



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

JAQUELINE DARIO CAPOBIANGO

**TOXOPLASMOSE ADQUIRIDA NA GESTAÇÃO E
CONGÊNITA: CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS,
CLÍNICAS E DIAGNÓSTICO LABORATORIAL**

Londrina
2014

JAQUELINE DARIO CAPOBIANGO

**TOXOPLASMOSE ADQUIRIDA NA GESTAÇÃO E
CONGÊNITA: CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS,
CLÍNICAS E DIAGNÓSTICO LABORATORIAL**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde do Centro de
Ciências da Saúde da Universidade
Estadual de Londrina

Orientadora: Profa. Dra. Edna Maria
Vissoci Reiche

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

C245t Capobiano, Jaqueline Dario.
Toxoplasmose adquirida na gestação e congênita : características epidemiológicas,
clínicas e diagnóstico laboratorial / Jaqueline Dario Capobiano. – Londrina,
2014.
146 f. : il.

Orientador: Edna Maria Vissoci Reiche.
Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina,
Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde,
2014.
Inclui bibliografia.

1. Toxoplasmose – Teses. 2. Toxoplasmose – Epidemiologia – Teses. 3. Doenças
parasitárias em crianças – Teses. 4. Doenças congênitas – Teses. 5. Exames médicos
– Teses. 6. Toxoplasma gondii – Teses. I. Reiche, Edna Maria Vissoci. II. Universidade
Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde. III. Título.

CDU 616.993.192.1

JAQUELINE DARIO CAPOBIANGO

TOXOPLASMOSE ADQUIRIDA NA GESTAÇÃO E CONGÊNITA:

CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS, CLÍNICAS E
DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde do Centro de Ciências da Saúde
da Universidade Estadual de Londrina.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Edna Maria Vissoci Reiche
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Marcelo Barbante Casella
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dra. Rubia Casagrande
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 15 de dezembro de 2014.

**Dedico este trabalho às minhas
amadas filhas
Júlia Capobiango e Laura Capobiango.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, porque tem me capacitado para ajudar aos outros, em especial aos que adoecem.

Agradeço a Nossa Senhora, minha Mãe, Rainha, Vencedora e Protetora, três vezes admirável de Schöenstatt, que sempre me protege e consola nos momentos difíceis.

Agradeço a toda a minha família, em especial à minha mãe Letícia, cujo apoio e ajuda nas tarefas diárias foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Agradeço às minhas filhas Júlia e Laura, que tiveram a paciência de suportar a minha ausência em vários momentos.

Agradeço ao meu marido João, que muitas vezes ficou inconsolado com a minha falta de tempo para ele e para a família, porém nunca deixou de me dar suporte para continuar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde do CCS, UEL, à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPPG) da UEL e ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) pelo suporte financeiro.

À Professora Dra. Edna Maria Vissoci, que tem sido um modelo para mim de pesquisadora, professora e mulher e, que muitas vezes, mesmo com dor, não deixou de me atender e me ajudar.

Aos professores da Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual de Londrina (UEL): Dr. Itamar Teodorico Navarro, Dra. Regina Mitsuka- Breganó, Dr. João Luis Garcia.

Aos alunos da Pós Graduação da Medicina Veterinária da UEL: Sthefany Pagliari, Aline K. Pasquali, Thaís C. Mônica, Fernanda P. Ferreira e Beatriz Nino.

Aos professores do Setor de Neonatologia do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina (HU/UEL): Angela Sara Jamusse de Brito, Ana Berenice Carvalho, Ligia L. Ferrari, Maria Rafaela Gonzales e Fernanda Pegoraro, que ajudaram garantindo a coleta das amostras de sangue das crianças e seguindo o protocolo de atendimento e encaminhamento dos pacientes ao ambulatório. Aos plantonistas da UTI neonatal, que também ajudaram na coleta das amostras de sangue e no protocolo de atendimento.

Aos residentes de Pediatria do HU/UEL, que ajudaram na coleta das amostras de sangue, atendimento as crianças e encaminhamento do material ao laboratório; em especial às residentes da Infectologia Pediátrica: Bruna Norcia e Camila Cabrera e às residentes de Neonatologia: Tatiana Benevenuto, Mariana Moreira S. Dias e Letícia Grignani.

Aos funcionários do setor de Imunologia Clínica do Laboratório de Análises Clínicas (LAC) do HU/UEL, em especial à Cintia Ferrari e Ingrid Kisser, que receberam, identificaram e armazenaram as amostras inseridas no estudo. E aos funcionários Eliel Marcos Pedro e Maria Aparecida Aguiar que ajudaram a processar as amostras.

Aos funcionários dos Setores de Coleta do LAC do HU/UEL e do Ambulatório de Especialidades do HU/UEL, que procederam a coleta de sangue das mães e crianças e encaminharam as amostras ao Setor de Imunologia do LAC do HU/UEL.

Às amigas da CCIH: Cláudia D.M. Carilho, Joseani P. Garcia, Renata A. Belei, Neuza Paiva, Niclória J. Corneta, Regina L. J. Saissu, que me ajudaram nas atividades da CCIH durante os meus estudos.

Aos colegas do Setor de Infectologia do HU/UEL que me substituíram nas minhas atividades durante vários momentos de dedicação ao trabalho: Ronaldo S. Paiva, Zuleika Tano, Susana Wiechmann, Priscila A. Nader, Maria do Carmo Manfredini e Victor Narciso.

Aos docentes de Imunologia Clínica: Helena Kaminami Morimoto, Andréa Name Colado Simão, Elaine Regina Delicato de Almeida e Marcell Alysson Batisti Lozovoy.

À doutoranda Ana Paula Kallaur, pelas orientações para o uso do programa *GraphPad Prism*.

Aos pacientes e seus familiares que se dispuseram a coletar as repetidas amostras de sangue, responder aos questionamentos e, muitas vezes, aguardar com paciência o atendimento ambulatorial.

A todos os demais participantes da nossa equipe de trabalho, que trabalharam em parceria comigo e estiveram presentes em todas as etapas desse trabalho.

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível e de repente você estará fazendo o impossível.”

(São Francisco de Assis)

CAPOBIANGO, Jaqueline Dario. **Toxoplasmose adquirida na gestação e congênita:** características epidemiológicas, clínicas e diagnóstico laboratorial. 2014. 146 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2014.

RESUMO

Objetivos: Os objetivos deste estudo foram avaliar as características epidemiológicas e clínicas de crianças com toxoplasmose congênita; implantar a notificação de toxoplasmose adquirida durante a gestação e toxoplasmose congênita; avaliar os métodos de *Western Blot* (WB) para o diagnóstico da toxoplasmose congênita e de ensaio imunoenzimático com proteína recombinante de ropria 2 do *T. gondii* (ELISA-rROP2) para detecção de IgG anti-*T. gondii* em gestantes. **Materiais e Métodos:** Foi realizado um levantamento dos casos de toxoplasmose congênita atendidos, no período de 2000 a 2010, no Ambulatório de Infectologia Pediátrica, do Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário, da Universidade Estadual de Londrina (AEHU/UEL); posteriormente, foi implantada uma rotina de notificação de toxoplasmose na gestante e congênita, no período de agosto de 2013 a agosto de 2014, após a construção de uma ficha epidemiológica e um fluxo de notificação dos casos suspeitos e foram avaliados os métodos de WB com antígeno total de *T. gondii* em amostras de 99 pares de mães e crianças e de ELISA- rROP2 para pesquisa de IgG anti-*T. gondii* em 236 amostras de gestantes, sendo grupo A: susceptíveis (n=65), grupo B: infecção aguda (n= 48), grupo C: infecção há mais de 4 meses (n =58) e grupo I: imunes (n=65). Dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais foram obtidos por consulta aos prontuários dos pacientes e no sistema informatizado do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da UEL (LABHOS). Todas as amostras foram avaliadas para a detecção de IgG anti-*T. gondii* por imunofluorescência indireta (IFI) e por quimioluminescência (QL) e detecção de IgM anti-*T. gondii* por QL. Nas amostras das gestantes com IgM e IgG reagentes foi realizado o teste de detecção da avididade de IgG anti-*T. gondii* por QL. **Resultados:** No período de 10 anos, 236 crianças tiveram suspeita de toxoplasmose congênita e 31 (13,1%) tiveram o diagnóstico confirmado. Das 31 gestantes, 23 (85,2%) receberam assistência pré-natal, a infecção não foi diagnosticada em 20 (64,5%) e apenas 4 (12,9%) receberam o tratamento específico. Das 31 crianças, 29 foram avaliadas no primeiro mês de vida; destas, 24 (82,8%) apresentaram manifestações clínicas ao nascimento. Lesão ocular foi detectada em 23/31 (74,2%) crianças, sendo a coriorretinite a mais frequente (58,1%). Sequelas foram detectadas em 20/29 (68,9%) crianças e a seqüela visual foi a mais frequente, em 16/29 (55,2%). Níveis séricos de anticorpos IgM anti-*T. gondii* foram detectados em 15/31 (48,3%) crianças. Com a ficha de notificação, foram notificados 64 casos suspeitos de toxoplasmose adquirida na gestação. A maioria realizou atendimento pré natal (98,4%) e 41/58 (70,7%) gestantes não apresentou sintomas de toxoplasmose. O diagnóstico foi realizado no 1º trimestre de gestação em 27/59 (45,7%) gestantes e 50/64 (78,1%) receberam tratamento durante a gestação. Para a avaliação do método de WB, 15 crianças (15,5%) preencheram os critérios de toxoplasmose congênita e em 32 (32,2%) foi excluída a infecção congênita. Das 15 crianças com toxoplasmose congênita, 12 (80%) foram sintomáticas, 6 (40%) apresentaram IgM anti- *T. gondii* reagente, 5

(33,3%) com elevação de IgG anti-*T. gondii* nos primeiros meses de vida, um (6,7%) com persistência dos títulos de IgG anti-*T. gondii* em amostras seriadas e em 5/7 (71,4%) com reação em cadeia de polimerase (PCR) positiva. A sensibilidade do WB foi de 60,0% e a especificidade de 43,7%. A presença de sintomas ou WB positivo aumentou a sensibilidade do diagnóstico para 92,0% e a associação de WB ou PCR positivo para 89,1%. Considerando a IFI como padrão ouro, a sensibilidade do ELISA-rROP2 foi de 61,8 % e a especificidade de 62,8%. Considerando a QL como padrão ouro, o ELISA-rRop2 apresentou sensibilidade de 62,3% e especificidade de 62,4%. O ELISA-rROP2 foi reagente em 26/65 (40,0%) gestantes com infecção crônica e em 30/48 (62,5%) gestantes com infecção aguda ($p= 0,0180$). A positividade encontrada pelo ELISA-rROP2 para o grupo de gestantes com infecção há mais de 4 meses foi de 50/58 (86,2%). **Conclusões:** O presente estudo demonstrou que entre 2000 e 2010, a maioria das gestantes cujos filhos apresentaram toxoplasmose congênita e foram atendidos no AEHU/UJEL, não recebeu tratamento para toxoplasmose durante a gravidez. A maioria das crianças era sintomática no primeiro mês de vida e com elevada frequência de sequelas. A ficha de notificação foi útil para a obtenção de dados epidemiológicos, de diagnóstico e acompanhamento dos casos suspeitos. De agosto de 2013 a agosto 2014, a maioria das gestantes recebeu atendimento pré-natal e tratamento para toxoplasmose durante a gestação. O WB mostrou-se útil na avaliação sorológica de pacientes com toxoplasmose congênita. Embora não deva ser utilizado isoladamente para o diagnóstico de toxoplasmose congênita, quando associado a clínica, presença de IgM ou PCR positiva, apresentou aumento na sensibilidade. Anticorpos IgG anti-rROP2 foram detectados por ELISA tanto na fase aguda quanto na crônica da toxoplasmose na gestação, com maior sensibilidade em amostras de gestantes com infecção há mais de 4 meses que apresentaram IgG anti *T. gondii* de forte avidéz.

