^{b,c})

Resultado da análise discriminante para o modelo 1																			
		MÊS 1		2		3		4		6		8		10		12		Total	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Classificação original do grupo	1	8	57,1	6	42,9	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	14	100
	2	7	30,4	9	39,1	6	26,1	1	4,3	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	23	100
	3	1	3,7	5	18,5	13	48,1	7	25,9	1	3,7	0	0,0	0	0,0	0	0,0	27	100
	4	0	0,0	2	8,0	6	24,0	11	44,0	6	24,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	25	100
	6	0	0,0	0	0,0	1	3,7	5	18,5	12	44,4	5	18,5	2	7,4	2	7,4	27	100
	8	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	11	40,7	9	33,3	2	7,4	5	18,5	27	100
	10	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	5	20,8	5	20,8	7	29,2	7	29,2	24	100
	12	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	4,2	2	8,3	6	25,0	15	62,5	24	100
Classificação do grupo por validação cruzada ^a	1	4	28,6	9	64,3	1	7,1	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	14	100
	2	7	30,4	6	26,1	9	39,1	1	4,3	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	23	100
	3	1	3,7	7	25,9	7	25,9	10	37,0	2	7,4	0	0,0	0	0,0	0	0,0	27	100
	4	0	0,0	2	8,0	7	28,0	7	28,0	9	36,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	25	100
	6	0	0,0	0	0,0	2	7,4	5	18,5	6	22,2	10	37,0	2	7,4	2	7,4	27	100
	8	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	7,4	12	44,4	2	7,4	6	22,2	5	18,5	27	100
	10	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	5	20,8	6	25,0	5	20,8	8	33,3	24	100
	12	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	8,3	4	16,7	9	37,5	9	37,5	24	100

a. A validação cruzada é realizada apenas para aqueles casos na análise. Na validação cruzada, cada caso é classificado pela função derivada de todos os casos, retirado o caso em questão.

b. 44,0% dos casos do grupo original foram corretamente classificados

c. 24,1% dos casos foram corretamente classificados pela validação cruzada

TABELA 33- Resultado da análise discriminante (Step Wise) com quatro testes: avides CF, IgM ELFA, avides ELFA e IgG2 CF em todos os tempos (Modelo 2^{b,c})

	MÊS	1		2		3		4		6		8		10		12		Total	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Classificação original do grupo	1	8	57,1	4	28,6	2	14,3	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	14	100
	2	7	29,2	11	45,8	4	16,7	2	8,3	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	24	100
	3	4	14,8	3	11,1	9	33,3	9	33,3	2	7,4	0	0,0	0	0,0	0	0,0	27	100
	4	2	8,0	0	0,0	4	16,0	12	48,0	7	28,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	25	100
	6	1	3,7	0	0,0	2	7,4	3	11,1	12	44,4	8	29,6	0	0,0	1	3,7	27	100
	8	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	7,4	9	33,3	9	33,3	4	14,8	3	11,1	27	100
	10	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	5	20,8	5	20,8	5	20,8	9	37,5	24	100
	12	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	4,0	3	12,0	5	20,0	16	64,0	25	100
Classificação do grupo por validação cruzada ^a	1	6	42,9	6	42,9	2	14,3	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	14	100
	2	7	29,2	10	41,7	5	20,8	2	8,3	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	24	100
	3	4	14,8	3	11,1	9	33,3	9	33,3	2	7,4	0	0,0	0	0,0	0	0,0	27	100
	4	2	8,0	2	8,0	5	20,0	10	40,0	8	32,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	25	100
	6	1	3,7	0	0,0	2	7,4	3	11,1	10	37,0	10	37,0	0	0,0	1	3,7	27	100
	8	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	7,4	10	37,0	8	29,6	4	14,8	3	11,1	27	100
	10	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	5	20,8	5	20,8	5	20,8	9	37,5	24	100
	12	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	4,0	3	12,0	8	32,0	13	52,0	25	100

a. A validação cruzada é realizada apenas para aqueles casos na análise. Na validação cruzada, cada caso é classificado pela função derivada de todos os casos, retirado o caso em questão.

b. 42,5% dos casos do grupo original foram corretamente classificados

c. 36,8% dos casos foram corretamente classificados pela validação cruzada

TABELA 34- Resultados da análise discriminante para o modelo que utilizou todas as variáveis para os grupos 1 (agudo), grupo 2 (convalescente precoce) e grupo 3 (convalescente tardio (Modelo 3^{b,c}))