Palavras-chave: Toxoplasmose. *Toxoplasma*. Toxoplasmose congênita. Gravidez. Notificação de doenças. Proteínas recombinantes. Proteína ROP 2. Ensaio de imunoabsorção enzimática. *Western Blotting*. Diagnóstico. Sorologia.

CAPOBIANGO, Jaqueline Dario. **Toxoplasmosis acquired in pregnancy and congenital toxoplasmosis**: epidemiological and clinical characteristics, and laboratory diagnosis. 2014. 146 p. Thesis (Doctorate in Health Sciences) – State University of Londrina, Londrina. 2014.

ABSTRACT

Objectives: The objectives of this study were to evaluate the epidemiological and clinical characteristics of children with congenital toxoplasmosis; to introduce a routine of toxoplasmosis notification obtained during pregnancy and congenital toxoplasmosis; to evaluate the methods of Western Blot (WB) for the diagnosis of congenital toxoplasmosis and the enzyme linked immunoassay with recombinant protein rhoptry 2 of *T. gondii* (ELISA- rROP2) to detect IgG anti-*T. gondii* in pregnant women. **Materials and Methods:** It was conducted a survey of cases of congenital toxoplasmosis attended during 2000 to 2010 in the Pediatric Infectious Disease Clinic, at the Specialty Clinic of the University Hospital, at State University of Londrina (AEHU / UEL); further, it was introduced a notification routine in pregnancy and for congenital toxoplasmosis after building an epidemiological record and a notification flow for suspected cases, applied from August 2013 to August 2014; and the evaluation of two serological tests for research antibodies anti-*T. gondii*, WB with total antigen of *T. gondii* in 99 pairs of mothers and children and ELISA-rROP2 in 236 samples of pregnant women according to the serological profile: Group A: susceptible (n = 65), Group B: acute infection (n = 48), Group C: infection for more than 4 months (n = 58) and Group I: immune (n = 65). Epidemiological, clinical, and laboratory data were obtained from the records of patients and in the computerized system of the Clinical Laboratory of the University Hospital of UEL (LABHOS). All the samples were evaluated by conventional serological methods such as toxoplasmosis IgG anti-*T. gondii* by indirect immunofluorescence (IIF), chemiluminescence (QL), and detection of IgM anti-*T. gondii* by QL. Pregnant samples with IgM and IgG reagents were tested for IgG avidity anti-*T. gondii* by QL. **Results:** The retrospective cohort study of 236 children with suspected congenital toxoplasmosis identified 31 cases; of them, 23 (85.2%) pregnant received prenatal care, toxoplasmosis infection was not diagnosed in 20 (64.5%) and only 4 (12.9%) received specific treatment. As for the 29 children evaluated in the first month of life, 24 (82.8%) already had clinical manifestations. Eye injury was detected in 23/31 (74.2%) children, and chorioretinitis was the most frequent (58.1%). The presence of sequelae was detected in 20/29 (68.9%) children and the visual sequelae was most frequent in 16/29 (55.2%). Serum IgM anti-*T. gondii* were detected in 15/31 (48.3%) children. With the notification procedure, 64 suspected cases of toxoplasmosis acquired during pregnancy were reported. Most pregnant had prenatal care (98.4%) and 41/58 (70.7%) showed no symptoms of toxoplasmosis. The diagnosis was made on the 1st trimester on 27/59 (45.7%) pregnant and 50/64 (78.1%) patients received treatment during pregnancy. For the evaluation of WB, 15 children (15.5%) met the criteria for congenital toxoplasmosis and in 32 (32.2%) congenital infection was excluded. Of the 15 children with congenital toxoplasmosis, 12 (80%) were symptomatic, 6 (40%) had anti *T. gondii* IgM reagent, 5 (33,3%) with elevation of anti-*T. gondii* IgG during the first months of life and 1 (6.7%) with persistence of anti- *T. gondii* IgG titers in serial samples, and 5/7 (71.4%) with positive polymerase chain reaction (PCR). The

sensitivity of the WB was 60.0% and specificity was 43.7%. The presence of symptoms or positive WB increased the sensitivity of diagnosis to 92.0% and the association of positive WB or PCR showed sensitivity of 89.1%. Considering the IIF as the gold standard, the sensitivity of the ELISA-rROP2 was 61.8% and the specificity of 62.8%. Considering the QL as the gold standard, the ELISA-rROP2 had sensitivity of 62.3% and specificity of 62.4%. The ELISA-rROP2 was reagent in 26/65 (40.0 %) pregnant women with chronic infection and in 30/48 (62.5%) pregnant women with acute infection ($p = 0.0180$). The positivity by ELISA -rROP2 for the group of pregnant with infection for more than 4 months was 50/58 (86.2%).

Conclusions: The results demonstrated that from 2000 to 2010, the majority of pregnant women whose children presented congenital toxoplasmosis and had received care at the reference center of AEHU/UJEL were given no treatment for toxoplasmosis during the pregnancy. The majority of children were symptomatic in the first month of life, and a high frequency of sequelae was also observed. The record of notification was helpful in obtaining the epidemiology, diagnosis and management data of suspected cases. From august 2013 to august 2014, the majority of patients received pre-natal care and treatment for toxoplasmosis during pregnancy. The WB had proven to be useful in the serological evaluation of patients with congenital toxoplasmosis. Although it should not be used alone for the diagnosis of congenital toxoplasmosis, when combined with clinical, IgM positive or PCR, it increased sensitivity. Anti-rROP2 IgG antibodies can be detected both in the acute and chronic phases of toxoplasmosis during pregnancy, although the sensitivity was higher for pregnant women with infection more than 4 months, mostly on those with high avidity of IgG anti *T. gondii*.

Keywords: Toxoplasmosis. *Toxoplasma*. Congenital Toxoplasmosis. Pregnancy. Disease Notification. Recombinant Proteins. ROP 2 protein. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Western Blotting. Diagnosis. Serology.

LISTA DE ABREVIATURAS

AEH	Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CENTROLAB	Laboratório Central do Município
CMV	Citomegalovírus
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
ELFA	Enzimaimunoensaio por fluorescência
ELISA	Enzimaimunosensaio
ELISA rROP2	Enzimaimunosensaio de ROP2 recombinante
ELISA-GRA	Enzimaimunosensaio de grânulos densos
ELISA-MEM	Enzimaimunosensaio de membranas do parasita
HBcAg	Antígeno do core do vírus da hepatite B
HBsAg	Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
HCV	Vírus da hepatite C
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HTLV I/II	Vírus linfotrópico de células T humanas tipos I e II
HU/UEL Londrina	Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina
IC	Intervalo de confiança
IFI	Imunofluorescência Indireta
IgA	Imunoglobulina da classe A
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgM	Imunoglobulina da classe M
LCR	Líquido cefalorraquidiano
µg	Micrograma
µl	Microlitro
mL	Mililitro
mM	Milimol
mU	Miliunidades
MEIA	Método imunoenzimático com micropartícula revelado por
NHE	Núcleo Hospitalar de Epidemiologia

OR	Razão de chances
pb	Pares de bases
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia de polimerase
QL	Quimioluminescência
rELISA	Enzimaimunosensaio recombinante
RN	Recém nascido
ROP	Roptria
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil-sulfato de sódio
SINAM	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SNC	Sistema Nervoso Central
TBS	Solução Tris salina tamponada
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TC	Tomografia computadorizada
UI	Unidades internacionais
UBS	Unidade Básica de Saúde
UEL	Universidade Estadual de Londrina
USG	Ultrassonografia
VE	Vigilância epidemiológica
VPP	Valor preditivo positivo
VPN	Valor preditivo negativo
WB	<i>Western Blot</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Toxoplasmose Adquirida na Gestação	18
1.2	Toxoplasmose Congênita	21
2	JUSTIFICATIVA	26
3	OBJETIVOS	27
3.1	Objetivo Geral	27
3.2	Objetivos Específicos.....	27
4	METODOLOGIA	28
4.1	Aspectos Éticos	28
4.2	Delineamento.....	28
4.3	População	28
4.4	Cálculo do Tamanho da Amostra.....	28
4.5	Amostra.....	29
4.6	Crterios de Inclusão e Exclusão	29
4.7	Coleta de Sangue	31
4.8	Obtenção de Amostras de Soro de Gestantes e das Crianças.....	31
4.9	Reações Sorológicas para Detecção de IgM e IgG anti <i>T.</i> <i>gondii</i>	33
4.10	Obtenção de rROP2 e Taquizoítas de <i>T. gondii</i>	33
4.11	ELISA-rROP2 para Detecção de IgG anti- <i>T. gondii</i>	34
4.12	SDS-PAGE e WB.....	34
4.13	Análise do Perfil de Anticorpos Séricos Contra Proteínas de <i>T.gondii</i> na Infecção Aguda	35
4.14	Determinação da Especificidade dos Métodos de ELISA- rROP2 e WB	35
4.15	PCR para Detecção do DNA do <i>T. gondii</i>	36
4.16	Análise Estatística.....	36
5	RESULTADOS	37

Artigo 1	Toxoplasmose Congênita em um Serviço de Referência do Paraná, no Sul do Brasil	38
Artigo 2	Toxoplasmose Adquirida na Gestação e Congênita: uma Abordagem Prática na Notificação da Doença	46
Artigo 3	Avaliação do Método <i>Western Blot</i> para o Diagnóstico de Toxoplasmose Congênita	76
Artigo 4	Avaliação do Método Imunoenzimático com Antígeno Recombinante ROP2 (ELISA-rROP2) para o Diagnóstico de Toxoplasmose Adquirida na Gestação	100
	Apresentação de pôster em congresso com publicação em anais.....	123
6	CONCLUSÕES	127
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	128
	REFERÊNCIAS	129
	APÊNDICES	140
	APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	140
	APÊNDICE B - Questionário para Coleta de Dados Demográficos, Clínicos e Terapêuticos dos Indivíduos Inseridos no Estudo.....	142
	ANEXOS	145
	ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UEL.....	145
	ANEXO B - Emenda do Parecer do Comitê De Ética Em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UEL.....	146

1 INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma infecção de distribuição mundial causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), parasita intracelular obrigatório. O *T. gondii* existe em três formas: taquizoíta (fase proliferativa), bradizoíta (fase latente nos cistos teciduais) e oocisto, onde os esporozoítas se desenvolvem (AMATO-NETO; BALDY, 1989; MONTOYA; BOOTHROYD; KOVACS, 2010).

Os felinos são os hospedeiros definitivos do *T. gondii*, pois em seu epitélio intestinal ocorre o ciclo sexuado do parasita, com eliminação dos oocistos nas fezes. O homem, hospedeiro intermediário, se infecta pela ingestão de tecidos de animais contendo os cistos (carne crua ou mal passada) ou ingestão de alimentos (frutas e vegetais), água e material do meio ambiente (terra e areia) contaminados pelos oocistos esporulados. A forma congênita da infecção ocorre por transmissão transplacentária das formas circulantes do parasita durante a gestação (MONTOYA; BOOTHROYD; KOVACS, 2010).

T. gondii pertence ao filo Apicomplexa, além dos protozoários *Plasmodium* sp., *Cryptosporidium* sp., *Neospora caninum* e *Eimeria* sp, que têm em comum a presença de um complexo apical com organelas secretoras, micronemas, roptrias (ROPs) e grânulos densos (GRAs), que estão envolvidos na invasão da célula hospedeira (HAJJ et al, 2006).

Nas Américas Central e do Sul, 50,0 a 80,0% da população apresentam reatividade para os anticorpos da classe IgG específicos contra o *T. gondii*, o que caracteriza a exposição anterior ao parasita (HILL; DUBEY, 2002).

A prevalência da infecção em gestantes varia de 10,3 a 75,2% nos diversos países (ANTONIOU, 2004; ASPOCK, 2003; HUNG, 2007; LIU, 2009; NASH, 2005). No Brasil, esta prevalência varia entre 31,0% e 91,6% (DETANICO; BASSO, 2006; FIGUEIRÓ-FILHO et al, 2005; GALISTEU et al, 2007; LAGO et al, 2009; LOPES et al, 2009; MOZZATTO; PROCIANOY, 2003; PORTO, et al 2008; REICHE et al, 2000; VARELLA et al, 2003).

1.1 Toxoplasmose Adquirida na Gestação

Mais de 90,0% das gestantes que adquirem a infecção são assintomáticas. Quando há manifestações clínicas, em geral são inespecíficas como febre, cefaleia, mialgia, adenomegalias e exantema (KRAVETZ; FEDERMAN, 2005). Na França, apenas 5% dos casos são sintomáticos (DUNN, et al. 2009). Nos Estados Unidos da América (EUA), 52,0% das mães de 131 crianças com toxoplasmose congênita negaram sintomas e fatores de risco associados à transmissão do parasita durante a

gestação. No Brasil, Castillo-Pellosso et al (2007) relataram cefaleia em 100,0% das gestantes, mialgia em 58,0% e febre acompanhada de adenomegalia em 41,3%.

Com a limitação do diagnóstico da infecção pelo quadro clínico materno, o rastreamento sorológico sistemático durante a gravidez é uma ferramenta diagnóstica e tema debatido principalmente em regiões onde a prevalência de imunidade pré-concepcional não é elevada e cujo risco de soroconversão durante a gestação é alto. Segundo Lago et al. (2009), em um estudo realizado no Rio Grande do Sul (Brasil), com 2513 parturientes, 1190 (47,8%) eram imunes e 684 (27,2%) não tinham o diagnóstico correto da infecção pelo *T. gondii* durante a gestação, por falta de pré-natal (29,0%), não realização do teste (39,0%), falta de documentação (26,0%) e exames sorológicos incompletos (6,0%).

Entretanto, a interpretação dos exames sorológicos é complexa e é necessário o conhecimento das limitações de cada técnica, a avaliação do perfil das classes de imunoglobulinas presentes e a sua associação com a idade gestacional (JONES; LOPEZ; WILSON, 2003). Sem a interpretação correta dos resultados, muitas gestantes são tratadas desnecessariamente e outras, por falha ou ausência de diagnóstico, não são tratadas. Ambas as situações podem ser danosas tanto para mãe quanto para o feto (REMINGTON et al., 2006).

Como auxiliar na determinação do tempo da infecção utiliza-se a detecção de anticorpos IgM específicos contra o *T. gondii*; entretanto, a interpretação do resultado IgM reagente é difícil pela persistência de anticorpos IgM residuais por mais de 18 meses após a infecção e pela reação falso positiva obtida nos testes comerciais (JONES; LOPEZ; WILSON, 2003; WILSON; MCAULEY, 1999). O teste de avididade de IgG é recomendado como teste confirmatório em mulheres que realizam a primeira sorologia antes de 16 semanas de gestação e apresentam IgM reagente (LIESENFELD et al., 2001). No entanto, no Brasil, a grande dificuldade de utilizar este exame como confirmatório é que muitas gestantes iniciam o pré-natal tardiamente (AGUIAR, 2008; CARELLOS; ANDRADE; SPALDING et al., 2003) e, nestes casos, a detecção de IgG de forte avididade, não exclui que a infecção tenha ocorrido no início da gestação.

Bessières et al. (2006) relataram as dificuldades da interpretação da sorologia para toxoplasmose em vários casos clínicos como: a) IgM reagente até três anos após infecção; b) soroconversão com níveis de IgM muito baixos; c) presença de IgM inespecífica; d) resposta retardada de IgG (dois meses após detecção de IgM); e e) reativação sorológica com aumento do título de IgG, aparecimento de IgA, ausência de IgM e IgG de forte avididade. Mesmo com estas dificuldades, os autores recomendam o diagnóstico laboratorial, lembrando que podem ocorrer resultados discordantes e que

estes devem ser definidos por meio da repetição dos exames após algumas semanas ou com o emprego de vários testes diferentes para a pesquisa de anticorpos.

Os diversos métodos sorológicos utilizam diferentes antígenos de *T. gondii*. A reação de imunofluorescência indireta (IFI) da Biolab-Merieux (Imunoblot[®], Jacarepaguá, Rio de Janeiro, Brasil) utiliza o *T. gondii* obtido a partir de líquido ascítico de camundongos; o teste de enzima-imunoenensaio por fluorescência (ELFA) da Bio-Merieux (Vidas[®], Toxo IgG II, Marcy-l'Etoile, França) utiliza a cepa RH Sabin de *T. gondii* cultivada em camundongos; o método imunoenzimático com micropartícula revelado por fluorescência (MEIA) da Abbott (Abbott-AxSYM[®], System Toxo IgM, Abbott Park, IL, EUA) utiliza partículas de *T. gondii* derivadas de cultura de células HeLa; o imunoenensaio de micropartículas por quimioluminescência (QL) da Abbott Toxo IgG e IgG Avidex (Architect[®], System Abbott, Toxo IgG e IgG Avidex, Wiesbaden, Alemanha) utiliza antígeno recombinante p30 (SAG1) e p35 (GRA 8) do *T. gondii*; o método de QL da Abbott Toxo IgM (Architect[®], System Abbott, Toxo IgM, Wiesbaden, Alemanha) utiliza o antígeno p30 do *T. gondii* e lisado de *T. gondii*.

Novas metodologias já foram desenvolvidas como a detecção de anticorpos contra proteínas de frações de *T. gondii* por enzima-imunoenensaio (ELISA): fração 1 - membranas do parasita (ELISA-MEM), fração 3 - roptrias (ELISA-ROP) e fração 4 - grânulos densos e micronemas (ELISA-GRA) (GARCIA et al., 2004).

Na Europa, o perfil antigênico predominante do *T. gondii* é a proteína de grânulo denso 6 (GRA6) tipo II, enquanto na América Latina e na África, o que prevalece é o GRA6 tipo I / III. Portanto, novos peptídeos de diferentes marcadores devem ser identificados, a fim de diferenciar os diversos sorotipos (SOUSA et al., 2008).

Vários genes foram clonados e expressos para produzir proteínas recombinantes, como antígenos de superfície (SAG), ROP e GRA, presentes nos taquizoítas e bradizoítas do *T. gondii* (KOTRESHA et al, 2010). Os taquizoítas de *T. gondii* possuem um conjunto de 8 a 12 ROPs (DUBREMETZ et al, 2007). As proteínas ROP2, ROP4 e ROP7 são os principais membros de proteínas identificadas da família ROPs e são altamente específicos para *T. gondii*. ROP2 e ROP4 demonstraram ser expressas também em bradizoítas e esporozoítas (HAJJ et al, 2006).

Golkar et al. (2008) avaliaram o papel dos antígenos recombinantes no diagnóstico de infecção aguda em gestantes e desenvolveram um teste GRA6-ELISA-IgG e GRA6-ELISA-IgM que apresentaram sensibilidade e especificidade de 87,5 e 94,1%, respectivamente, quando comparado com testes sorológicos de rotina. Os autores recomendaram que esse antígeno, apesar de promissor, precisa ser melhor

estudado, para auxiliar na diferenciação de infecção aguda e crônica pelo *T.gondii* em gestantes.

Pfrepper et al. (2005) avaliaram anticorpos contra proteínas recombinantes de roptrias 1 (ROP1) pelo ELISA (rELISA), com 102 soros de gestantes com toxoplasmose aguda e duas crianças e compararam com 71 soros de indivíduos com infecção crônica. Em amostras reativas para IgM, os anticorpos anti-ROP1 foram predominantes, independentemente do estado da infecção. Os dados revelaram que o rELISA fornece informações valiosas sobre o estado real da infecção, especialmente durante o início da infecção. Da mesma forma, os autores Holec-Gasior, Kur e Hiszczynska-Sawicka (2009) demonstraram que ambos os antígenos recombinantes, GRA2 e ROP1, são detectados com maior frequência em indivíduos com infecção aguda (100,0% e 94,6%, respectivamente) do que em indivíduos com infecção crônica (22,5% e 15,5%, respectivamente), sugerindo que anticorpos IgG anti-GRA2 e anti-ROP1 são produzidos durante a fase aguda de toxoplasmose.

A identificação de proteínas expressas na fase aguda da toxoplasmose poderá contribuir na padronização de uma técnica de diagnóstico com melhora da sensibilidade e especificidade para a diferenciação de infecção aguda e crônica pelo *T. gondii* em gestantes (GOLKAR et al., 2007).