	Grupos	Casos classificados por grupo						Total	%	
		1	%	2	%	3	%			
Grupo de origem	Grupos (%)	1	58	90,6	6	9,4	0	0	64	100
		2	11	13,9	52	65,8	16	20,3	79	100
		3	0	0	8	16,7	40	83,3	48	100
Validação cruzada ^a	Grupos (%)	1	54	84,4	9	14,1	1	1,6	64	100
		2	14	17,7	49	62	16	20,3	79	100
		3	0	0	12	25	36	75	48	100

a. A validação cruzada é realizada apenas para aqueles casos na análise. Na validação cruzada, cada caso é classificado pela função derivada de todos os casos, retirado o caso em questão.

b. 78,5% dos casos do grupo original foram corretamente classificados

c. 72,8% dos casos foram corretamente classificados pela validação cruzada

TABELA 35- Resultados da análise discriminante para o modelo que utilizou as variáveis IgM ELISA, ELFA e CF; avidéz ELFA e CF e IgG3 para os grupos 1 (agudo), 2 (convalescente precoce) e 3 (convalescente tardio) (Modelo 5)

		Grupos	Casos classificados por grupo						Total	
			1	%	2	%	3	%		%
Grupo de origem	Grupos (%)	1	58	90,6	6	9,4	0	0	64	100
		2	11	13,9	52	65,8	16	20,3	79	100
		3	0	0	8	16,7	40	83,3	48	100
Validação cruzada ^a	Grupos (%)	1	54	84,4	9	14,1	1	1,6	64	100
		2	14	17,7	49	62	16	20,3	79	100
		3	0	0	12	25	36	75	48	100

a. A validação cruzada é realizada apenas para aqueles casos na análise. Na validação cruzada, cada caso é classificado pela função derivada de todos os casos, retirado o caso em questão.

b. 74,5% dos casos do grupo original foram corretamente classificados

c. 70,3% dos casos foram corretamente classificados pela validação cruzada

TABELA 36- Resultados da análise discriminante para o modelo que utilizou as variáveis IgM e avidéz ELFA para os grupos 1 (agudo), 2 (convalescente precoce) e 3 (convalescente tardio) (Modelo 6)

		Grupos	Casos classificados por grupo						Total	
			1	%	2	%	3	%		%
Grupo de origem	Grupos (%)	1	59	85,5	10	14,5	0	0,0	69	100
		2	13	15,3	48	56,5	24	28,2	85	100
		3	0	0,0	18	31,6	39	68,4	57	100
Validação cruzada ^a	Grupos (%)	1	58	84	11	15,9	0	0,0	69	100
		2	13	15	48	56,5	24	28,2	85	100
		3	0	0	18	31,6	39	68,4	57	100

a. A validação cruzada é realizada apenas para aqueles casos na análise. Na validação cruzada, cada caso é classificado pela função derivada de todos os casos, retirado o caso em questão.

b. 69,2% dos casos do grupo original foram corretamente classificados

c. 68,7% dos casos foram corretamente classificados pela validação cruzada

TABELA 37- Resultados da análise discriminante para o modelo que utilizou as variáveis IgM e avidéz CF para os grupos 1 (agudo), 2 (convalescente precoce) e 3 (convalescente tardio) (Modelo 7)

		Grupos	Casos classificados por grupo						Total	
			1	%	2	%	3	%		%
Grupo de origem	Grupos (%)	1	63	88,7	8	11,3	0	0	71	100
		2	17	20,7	37	45,1	28	34,1	82	100
		3	0	0	8	14,8	46	85,2	54	100
Validação cruzada ^a	Grupos (%)	1	63	88,7	8	11,3	0	0	71	100
		2	17	20,7	37	45,1	28	34,1	82	100
		3	0	0	8	14,8	46	85,2	54	100

a. A validação cruzada é realizada apenas para aqueles casos na análise. Na validação cruzada, cada caso é classificado pela função derivada de todos os casos, retirado o caso em questão.

b. 70,5% dos casos do grupo original foram corretamente classificados

c. 70,5% dos casos foram corretamente classificados pela validação cruzada

TABELA 38- Resultados da análise discriminante para o modelo que utilizou todas as variáveis de CF para IgM, avidéz e IgG3 para os grupos 1 (agudo), 2 (convalescente precoce) e 3 (convalescente tardio) (Modelo 8)

		Grupos	Casos classificados por grupo						Total	
			1	%	2	%	3	%		%
Grupo de origem	Grupos (%)	1	62	88,6	8	11,4	0	0	70	100
		2	17	20,7	41	50	24	29,3	82	100
		3	0	0	11	20,4	43	79,6	54	100
Validação cruzada ^a	Grupos (%)	1	62	88,6	8	11,4	0	0	70	100
		2	17	20,7	40	48,8	25	30,5	82	100
		3	0	0	11	20,4	43	79,6	54	100

a. A validação cruzada é realizada apenas para aqueles casos na análise. Na validação cruzada, cada caso é classificado pela função derivada de todos os casos, retirado o caso em questão.

b. 70,9% dos casos do grupo original foram corretamente classificados

c. 70,4% dos casos foram corretamente classificados pela validação cruzada

TABELA 39- Resultados da análise discriminante para o modelo que utilizou as variáveis de CF IgM e IgG3 para os grupos 1 (agudo), 2 (convalescente precoce) e 3 (convalescente tardio) (Modelo 9)

		Grupos	Casos classificados por grupo						Total	
			1	%	2	%	3	%		%
Grupo de origem	Grupos (%)	1	67	81,7	13	15,9	2	2,4	82	100
		2	23	26,1	36	40,9	29	33	88	100
		3	5	8,1	16	25,8	41	66,1	62	100
Validação cruzada ^a	Grupos (%)	1	67	81,7	13	15,9	2	2,4	82	100
		2	23	26,1	36	40,9	29	33	88	100
		3	5	8,1	17	27,4	40	64,5	62	100

a. A validação cruzada é realizada apenas para aqueles casos na análise. Na validação cruzada, cada caso é classificado pela função derivada de todos os casos, retirado o caso em questão.

b. 62,1% dos casos do grupo original foram corretamente classificados

c. 61,6% dos casos foram corretamente classificados pela validação cruzada

TABELA 40- Resultados da análise discriminante para o modelo que utilizou as variáveis de CF IgM e IgG2 para os grupos 1 (agudo), 2 (convalescente precoce) e 3 (convalescente tardio) (Modelo 10)

		Grupos	Casos classificados por grupo						Total	
			1	%	2	%	3	%		%
Grupo de origem	Grupos (%)	1	17	35,4	9	18,8	22	45,8	48	100
		2	10	12,2	36	43,9	36	43,9	82	100
		3	2	3,2	13	21	47	75,8	62	100
Validação cruzada ^a	Grupos (%)	1	12	25	14	29,2	22	45,8	48	100
		2	12	14,6	34	41,5	36	43,9	82	100
		3	2	3,2	13	21	47	75,8	62	100

a. A validação cruzada é realizada apenas para aqueles casos na análise. Na validação cruzada, cada caso é classificado pela função derivada de todos os casos, retirado o caso em questão.

b. 63,5% dos casos do grupo original foram corretamente classificados

c. 62,7% dos casos foram corretamente classificados pela validação cruzada

TABELA 41- Resultados da análise discriminante para o modelo que utilizou as variáveis de CF IgM, avidéz de IgG e IgG2 para os grupos 1 (agudo), 2 (convalescente precoce) e 3 (convalescente tardio) (Modelo 11)

		Grupos	Casos classificados por grupo						Total	
			1	%	2	%	3	%		%
Grupo de origem	Grupos (%)	1	14	38,9	9	25	13	36,1	36	100
		2	17	23	34	45,9	23	31,1	74	100
		3	8	17	9	19,1	30	63,8	47	100
Validação cruzada ^a	Grupos (%)	1	14	38,9	9	25	13	36,1	36	100
		2	17	23	34	45,9	23	31,1	74	100
		3	10	21,3	9	19,1	28	59,6	47	100

a. A validação cruzada é realizada apenas para aqueles casos na análise. Na validação cruzada, cada caso é classificado pela função derivada de todos os casos, retirado o caso em questão.