O diagnóstico precoce da infecção pelo *T. gondii* e o tratamento antiparasitário adequado nas gestantes são medidas que podem reduzir a gravidade das sequelas no feto (FOULON; NAESSENS; DERDE, 1994). O tratamento durante o primeiro trimestre de gestação é realizado com espiramicina, pois a pirimetamina é teratogênica neste período gestacional. O tratamento com espiramicina reduz a incidência de transmissão congênita em 60,0% (HOHLFELD et al, 1989). Após o primeiro trimestre, o tratamento de escolha é a combinação de sulfadiazina, pirimetamina e ácido fólico, pois estas medicações atravessam a barreira placentária e tratam o feto infectado. Os medicamentos devem ser mantidos até o final da gestação (MONTROYA et al., 2010; REMINGTON et al., 2011).

1.2 Toxoplasmose Congênita

O risco de transmissão fetal varia conforme a resposta imune materna, virulência do parasita e a idade gestacional em que ocorreu a infecção (DUNN et al., 1999). No período periconcepcional, este risco é de 0 a 2,0%, no primeiro trimestre é de 10,0 a 25,0%, no segundo trimestre é de 30,0 a 54,0%, no terceiro trimestre é de 60,0 a 65,0% e próximo ao parto, o risco é de até 80,0% (MONTROYA et al, 2010). Porém, a gravidade da doença congênita é maior quando a transmissão ocorre no início da gestação e diminui à medida que a idade gestacional avança, tendo como

período mais crítico de risco de doença fetal, da 10^a a 26^a semana de idade gestacional (DESMONTS, 1982; DESMONTS et al, 1985; REMINGTON et al., 2006).

Portanto, a taxa de transmissão varia de 20,0 a 70,0% e ocorre em torno de metade das gestantes sem tratamento (FIGUEIRÓ-FILHO, 2005). Estudos realizados no Brasil demonstram esta variabilidade. Em Mato Grosso do Sul, a taxa geral de transmissão foi de 3,9% entre 32.512 gestantes avaliadas (FIGUEIRÓ-FILHO, 2005). No Rio Grande do Sul, Spalding et al (2003) encontraram taxa total de transmissão congênita de 6,0%, em uma coorte de 50 pares mãe-bebê.

A incidência da toxoplasmose congênita no Brasil é de 0,3 a 5,0 para cada 1.000 nascimentos (LAGO et al, 2009; MOZZATTO; PROCIANOY, 2003; NETO et al, 2000; SEGUNDO et al, 2004; SPALDING et al, 2003). Em Minas Gerais, entre 146.307 amostras analisadas, a incidência de recém nascidos com IgM reagente no “teste do pezinho” realizado entre novembro de 2006 e maio de 2007, variou de 0 a 76,9/1.000 nascidos vivos, conforme a região analisada (CARELLOS et al, 2014).

A maior parte dos casos de doença congênita não apresenta sinais ou sintomas ao nascer, caracterizando infecção subclínica; mesmo assim, a criança apresenta risco de desenvolver sequelas tardias, principalmente oculares e neurológicas (BEVERLEY, 1973). Para os casos sintomáticos, a gravidade das manifestações clínicas está relacionada ao trimestre da gestação em que ocorre a transmissão, com morte fetal no primeiro trimestre da gestação, coriorretinite, microcefalia e deficiência mental no segundo trimestre; adenomegalia, hepatoesplenomegalia, lesões oculares e calcificações cerebrais no terceiro trimestre (FRENKEL, 2002; MCAULEY, 2009; REMINGTON et al., 2006).

O risco de a criança desenvolver manifestações clínicas antes dos três anos de vida é de até 75,0%, quando a soroconversão de anticorpos maternos ocorre no primeiro trimestre da gestação (DUNN et al, 1999; PINARD; LESLIE; INVINE, 2003).

São consideradas suspeitas todas as crianças, sintomáticas ou não, que são filhas de mães com toxoplasmose aguda no curso da gestação ou que nascem com sinais ou sintomas da doença que incluem icterícia, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, microcefalia, hidrocefalia, anemia, convulsões, baixo peso, prematuridade, coriorretinite, calcificações cerebrais, nistagmo, estrabismo, microcefalia, iridociclite e alterações do líquido cefaloraquidiano (LCR) (REMINGTON et al., 2011)

Em uma coorte de 210 crianças avaliadas na década de 50, 3,8% eram prematuras e 6,2% apresentavam retardo de crescimento intrauterino (COUVREUR et al, 1984). Em estudos brasileiros, entre as crianças com toxoplasmose congênita, a frequência de meninos infectados varia de 45,5 a 75,0% e o peso de nascimento varia

de 1290 a 3790 g (BAHIA et al, 1992; CARVALHEIRO et al, 2005; LAGO et al, 2007, 2009; MELAMED et al, 2001, 2009; SAFADI et al, 2003; VASCONCELOS-SANTOS et al, 2009). Sáfadi et al (2003) encontraram 84,0% de crianças com toxoplasmose congênita com peso ≥ 2500 g.

A toxoplasmose congênita pode se manifestar de quatro formas: infecção subclínica, doença manifesta no período neonatal, doença grave ou discreta manifesta nos primeiros meses de vida, sequela ou reativação de infecção prévia não diagnosticada (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2009; REMINGTON et al., 2006).

Nos recém-nascidos e lactentes sintomáticos, a apresentação clínica pode ser dividida, didaticamente, em forma neurológica e generalizada. A forma neurológica, resultante de infecção fetal precoce na gestação, caracteriza-se por calcificações intracranianas geralmente difusas, coriorretinite, convulsões, hidrocefalia ou microcefalia, caracterizando a tétrede de Sabin (FRENKEL, 2002). A forma generalizada, resultante de infecção mais tardia na gestação, apresenta coriorretinite, alterações no LCR, hepatoesplenomegalia, icterícia, linfadenomegalia, trombocitopenia e anemia (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2009; REMINGTON et al., 2006)

Ainda na década de 50, Einchenwald (1960) relatou os sinais e sintomas de 152 crianças com toxoplasmose congênita sem tratamento, classificando-as em doença neurológica em 108 (71,0%) pacientes e doença generalizada em 44 (29,0%) pacientes. Em relação ao total de casos, a principal manifestação foi a coriorretinite (85,5%), seguida de alterações no LCR (63,2%), icterícia (43,4%), esplenomeglia (41,4%), convulsões (40,8%), febre (40,1%), calcificações (36,8%), hepatomegalia (34,2%), linfadenomegalia (31,5%), hidrocefalia (18,4%), microcefalia (9,2%), catarata (3,3%) e microftalmia (3,3%) (Einchenwald, 1960, *apud* MCLEOD 2009).

Em uma coorte de 54 recém nascidos com toxoplasmose congênita cujo diagnóstico foi realizado durante o pré-natal, 81,0% apresentaram infecção subclínica, 13,0% calcificações intracranianas, 6,0% coriorretinite e 2,0% alterações no LCR (HOHFELD et al, 1989). COUVREUR et al. (1984) encontraram 10,0% de crianças com icterícia, 4,2% com hepatoesplenomegalia, 2,8% com microftalmia, 5,2% com estrabismo, 21,8% com coriorretinite, 5,2% com microcefalia, 84% com tomografia computadorizada (TC) de crânio alterada e 34,2% com alterações no LCR.

Estudos brasileiros demonstram que as manifestações clínicas precoces estão presentes em 56,0 a 100,0% das crianças analisadas, coriorretinite em 67,0 a 80,0% das crianças e calcificação intracraniana em 11,0 a 100,0% dos casos (BAHIA; ORÉFICE; ANDRADE, 1992; BAHIA-OLIVEIRA et al., 2001; CARVALHEIRO et al.,

2005; LAGO et al., 2007, 2009; MELAMED et al., 2001, 2009; SAFADI et al., 2003; VASCONCELOS-SANTOS et al., 2009). Rodrigues et al. (2009) encontraram hidrocefalia em 21,0% das crianças e Vasconcelos–Santos et al. (2010) relataram hidrocefalia em 6,3% e microcefalia em 5,3% das crianças avaliadas.

As lesões oculares não são totalmente dependentes da idade gestacional em que ocorre a infecção materna e podem aparecer casos graves de coriorretinite mesmo nas infecções adquiridas pela mãe na segunda metade da gestação. Além disso, a coriorretinite é a mais frequente das sequelas e o risco de sua manifestação persiste por muitos anos (GILBERT et al., 2008). Em relação às lesões oculares nas crianças brasileiras com toxoplasmose congênita, 29,0 a 100,0% apresentaram coriorretinite na evolução, sendo bilateral em 12,0 a 84,0%. A microftalmia é citada em 9,0 a 25,0% dos casos, estrabismo em 12,0 a 60,0%, nistagmo em 3,0 a 47,0%, catarata em 1,0 a 14,0%, vitreíte em 3,0 a 50,0% e prejuízo da visão em 50,0 a 100,0% dos pacientes (BAHIA; ORÉFICE; ANDRADE, 1992; BAHIA-OLIVEIRA et al., 2001; CARVALHEIRO et al., 2005; GILBERT et al., 2008; LAGO et al., 2007, 2009; MELAMED et al., 2001, 2009; RESENDE et al., 2009; RODRIGUES et al., 2009; SAFADI et al., 2003; VASCONCELOS-SANTOS et al., 2009).

As manifestações oculares são mais graves em estudos brasileiros do que em crianças europeias e americanas (COUVREUR et al., 1984; GILBERT et al., 2008). Uma das possíveis explicações para este fato seja a presença de cepas mais virulentas do *T. gondii* no Brasil (DUBEY et al., 2012).

São descritos alguns fatores de risco associados ao desenvolvimento de coriorretinite como sexo feminino [*Odds Ratio* (OR) = 2,02; Intervalo de Confiança (IC) 95% 1,01 - 4,1, p = 0,049], a presença de lesões calcificadas cerebrais (OR = 4,03 IC 95% 1,9 - 10, p = 0,0006) e o atraso no tratamento materno após a soroconversão (OR = 2,54 IC 95% 1,14 - 5,65, p = 0,02) (KIEFFER et al., 2008; MCLEOD, 2009).

Os lactentes podem permanecer sem sequelas da infecção ou desenvolver, além do prejuízo da visão, outras sequelas como o retardo neuropsicomotor, hidrocefalia, convulsões e surdez, meses ou mesmo anos após o nascimento, mesmo quando são assintomáticos ao nascimento (MCLEOD, 2009; REMINGTON et al., 2006).

Resende et al. (2010) verificaram que, entre 178 crianças analisadas, 19 (18%) apresentaram prejuízo da audição. Einchenwald (1960) encontrou 12,4% de crianças com toxoplasmose congênita com surdez (Einchenwald, 1960, *apud* MCLEOD 2009).

A infecção do sistema nervoso central (SNC) pelo *T. gondii* leva à necrose celular em áreas do parênquima, cerebelo, tronco cerebral e medula espinhal (REMINGTON et al., 2006). Conforme a idade gestacional em que a infecção ocorre,

as lesões têm sido descritas em regiões distintas do SNC; lesões em gânglios da base ocorrem com maior frequência antes da 20ª semana de idade gestacional e as lesões periventriculares após a 20ª semana (DIEBLER, 1985). Os exames de imagem TC e ultrassonografia (USG) de crânio têm sido utilizados para o diagnóstico das principais lesões como ventriculomegalia, hidrocefalia e calcificações. Estudos sugerem que a TC é mais sensível que a USG para detectar calcificações cerebrais (CALABET et al., 1985; GRANT et al., 1985). Porém, Lago et al. (2007) compararam a TC e o USG em 33 crianças com toxoplasmose congênita e encontraram concordância de 94,0% entre os dois exames ($kappa = 0,88$, IC 95% = 0,71-1,0, $p < 0,001$).

Vários são os possíveis defeitos endócrinos resultantes de disfunção hipotalâmica e pituitária acarretadas por lesões do SNC pela toxoplasmose (NUNES et al, 2013). A puberdade precoce central ocorre quando distúrbios intracranianos como hidrocefalia, cistos aracnóides e processos inflamatórios podem levar a uma ativação prematura do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (BRITO; LATRONICO, 2013).

A transmissão congênita da toxoplasmose em gestantes infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) tem sido descrita, incluindo em gestantes cronicamente infectadas pelo *T. gondii* (AZEVEDO et al., 2010; DELICIO et al, 2011; DUBEY et al., 2012; FERNANDES et al., 2009).

Há vários relatos de casos de coinfeção por citomegalovírus (CMV) e *T. gondii* (DEMIAN, 1973; De ZEGHER, 1988; REMINGTON et al., 2006), o que reforça a necessidade de investigação de coinfeções nestes pacientes.

Os casos suspeitos de toxoplasmose congênita devem ser submetidos à investigação sorológica com pesquisa de anticorpos específicos anti-*T. gondii*. A obtenção de reatividade de anticorpos da classe IgM e/ou IgA, ou a persistência ou aumento dos títulos de anticorpos da classe IgG em amostras seriadas são perfis sorológicos que caracterizam a infecção congênita (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2009; REMINGTON et al., 2006).

O diagnóstico sorológico confirmatório da infecção pelo *T. gondii* pela detecção dos anticorpos específicos da classe IgM tem sido citado em 50,0 a 75,0% dos recém-nascidos (LAGO et al., 2007; LEBECH et al., 1999; REMINGTON et al., 2006). A presença de anticorpos IgG anti-*T. gondii* nas amostras do recém-nascido não é evidência de infecção, visto que os anticorpos IgG maternos são transferidos passivamente e podem persistir por um ano. Cerca de três meses são necessários para que ocorra uma queda de 10 diluições no título de anticorpos maternos no soro do lactente, fazendo com que os anticorpos IgG anti- *T. gondii* devam ser avaliados em amostras seriadas de soro para confirmar a presença da infecção na criança

(FRENKEL; BERMUDEZ, 2005; REMINGTON et al., 2006; RODRIGUES et al., 2009).

No feto infectado, os anticorpos IgG e IgM produzidos contra os determinantes antigênicos do *T. gondii* podem diferir daqueles anticorpos IgG e IgM detectados no soro materno. Casos de toxoplasmose congênita têm sido diagnosticados nos primeiros meses de vida, utilizando o *Western Blot* (WB) quando os testes convencionais de IgM apresentam resultado não reagente (PINON et al., 2001; REMINGTON et al., 1985, 2006; TISSOT DUPONT et al., 2003).

Um dos benefícios do tratamento da toxoplasmose congênita é a redução de sequelas oculares e neurológicas nas crianças infectadas (MCLEOD, 2006, 2009). Phan et al. (2008a, 2008b) demonstraram o efeito protetor do tratamento precoce das crianças em relação às lesões oculares em dois estudos longitudinais; estes autores observaram que 72,0% das crianças não tratadas desenvolveram uma nova lesão ocular durante o seguimento, enquanto que apenas 31,0% das crianças tratadas as desenvolveram.

Quanto aos efeitos colaterais do tratamento, o mais temido tem sido a neutropenia decorrente do efeito mielotóxico da sulfadiazina e da pirimetamina, que é reversível com ajuste de dose do ácido fólico e/ou suspensão temporária das medicações (REMINGTON et al., 2006). McLeod et al. (2006) também relataram neutropenia reversível na coorte de pacientes avaliada no período de 1981 a 2004, com doses diárias de pirimetamina durante dois meses ou com doses diárias durante seis meses.

2 JUSTIFICATIVA

Muitas são as dificuldades na interpretação dos resultados obtidos nos testes sorológicos para diagnóstico de toxoplasmose, tanto para a triagem quanto para a confirmação; deste modo, os exames laboratoriais devem ser definidos por meio da repetição dos testes com a avaliação de outra amostra coletada após algumas semanas ou com o emprego de vários testes para a pesquisa de diferentes classes de anticorpos. Além disso, antígenos específicos derivados do *T. gondii* podem ser empregados para determinar a fase da infecção, bem como, os que estão associados a infecções sintomáticas ou assintomáticas.

Assim, torna-se necessária a padronização de métodos de diagnóstico que utilizem antígenos específicos a fim de aumentar a sensibilidade e especificidade dos resultados, para que se tornem importantes ferramentas para a diferenciação de infecção aguda e crônica pelo *T. gondii* em gestantes e para o diagnóstico da infecção

congênita. É necessário o desenvolvimento de um método de diagnóstico rápido e de fácil execução para laboratórios de referência para toxoplasmose que possam diferenciar os casos duvidosos pelas técnicas convencionais empregadas na rotina laboratorial.

A partir da aprovação pelo Ministério da Saúde da Portaria nº 2472, Art. 6º, que inclui a toxoplasmose aguda durante a gestação e congênita na lista de notificação compulsória em Unidades Sentinelas, justifica-se a implantação de uma rotina de notificação dos casos de toxoplasmose adquirida durante a gestação e toxoplasmose congênita. A análise dos dados coletados será importante para o planejamento de ações de prevenção, diagnóstico e tratamento da doença nas mães e suas crianças.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar as características epidemiológicas, clínicas e diagnóstico laboratorial da toxoplasmose adquirida na gestação e congênita em um serviço de referência do norte do Estado do Paraná.

3.2 Objetivos Específicos

- 3.2.1 Avaliar as características clínicas e epidemiológicas das gestantes com toxoplasmose adquirida na gestação e das crianças com toxoplasmose congênita;
- 3.2.2 Implantar uma rotina de notificação de toxoplasmose adquirida durante a gestação e toxoplasmose congênita;
- 3.2.3 Determinar a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) do método WB para detecção de anticorpos IgG contra proteínas do *T. gondii* em soro de gestantes e crianças;
- 3.2.4 Comparar o perfil de anticorpos IgG anti-*T. gondii* presentes no soro materno e no soro da criança, por meio do método de WB.
- 3.2.5 Determinar a sensibilidade, especificidade, VPP e VPN do teste ELISA indireto com os antígenos recombinantes rROP2 do *T. gondii* (ELISA rROP2) para detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em soro de gestantes.

4 METODOLOGIA

4.1 Aspectos Éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (UEL) (ANEXOS A e B). As mães foram convidadas a participar voluntariamente da pesquisa e um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi obtido de todas as mães envolvidas na pesquisa (APÊNDICE A).

4.2 Delineamento

O presente estudo teve um delineamento descritivo, transversal e retrospectivo para atingir o objetivo 3.2.1; um estudo descritivo, transversal e prospectivo para o objetivo 3.2.2 e um estudo de avaliação do desempenho de um teste, descritivo, em amostras de um banco de soro de gestantes e crianças para os objetivos 3.2.3, 3.2.4 e 3.2.5

4.3 População

A população de casos foi constituída por gestantes e seus filhos com suspeita de toxoplasmose, atendidos no Ambulatório de Infectologia Pediátrica, do Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário (AEHU), da UEL.

Na região de Londrina, Paraná, o número de nascidos vivos em 2007 foi 13.000 e no ano de 2012 foi 11.022 (GABANI, 2010; DATASUS, 2012).

4.4 Cálculo do Tamanho da Amostra

Para calcular o tamanho da amostra foi considerada que a prevalência média de gestantes expostas ao *T. gondii* no Brasil é de 50,0% (LOPES et al., 2009; GALISTEU et al., 2007; MOZZATTO; PROCIANOY, 2003; VARELLA et al., 2003; LAGO et al., 2009), de gestantes não expostas ao parasita ou susceptíveis é de 50,0%, de toxoplasmose adquirida na gestação é em média de 5,0% (AVELINO et al., 2003; NÓBREGA; KARNIKOWSKI, 2005; FIGUEIRÓ-FILHO et al., 2005), de crianças infectadas é em média de 2,5% (média de 50% de taxa de transmissão, somando os três trimestres), de lactentes imunes com anticorpos maternos transmitidos passivamente é de 50,0% e de crianças susceptíveis é de 50,0% (MONTROYA et al., 2010).

Portanto, para o cálculo do tamanho da amostra considerando uma proporção esperada de 50,0% de mulheres grávidas infectadas, com IC de 95,0% e uma variação do IC de 0,30, o número de amostras necessário é de 43 para cada grupo.

Para uma proporção esperada de 50,0% de crianças expostas, IC de 95,0% e uma variação de IC de 0,35, o número de amostras necessário é de 31 para cada grupo. Se considerarmos um IC de 90% e variação do IC de 0,4, o número de amostras necessário é de 17 para cada grupo (HULLEY et al., 2006).

4.5 Amostra

Para a avaliação das características epidemiológicas e clínicas das gestantes com toxoplasmose adquirida na gestação e das crianças com toxoplasmose congênita, foram levantados os prontuários de 236 casos suspeitos de toxoplasmose atendidos durante o período de 2000 a 2010, no HU/UEL.

Para a implantação da rotina de notificação foram avaliados 64 casos de suspeita de toxoplasmose adquirida na gestação, atendidos no AEHU no período de agosto de 2013 a agosto de 2014, com base nos dados coletados com a ficha de notificação epidemiológica elaborada para o presente estudo.

Para a avaliação do WB a amostra de casos foi obtida por conveniência de tempo e local, de forma seriada e consecutiva, no período de junho de 2011 até junho de 2014, com a inclusão de todas as crianças atendidas no AEHU e no HU/UEL, diagnosticadas com suspeita de toxoplasmose e de suas respectivas mães, que aceitaram participar do estudo. As amostras foram numeradas, processadas e armazenadas em *freezer* - 20° C.