b. 72,9% dos casos do grupo original foram corretamente classificados

c. 72,5% dos casos foram corretamente classificados pela validação cruzada

TABELA 42- Desempenho diagnóstico da combinação de dois testes utilizando pontos de corte ajustados para o diagnóstico de infecção aguda por *T. gondii*

Teste primeira linha	Teste segunda linha	Número de combinações	Grupo 1: agudo (meses 1,2,3)				Grupo 2 : convalescente precoce (meses 4,6,8)				Grupo 3: convalescente tardio (meses 10, 12)			
			n	pos	duv	neg	n	pos	duv	neg	n	pos	duv	neg
IgG1 CF	IgM ELISA	1	80	96,3	2,5	1,3	88	54,5	45,5	0	62	24,2	75,8	0
	IgM ELFA	2	79	97,5	1,3	1,3	88	52,3	47,7	0	60	18,3	81,7	0
	IgM CF	3	83	94	4,8	1,2	88	51,1	48,9	0	62	21	79	0
	IgG3 CF	4	82	91,5	7,3	1,2	88	71,6	28,4	0	62	45,2	54,8	0
	Avidez CF	5	72	94,4	4,2	1,4	72	94,4	4,2	1,4	54	1,9	98,1	0
	Avidez ELFA	6	72	98,6	0	1,4	85	69,4	30,6	0	59	23,7	76,3	0
IgG2 CF	IgM ELISA	7	80	96,3	3,8	0	88	54,5	45,5	0	62	24,2	75,8	0
	IgM ELFA	8	79	97,5	2,5	0	88	52,3	47,7	0	60	18,3	81,7	0
	IgM CF	9	83	95,2	4,8	0	88	51,1	48,9	0	62	21	79	0
	IgG3 CF	10	82	91,5	8,5	0	88	71,6	28,4	0	62	45,2	54,8	0
	Avidez CF	11	71	95,8	4,2	0	82	41,5	58,5	0	54	1,9	98,1	0
	Avidez ELFA	12	71	100	0	0	85	69,4	30,6	0	59	23,7	76,3	0
IgG4 CF	IgM ELISA	13	80	96,3	3,8	0	88	54,5	45,5	0	62	24,2	75,8	0
	IgM ELFA	14	79	97,5	2,5	0	88	52,3	47,7	0	60	18,3	81,7	0
	IgM CF	15	83	95,2	4,8	0	88	51,1	48,9	0	62	21	79	0
	IgG3 CF	16	82	91,5	8,5	0	88	71,6	28	0	62	45,2	54,8	0
	Avidez CF	17	71	95,8	4,2	0	82	41,5	58,5	0	54	1,9	98,1	0
	Avidez ELFA	18	71	100	0	0	85	69,4	30,6	0	59	23,7	76,3	0
IgM ELISA	IgM ELFA	19	78	94,9	1,3	3,8	88	42	12,5	45,5	61	14,8	8,2	77
	IgM CF	20	80	92,5	3,8	3,8	88	36,4	18,2	45,5	62	9,7	14,5	75,8
	IgG3 CF	21	79	89,9	6,3	3,8	88	46,6	8	45,5	62	17,7	6,5	75,8
	Avidez CF	22	72	93,1	2,8	4,2	87	28,7	25,3	46	60	1,7	20	78,3
	Avidez ELFA	23	70	95,7	0	4,3	86	43	10,5	46,5	62	1,6	22,6	75,8
IgM ELFA	IgM ELISA	24	78	94,9	2,6	2,6	88	42	10,2	47,7	60	15	3,3	81,7
	IgM CF	25	79	92,4	5,1	2,5	88	42	10,2	47,7	60	8,3	10	81,7
	IgG3 CF	26	78	89,7	7,7	2,6	88	46,6	5,7	47,7	60	15	3,3	81,7
	Avidez CF	27	70	92,9	4,3	2,9	87	24,1	27,6	48,3	59	1,7	15,3	83,1
	Avidez ELFA	28	70	97,1	0	2,9	87	41,4	10,3	48,3	60	1,7	16,7	81,7
IgM CF	IgM ELISA	29	80	92,5	2,5	5	88	36,4	14,8	48,9	62	9,7	11,3	79
	IgM ELFA	30	79	92,4	2,5	5,1	88	42	9,1	48,9	61	8,2	11,5	80,3
	IgG3 CF	31	82	87,8	7,3	4,9	88	43,2	8	48,9	62	14,5	6,5	79
	Avidez CF	32	72	90,3	4,2	5,6	87	23	27,6	49,4	61	1,6	18	80,3
	Avidez ELFA	33	71	94,4	0	5,6	87	41,4	9,2	49,4	62	6,5	14,5	79
Avidez CF	IgM ELISA	34	70	95,7	0	4,3	82	30,5	11	58,5	54	1,9	0	98,1
	IgM ELFA	35	69	94,2	1,4	4,3	82	25,6	15,9	58,5	54	1,9	0	98,1
	IgM CF	36	71	91,5	4,2	4,2	82	24,4	17,1	58,5	54	1,9	0	98,1
	IgG3 CF	37	70	91,4	4,3	4,3	82	34,1	7,3	58,5	54	1,9	0	98,1
	Avidez ELFA	38	66	95,5	0	4,5	80	32,5	7,5	60	54	1,9	0	98,1