Para a avaliação do teste de ELISA rROP2 foi utilizado um banco de amostras de soro de gestantes com suspeita de toxoplasmose aguda atendidas nas cidades de Londrina, norte do Paraná e de Cascavel, noroeste do Paraná, no período de janeiro de 2011 até dezembro de 2013. As amostras de soro foram enviadas pelas Secretarias Municipais de Saúde de Londrina e de Cascavel, respectivamente e também foram numeradas e armazenadas em *freezer* -20° C.

Os dados demográficos, clínicos, de imagem de TC e USG de crânio, laboratoriais e terapêuticos dos pacientes inseridos no estudo foram coletados por meio de um questionário (APÊNDICE B) e por consulta aos prontuários do HU/UEL e sistema de informatização LABHOS do Laboratório de Análises Clínicas (LAC) do HU.

4.6 Critérios de Inclusão e Exclusão

Para o grupo de pacientes, foram incluídas crianças cujas mães tiveram suspeita de toxoplasmose com IgM anti-*T. gondii* reagente durante o período gestacional. Foram excluídas as gestantes imunocompetentes com diagnóstico de toxoplasmose prévio à gestação e os lactentes com toxoplasmose aguda adquirida, portanto fora do período gestacional. Para a definição da infecção da gestante foram

seguidos os critérios de Lebech (1996) e do Ministério da Saúde (BRASIL, 2013) (Quadro 1).

Foram consideradas com toxoplasmose congênita comprovada (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2009; BRASIL, 2013; LEBECH et al, 1996; REMINGTON et al., 2012): 1) Crianças com IgM anti-*T. gondii* reagente antes dos 6 meses de idade; 2) Crianças que, durante o acompanhamento, apresentaram persistência de positividade de IgG anti-*T. gondii* após 12 meses de vida, independentemente da presença de sinais ou sintomas da doença; 3) Crianças com elevação dos títulos de IgG anti-*T. gondii* em amostras seriadas, durante os primeiros meses de vida; 4) Crianças com sinais e/ou sintomas sugestivos de toxoplasmose congênita, filhas de mães com IgG anti-*T. gondii* reagente, após exclusão de outras possíveis etiologias (sífilis, citomegalovirose, rubéola); 5) Crianças cujas mães apresentaram reação em cadeia de polimerase (PCR) positiva para toxoplasmose no líquido amniótico e 6) Crianças com PCR positiva em sangue periférico coletado nos primeiros 6 meses de vida.

Quadro 1 Definições de casos de infecções pelo *Toxoplasma gondii* em gestantes

Comprovada:
<ul style="list-style-type: none"> • Soroconversão gestacional • Detecção do DNA do Toxoplasma em líquido amniótico pela PCR
Provável:
<ul style="list-style-type: none"> • IgG+, IgM+, baixo índice de avidéz (colhido em qualquer idade gestacional) • Aumento progressivo nos títulos de IgG, IgM • IgM+ e história clínica sugestiva de toxoplasmose aguda gestacional
Possível:
<ul style="list-style-type: none"> • IgG+, IgM+, índice de avidéz alto (colhido após 12 semanas de gestação) ou indeterminado • IgG+, IgM+, em amostra única colhida em qualquer idade gestacional, sem realização de índice de avidéz
Improvável:
<ul style="list-style-type: none"> • IgG+, IgM+ ou -, índice de avidéz alto (colhido antes de 12 semanas de gestação)
Ausente:
<ul style="list-style-type: none"> • IgG- e IgM- durante toda a gestação • IgG+ antes da concepção • IgM+, sem aparecimento de IgG

+: positiva

-: negativa

Fonte: BRASIL (2013, p. 114)

4.7 Coleta de Sangue

O sangue periférico dos indivíduos envolvidos na pesquisa foram coletados utilizando sistema de coleta a vácuo com EDTA como anticoagulante e sem anticoagulante. Após a coleta, o material foi imediatamente centrifugado a 3000 rotações por minuto (rpm). Alíquotas de soro foram numeradas e armazenadas em *freezer* -20 ° C para posterior análise.

4.8 Obtenção de Amostras de Soro de Gestantes e das Crianças

Para a avaliação do método de WB, foram utilizadas amostras dos 99 pares de mães e seus filhos atendidos no AEHU e no HU. Destes, foram incluídos 47 pares, sendo 15 crianças com toxoplasmose congênita e 32 susceptíveis. Em 52 crianças não houve tempo suficiente para definir o diagnóstico de infecção congênita.

As amostras de soro de gestantes foram obtidas a partir de um banco de soro da rotina de diagnóstico de triagem do pré-natal dentro do “*Programa de Vigilância em Saúde da Toxoplasmose Gestacional e Congênita*”, implantado nas macrorregionais de Londrina e Cascavel, Estado do Paraná.

Após análise na rotina laboratorial realizada durante o atendimento pré-natal, pelo Laboratório Central da Prefeitura (CENTROLAB), as amostras do município de Londrina foram encaminhadas ao LAC do HU para realização do teste de avidéz da IgG, conforme orientação da Secretaria Municipal de Saúde de Londrina. As amostras de soro provenientes de Cascavel, Paraná, foram encaminhadas após a análise na rotina laboratorial realizada durante o atendimento pré-natal, pela Divisão de Apoio Diagnóstico e Terapêutico do Laboratório Municipal de Cascavel.

No total, foram armazenadas 600 amostras de gestantes. Porém, destas foram incluídas no estudo 236 amostras nas quais foi possível a realização dos três métodos sorológicos (IFI, QL e ELISA rROP2). As amostras das gestantes foram separadas em quatro grupos de acordo com o perfil sorológico (Tabela 1).

Tabela 1 Distribuição das 236 amostras de soro de gestantes segundo perfil sorológico obtido nos testes convencionais de rotina para toxoplasmose para avaliação do ensaio indireto com proteínas recombinantes de roptrias 2 (ELISA rROP2) do *Toxoplasma gondii* para detecção de anticorpos IgG contra este antígeno

Grupo	n°. de amostras	IgG anti- <i>T.gondii</i>	IgM anti- <i>T.gondii</i>	Avidez da IgG anti- <i>T.gondii</i>	Diagnóstico de toxoplasmose
A	65	Não reagente	Não reagente	NA	Susceptível
B	48	Reagente	Reagente	Fraca ou Intermediária	Infecção há menos de 4 meses
C	58	Reagente	Reagente	Forte	Infecção há mais de 4 meses
I	65	Reagente	Não reagente	NA	Imunidade

IgG anti-*T. gondii*: realizado por imunofluorescência indireta (Biolab-Merieux, Immunoblot®, Jacarépaguá, Rio de Janeiro, Brasil) e por imunoenensaio de micropartículas por quimioluminescência IgM e IgG anti-*T. gondii*: (Architect®, System Abbott, Wiesbaden, Alemanha); amostras com reatividade para os anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii* foram submetidas ao teste de avidéz da IgG por imunoenensaio de micropartículas por quimioluminescência (Architect®, System Abbott, Wiesbaden, Alemanha); NA: não se aplica.

Fonte: a própria autora

4.9 Reações Sorológicas para Detecção de IgM e IgG anti *T. gondii*

A triagem sorológica pré-natal foi realizada por meio da pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. gondii* pelos métodos de IFI (Biolab-Merieux, Immunoblot®, Jacarepaguá, Rio de Janeiro, Brasil) com diluições do soro a partir de 1:16 em solução fisiológica (usou-se a razão 4 até a diluição 1:4096 e posteriormente a razão 2). Pacientes com títulos de IgG anti-*T. gondii* na IFI \geq 1:16 foram considerados expostos ou imunes ao parasita e as com resultados $<$ 1:16, não expostos ou susceptíveis (CAMARGO, 1973). Anticorpos IgG anti-*T. gondii* também foram determinados por QL (Architect®, System Abbott, Wiesbaden, Alemanha) e expressos em UI/mL. Anticorpos IgM anti-*T. gondii* foram determinados pelo método de QL (Architect®, System Abbott, Wiesbaden, Alemanha) expressos em “reagente” ou “não reagente”. As amostras com reatividade simultânea para os anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii* foram submetidas ao teste de avidéz da IgG por método de QL (Architect®, System Abbott, Wiesbaden, Alemanha).

4.10 Obtenção de rROP2 e Taquizoítas de *T. gondii*

Foi utilizada a cepa RH de *T. gondii*, inicialmente isolada por Sabin (1941) de uma criança com encefalite. Cinco camundongos suíços Webster albinos, fêmeas, com idade entre 45 a 60 dias e peso entre 25 e 40 g, foram inoculados pela via intraperitoneal com uma suspensão de taquizoítas vivos (10^5 /mL) em solução fisiológica estéril, obtidos por meio de lavagem peritoneal de camundongos previamente infectados. Quarenta e oito horas após a inoculação, os taquizoítas foram obtidos por lavagem da cavidade peritoneal com 3,0 mL de solução fisiológica estéril. Esta suspensão foi passada duas vezes em agulha de 27G, para rompimento de células do hospedeiro e centrifugadas a 2.500 rpm durante 10 minutos. O sedimento foi ressuscitado em solução fisiológica e padronizado em 10^9 taquizoítas/mL por contagem em câmara de Neubauer (LUNDÉN, 1995).

Os taquizoítas foram utilizados para extração do DNA e incorporação no vetor *Escherichia coli* (*E. coli*) para expressão da proteína rROP2, conforme descrito previamente (IGARASHI et al., 2008; PAGLIARI, 2013). Resumidamente, 1103 pares de base (pb), do segmento de nucleotídeos 1022 a 2125, fragmento 196-561 (MARTIN et al., 1998; NIGRO et al., 2001) do gene *ROP2* (Genbank Accession No. Z36906) foram expressos em *E. coli* e a proteína rROP2 com cerca de 47 kDa foi obtida e avaliada em eletroforese em gel de poliacrilamida com dudocil sulfato de sódio (SDS-PAGE). A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951) que resultou em 2.5 μ g/mL.

4.11 ELISA-rROP2 para Detecção de IgG anti-*T. gondii*

Microplacas de poliestireno foram sensibilizadas com a proteína rROP2 (IGARASHI et al., 2008). Estas proteínas foram adicionadas ao tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M, pH 9,6 na concentração de 2,5 µg/mL de proteínas, e adicionado o volume de 100 µL em cada cavidade das microplacas e posteriormente deixadas em repouso a 4°C, *overnight*. As microplacas foram lavadas com PBS-T (0,05% Tween 20, pH 7.4). Posteriormente, os poços foram bloqueados com 200 µL de tampão de bloqueio (tampão PBS-T) com 8% de leite em pó desnatado por 1 h. Após lavagem das microplacas, alíquotas de soro foram diluídas 1:200 em tampão de lavagem adicionado com 5 % de leite em pó desnatado. Um volume de 100 µL de controles positivo, negativo e das amostras foi dispensado nos poços da microplaca, com incubação a 37° C por 1 hora. Após nova lavagem da microplaca, 100 µL de conjugado anti-IgG humano marcado com peroxidase foram utilizados para a detecção da presença de anticorpos ligados aos antígenos adsorvidos na microplaca. Após nova lavagem, a reação foi revelada pela adição da solução de 100 µL de substrato cromogênico (40 mg orto-fenilenodiamina - Sigma, Saint Louis, MO, USA) em 100 mL de 0,1 M tampão citrato fosfato, pH 6,0 e 40 µL de H₂O₂. Após 15 min, a reação foi interrompida com 50 µL de solução HCl 1 N. A densidade óptica (DO) foi mensurada em um espectrofotômetro (Spectra II Microplate Reader, Tecan, (Tecan Group, Mannedorf, Switzerland) no comprimento de onda de 490 nm. Dos controles negativos, calculou-se o ponto de corte (*cut-off*), considerando a média das DO obtidas nos controles negativos acrescida de 2 desvios-padrão (DP) (GATKOWSKA, 2010; PAGLIARI, 2013). Foram consideradas amostras IgG reagente para rROP2 as que apresentaram valores ≥ 1 na relação entre DO amostra/DO *cut-off* (GATKOWSKA, 2010).

4.12 SDS-PAGE e WB

Primeiramente, as proteínas obtidas do lisado de *T. gondii* foram quantificadas por método de Lowry et al. (1951). Posteriormente, foram separadas por eletroforese de SDS-PAGE vertical em gel a 12% (LAEMMLI, 1970; TOWBIN, 1979). As amostras aplicadas foram diluídas em tampão de amostra e como curva de referência foi utilizado o marcador BenchMark™ (Pre-Stained Protein Ladder, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA). As proteínas separadas em SDS-PAGE foram transferidas eletroforicamente para membrana de nitrocelulose (iBlot Transfer Stacks Nitrocellulose, Mini, Invitrogen, Israel) em sistema de transferência semi-seco

(iBlot Gel Transfer System, Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA), seguindo as orientações do fabricante.

Para a realização do WB dos pares mãe-criança, o papel de nitrocelulose foi corado com *Ponceau* por 5 minutos sob agitação, para a avaliação da transferência das proteínas. Após lavagem com água destilada, as fitas de nitrocelulose foram cortadas e bloqueadas com leite desnatado a 5% + Solução Tris salina tamponada (TBS *Tween*) sob agitação durante 1 hora ou com incubação *overnight*. Após a incubação, foram realizadas três lavagens sob agitação com TBS e leite desnatado a 5%. Após a lavagem, foi adicionado o soro do paciente diluído em TBS *Tween* e leite desnatado a 5%, e deixado sob agitação por 1 hora e 30 minutos. Após três lavagens, sob agitação com TBS *Tween* e leite desnatado 5%, foi adicionado o conjugado anti-IgG humano obtido de cabra (Invitrogen™, CA, EUA), diluído em TBS *Tween* e leite desnatado a 5%, deixado sob agitação por 1 hora e 30 minutos. Após três lavagens, sob agitação com TBS *Tween* e leite desnatado 5%, foi adicionado o substrato cromógeno diaminobenzidina (DAB) e peróxido de hidrogênio. Quando as bandas eram observadas, a reação era interrompida com água destilada. Soros controles positivo e negativo para o *T. gondii* foram incluídos em cada teste. A leitura do WB foi realizada por duas pessoas com 100,0% de concordância.

4.13 Análise do Perfil de Anticorpos Séricos Contra Proteínas de *T.gondii* na Infecção Aguda

Amostras de soro das gestantes agrupadas conforme descrito na Tabela 1 (Grupos A, B, C e I) foram testadas pelo método de ELISA-rROP2. Posteriormente, uma análise qualitativa dos anticorpos contra as proteínas do taquizoíta do *T. gondii* foi realizada pelo método de WB no soro de puérperas com infecção aguda durante a gestação e de seus recém-nascidos com suspeita de infecção congênita, caracterizando, desta forma, os anticorpos dirigidos contra as principais proteínas expressas pela mãe e pelo lactente.

4.14 Determinação da Especificidade dos Métodos de ELISA-rROP2 e WB

A especificidade dos métodos sorológicos avaliados foi determinada com o emprego de 26 amostras de soro de indivíduos soronegativos para toxoplasmose (IgG e IgM anti-*T. gondii* não reagente) e que apresentaram sororeatividade a outros patógenos ou antígenos como *Treponema pallidum*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* spp., *Paracoccidoides brasiliensis* e HIV-1. Foram avaliados soros com reatividade a marcadores sorológicos de autoimunidade como anticorpos antinucleares e anti-DNA dupla hélice.

4.15 PCR para Detecção do DNA de *T. gondii*

A amplificação de DNA do *T. gondii* foi realizada por PCR usando o método descrito por Homan et al. (2000). Os *primers* Tox4 (CGCTGCAGGGAGGAA GACGAAAGTTG) e Tox5 (CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT) foram usados para a amplificação de um fragmento com 529 pb (GenBank No. AFI46527) de DNA de *T. gondii*. A PCR foi realizada em um volume final de 22,5 µL, contendo 2,5 µL de DNA extraído da amostra; 1 µL de 1,0 mM para cada *primer*, 100 mM de dNTP (Invitrogen, Life Technologies, CA, USA), 60 mM de Tris-HCl (pH 9.0), 15 mM de (NH₄)₂SO₄, 2 mM de MgCl₂ e 0,25 uL de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Life Technologies, CA, USA) e 7,75 µL de Água Mili Q. A amplificação do DNA do parasita foi realizada com 35 ciclos em termociclador PTC-100 (MJ-Research, CA, USA), utilizando a seguinte condição de ciclagem: 7 min a 94 °C para desnaturação no 1º ciclo, seguida por 33 ciclos de 1 min a 94 °C para desnaturação, 1 min a 55 °C para anelamento e 1 min a 72 °C para extensão; o ciclo 35º foi seguido por uma extensão final de 10 min a 72 °C. Alíquota de cada produto de PCR foi submetida a eletroforese em gel de agarose a 2%. Taquizoítas da cepa RH (10⁷/mL) tiveram seu DNA extraído para serem usados como controle positivo. A água foi considerada o controle negativo. Amostras controles positivo e negativo para o *T. gondii* foram incluídas em cada teste.

4.16 Análise Estatística

Um banco de dados foi criado no Programa Microsoft Office Excell 2007 e no Programa Epi Info 3.4. (DEAN,1994). A análise estatística foi realizada nos Programas *GraphPad Prism 5* (*GraphPad Software, Inc., San Diego, USA*) e SPSS 15.0. Variáveis categóricas foram expressas pelo número absoluto (n) e porcentagem (%) e analisadas pelos Testes de Qui-quadrado ou Exato de Fisher, quando apropriado. As variáveis contínuas foram expressas em mediana e variação interquartil (IQR) de 25%-75%. Para a análise de variáveis contínuas como a comparação dos níveis de anticorpos entre os grupos de pacientes, foi utilizado o teste Kruskal Wallis para três ou mais grupos. Para avaliação da concordância entre os resultados obtidos nos testes de ELISA- rROP2, IFI e QL, foi determinado o índice Kappa (LANDIS; KOCH, 1977). Valores de p < 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho estão apresentados e discutidos em quatro artigos científicos descritos a seguir.

O primeiro artigo foi a descrição das características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais dos casos de toxoplasmose congênita avaliados durante o levantamento de um período de 10 anos (2000 a 2010) de atendimento de crianças com suspeita de toxoplasmose congênita no AEHU da UEL, com o título: Toxoplasmose congênita em um serviço de referência do Paraná, no sul do Brasil. O artigo foi publicado na revista *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, em 2014: CAPOBIANGO JD, BREGANÓ RM, NAVARRO IT, NETO CP, CASELLA AM, MORI FM, PAGLIARI S, INOUE IT, REICHE EM. Congenital toxoplasmosis in a reference center of Paraná, Southern Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2014; 18 (4):364-71.

O segundo artigo relata a experiência da implantação da ficha de notificação da toxoplasmose em gestantes e crianças com o título: Toxoplasmose adquirida na gestação e congênita : uma abordagem prática na notificação da doença. O artigo será submetido à *Revista de Epidemiologia e Serviços de Saúde*, ISSN 1679-4974.

O terceiro artigo apresenta os resultados obtidos com o emprego do WB para detecção de IgG anti-*T. gondii* em amostras de pares mãe-bebê, com o seguinte título: Avaliação do método *Western Blot* para o diagnóstico de toxoplasmose congênita.

O quarto artigo descreve os resultados obtidos com o ELISA-rROP2 utilizado para a pesquisa de IgG anti-*T. gondii* em amostras de soro de gestantes com o seguinte título: Avaliação do método imunoenzimático com antígeno recombinante ROP2 (rELISA ROP2) para o diagnóstico de toxoplasmose adquirida na gestação. O artigo será submetido à *Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, ISSN 0074-0276.

Também foi apresentado um tema livre em forma de *poster* no II Simpósio Brasileiro de Toxoplasmose, realizado em São Paulo, no período de 31/01/2013 a 01/02/2013. Perfil dos casos de toxoplasmose congênita em um serviço de referência do Paraná, que recebeu menção honrosa e selecionado entre os 12 melhores trabalhos apresentados no referido evento científico.