ELISA, ensaio imunoenzimático; ELFA, ensaio imunoenzimático fluorimétrico; IFI, imunofluorescência indireta, CF, citometria de fluxo; G1, Infecção aguda; G2, Infecção convalescente precoce; G3, Infecção convalescente tardia

TABELA 43- Desempenho diagnóstico da combinação de dois testes utilizando pontos de corte preconizados para o diagnóstico de infecção por *T. gondii*

Teste primeira linha	Teste segunda linha	Número de combinações	Grupo 1: agudo (meses 1,2,3)				Grupo 2 : convalescente precoce (meses 4,6,8)				Grupo 3: convalescente tardio (meses 10, 12)			
			n	pos	duv	neg	n	pos	duv	neg	n	pos	duv	neg
IgM ELISA	Avidez ELFA	1	69	100	0	0	85	75,3	21,2	3,5	59	30,5	59,3	10,2
	Avidez CF	2	70	95,7	4,3	0	84	40,5	56	3,5	56	1,8	83,9	14,3
IgM ELFA	Avidez ELFA	3	69	100	0	0	85	75,3	21,2	3,5	57	33,3	56,2	10,5
	Avidez CF	4	69	95,7	4,3	0	84	40,5	57,1	2,4	54	1,9	85,1	13
IgM CF	Avidez ELFA	5	71	100	0	0	86	60,5	14	25,5	86	60,5	13,9	25,6
	Avidez CF	6	71	95,8	4,2	0	86	33,7	40,7	25,6	59	1,7	49,1	49,2
IgG1 CF	Avidez ELFA	7	72	98,6	0	1,4	85	77,6	22,4	0	59	37,3	62,7	0
	Avidez CF	8	72	94,4	4,2	1,4	82	41,5	58,4	0,1	54	1,9	98,1	0
IgG2 CF	Avidez ELFA	9	71	100	0	0	85	77,6	22,4	0	59	37,3	62,7	0
	Avidez CF	10	71	95,8	4,2	0	82	41,5	58,5	0	54	1,9	98,1	0
IgG3 CF	Avidez ELFA	11	72	97,2	0	2,8	86	68,6	22,1	9,3	61	23	49,2	27,8
	Avidez CF	12	72	93,1	4,2	2,8	86	39,5	51,2	9,3	57	1,8	68,4	29,8
IgG4 CF	Avidez ELFA	13	71	100	0	0	85	77,6	22,4	0	59	37,3	62,7	0
	Avidez CF	14	71	95,8	4,2	0	82	41,5	58,5	0	54	1,9	98,1	0
Avidez CF	Avidez ELFA	15	66	95,5	0	4,5	80	35	5	60	54	1,9	0	98,1
Avidez ELFA	Avidez CF	16	66	95,5	3	1,5	80	35	20	45	56	1,8	8,9	89,3

ANEXOS

Anexo A: Parecer consubstanciado da Comissão de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal do Espírito Santo



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO CENTRO BIOMÉDICO

Vitória-ES, 31 de março de 2005

Do: Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Biomédico

Para: Profa. Geisa Baptista Barros
Pesquisadora Responsável pelo Projeto de Pesquisa intitulado: **“Dinâmica de marcadores sorológicos na infecção aguda recente pelo Toxoplasma gondii”**

Senhora Pesquisadora,

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

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

Atenciosamente,


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