The Brazilian Journal of
INFECTIOUS DISEASES

www.elsevier.com/locate/bjid



Original article

Congenital toxoplasmosis in a reference center of Paraná, Southern Brazil



Jaqueline Dario Capobiango^{a,*}, Regina Mitsuka Bregano^b, Itamar Teodorico Navarro^c,
Claudio Pereira Rezende Neto^d, Antônio Marcelo Barbante Casella^e,
Fabiana Maria Ruiz Lopes Mori^f, Sthefany Pagliari^g, Inácio Teruo Inoue^h,
Edna Maria Vissoci Reicheⁱ

^a Department of Clinical Medicine, Health Sciences Center, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, Brazil

^b Department of Pathological Sciences, Biological Sciences Center, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, Brazil

^c Department of Veterinary, Agricultural Sciences Center, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, Brazil

^d Medicine Course, Health Sciences Center, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, Brazil

^e Department of Surgery, Health Sciences Center, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, Brazil

^f Centro Universitário Filadélfia (UNIFIL), Londrina, PR, Brazil

^g Graduate Program in Veterinary Medicine, Agricultural Sciences Center, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, Brazil

^h Department of Gynecology and Obstetrics, Health Sciences Center, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, Brazil

ⁱ Department of Pathology, Clinical Analysis, and Toxicology, Health Sciences Center, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 July 2013

Accepted 7 November 2013

Available online 22 March 2014

Keywords:

Toxoplasma gondii

Congenital toxoplasmosis

Chorioretinitis

Diagnosis

ABSTRACT

This study describes the characteristics of 31 children with congenital toxoplasmosis children admitted to the University Hospital of Londrina, Southern Brazil, from 2000 to 2010. In total, 23 (85.2%) of the mothers received prenatal care but only four (13.0%) were treated for toxoplasmosis. Birth weight was <2500 g in 37.9% of the infants. During the first month of life, physical examination was normal in 34.5%, and for those with clinical signs and symptoms, the main manifestations were hepatomegaly and/or splenomegaly (62.1%), jaundice (13.8%), and microcephaly (6.9%). During ophthalmic examination, 74.2% of the children exhibited injuries, 58.1% chorioretinitis, 32.3% strabismus, 19.4% microphthalmia, and 16.2% vitreitis. Anti-*Toxoplasma gondii* IgM antibodies were detected in 48.3% of the children. Imaging brain evaluation was normal in 44.8%; brain calcifications, hydrocephaly, or both conditions were observed in 27.6%, 10.3%, and 17.2%, respectively, of the patients. Patients with cerebrospinal fluid protein ≥ 200 mg/dL presented more brain calcifications ($p=0.0325$). Other sequelae were visual impairment (55.2% of the cases), developmental delay (31.0%), motor deficit (13.8%), convulsion (27.5%), and attention deficit (10.3%). All patients were treated with sulfadiazine, pyrimethamine, and folic acid, and 55.2% of them exhibited adverse effects. The results demonstrate the significance of the early diagnosis and treatment of toxoplasmosis during pregnancy to reduce congenital toxoplasmosis and its consequences.

© 2014 Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

* Corresponding author at: Department of Clinical Medicine, State University of Londrina, University Hospital, Street Robert Koch, 60, 86038-440, Londrina, PR, Brazil.

E-mail address: jaquedc@uel.br (J.D. Capobiango).

1413-8670/\$ – see front matter © 2014 Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2013.11.009>

Introduction

Toxoplasmosis is a worldwide infection caused by the protozoan *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), an obligatory intracellular parasite.¹ In Central and South America, 50–80% of individuals are seropositive for IgG antibodies against *T. gondii*, indicating their previous exposure to this parasite.² The prevalence of this infection acquired during pregnancy ranges from 10.3% to 75.2% in different countries.^{3–7} In Brazil, the seroprevalence of anti-*T. gondii* IgG antibodies ranges from 49.2% to 91.6%,^{8–10} and the incidence of congenital toxoplasmosis varies from 0.3 to 5.0 per 1000 births.^{11–13}

The risk of fetal transmission depends on factors, such as the maternal immune response, the gestational age at infection, and the parasite virulence. The risk of congenital transmission varies from up to 2% at the periconceptional period, 10–25% in the first trimester of pregnancy, 30–45% in the second trimester, 60–65% in the third trimester, and up to 80% before childbirth.¹ However, the severity of congenital disease is high when transmission occurs in the beginning of the pregnancy and decreases with gestational age.^{1,2,4,7,8}

The diagnosis of toxoplasmosis acquired during pregnancy is based on laboratory tests because more than 90% of infected pregnant women are asymptomatic. When clinical manifestations are present, in general, they are nonspecific and include fever, headaches, myalgia, lymphadenopathy, and rash.¹⁴

The majority of children with congenital toxoplasmosis do not exhibit signs or symptoms at birth, presenting instead as subclinical infections; nevertheless, infected children are at risk of developing late sequelae, mainly ocular and neurological. For the symptomatic children, the severity of clinical manifestations is related to the trimester of pregnancy when transmission occurred, as follows: fetal death in the first trimester; retinochoroiditis, microcephaly, and mental retardation in the second trimester; and lymphadenopathy, hepatosplenomegaly, eye injuries, and brain calcifications in the third trimester.¹⁵ All of the children whose mothers presented acute toxoplasmosis during pregnancy, symptomatic or not, may have congenital toxoplasmosis. Children born with signals or symptoms of congenital disease are also at risk and should undergo serological investigation to detect specific anti-*T. gondii* antibodies.¹⁵

The purpose of this study was to describe the demographic, clinical, and laboratory characteristics of children with congenital toxoplasmosis that received treatment for congenital toxoplasmosis at one medical center in southern Brazil.

Materials and methods

Population and study design

The study included a retrospective cohort of 236 medical records of suspected congenital toxoplasmosis from the Outpatient Reference Centre for Pediatric Infectious Diseases, which is the reference service for congenital toxoplasmosis at the Outpatient Clinical Hospital, University of Londrina, Paraná State, Brazil. The study identified 31 cases of congenital toxoplasmosis that occurred from January 2000 to

December 2010. This study was approved by the Ethical Committee Involving Humans from the University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

Diagnostic criteria

Cases were defined as congenital toxoplasmosis when the infant exhibited one of the following features: anti-*T. gondii* IgM and/or IgA antibodies after 10 days of life, persistently elevated or increasing titers of IgG anti-*T. gondii* (after three-week intervals between the samples), seropositive for IgG after 12 months of life, retinochoroiditis and/or hydrocephaly/cerebral calcifications, and anti-*T. gondii* IgG seropositivity and response to specific treatment.¹⁶

During the period of the study, anti-*T. gondii* IgG antibodies were detected by indirect immunofluorescence (IFI) with *T. gondii* fixed on a glass slide.¹⁷ For the detection of anti-*T. gondii* IgM antibodies, the methods varied in the period evaluated, but included indirect enzyme immunoassay (ELISA), chemiluminescence, and IgM capture ELISA.

Statistical analysis

Data were recorded in a database, and the statistical analysis was performed using the Epi Info 3.4.3 and GraphPadPrism 5.00 software. Continuous variables were expressed in minimum and maximum values, mean, standard deviation, and median. Categorical variables were reported in absolute frequency (*n*) and percentage (%). Comparisons between groups of categorical variables were performed by Chi-square analysis or Fisher's exact test, when appropriate. An odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI) were also calculated. The results were considered significant when the *p*-value was less than 0.05 (5%).

Results

Description of the population

Of the 31 children evaluated, 20 (64.5%) were male and 11 (35.5%) were female. Their birth weights ranged from 1150 to 3800 g (median 2585 g), and 11 children (37.9%) had birth weights < 2500 g. Gestational age at delivery ranged from 26.2 to 41 weeks (median 36 weeks). Maternal age ranged from 14 to 42 years (median 26 years), and 23/31 (85.2%) pregnant women received prenatal care.

Clinical analysis of pregnant women

Among the 31 pregnant women evaluated, 16 (51.6%) did not have a record of any clinical symptom, eight (25.8%) were asymptomatic, and seven (22.5%) showed symptoms, such as fever (6.5%), adenomegaly (6.5%), flu-like symptoms (6.5%), and myalgia (3.2%). The toxoplasmosis infection was not diagnosed in 20/31 (64.5%) during pregnancy. Four women (12.9%) had not received prenatal care, and 16 (51.6%) had a serology requested. Eleven (35.5%) pregnant women were suspected cases of recent *T. gondii* infection, indicated by positive tests for IgM anti-*T. gondii*. However, this suspicion was not

Table 1 – Clinical manifestations presented by children with congenital toxoplasmosis attended at the Outpatient Clinic Hospital of the State University of Londrina, Londrina, Paraná, from January 2000 to December 2010.

Clinical manifestations	At birth (n = 20)	During the first month of life (n = 29)
	n (%)	n (%)
Asymptomatic	10 (50.0)	10 (34.5)
Symptomatic	10 (50.0)	19 (65.5)
Hepatosplenomegaly	8 (40.0)	13 (44.8)
Jaundice	0 (0.0)	4 (13.8)
Esplenomegaly	1 (5.0)	3 (10.3)
Hepatomegaly	0 (0.0)	2 (6.9)
Microcephaly	1 (5.0)	2 (6.9)
Fever	0 (0.0)	1 (3.4)
Macrocephaly	1 (5.0)	1 (3.4)
Adenomegaly	0 (0.0)	0 (0.0)

confirmed by other tests or serial samples, and they were not treated for toxoplasmosis. Only four (12.9%) pregnant women infected with *T. gondii* received specific treatment (two with sulfadiazine, pyrimethamine, and folinic acid, and two with spiramycin). The other 27 (87.0%) pregnant women received no toxoplasmosis treatment.

Clinical analysis of children

Twenty children (64.5%) were examined at birth, and nine (29.0%) were evaluated in the first month of life. Two children (6.5%) were referred without any record of signs or symptoms. One child (3.2%) was evaluated for the first time after nine months of life with chorioretinitis, cataract, and microphthalmia. One child (3.2%) was first evaluated at five years of age and presented with sequelae of congenital infection, such as scars of chorioretinitis, hyperactivity, attention deficit, and precocious puberty. The frequency of clinical manifestations of congenital toxoplasmosis at birth and during the first month of life is shown in Table 1.

The clinical classification of the disease presented by these 31 children were as follows: 29 (93.5%) were classified in first month of life; four (13.8%) were subclinical without

signs or symptoms during infancy; 24 (82.8%) exhibited neonatal disease with clinical manifestations, such as ocular lesion (chorioretinitis) and/or neurological impairment (hydrocephaly and/or calcification); and one (3.2%) was initially asymptomatic but presented fever and splenomegaly at four months of age without neurological or ophthalmic impairment. Among the children with subclinical infections, one (3.2%) had strabismus and convulsions at four years of age.

The ophthalmic manifestations observed in the children during the first month of life and after this period are described in Table 2.

Of all the patients, one (3.2%) child was exposed but uninfected with HIV-1, and one (3.2%) was co-infected with HIV-1. One child (3.2%) was co-infected with HIV-1 and cytomegalovirus (CMV), and three children (9.7%) were co-infected with CMV. In one infant with persistent hepatitis, a CMV infection was diagnosed by polymerase chain reaction; out of three infants with anti-CMV IgM antibody, one presented with giant cell hepatitis.

The frequency of sequelae was elevated among the children with congenital toxoplasmosis, as described in Table 3. Two (6.2%) children presented with endocrine dysfunctions,

Table 2 – Ophthalmologic manifestations observed during the first month and after the first month of life in children with congenital toxoplasmosis treated at the Outpatient Clinic Hospital of the State University of Londrina, Londrina, Paraná, from January 2000 to December 2010.

Ophthalmologic manifestations	During the first month of life (n = 29)	After the first month of life (n = 31)
	n (%)	n (%)
No manifestations ^a	9 (31.0)	8 (25.8)
Chorioretinitis	16 (55.2)	18 (58.1)
Strabismus ^{b,c}	1 (3.5)	10 (32.3)
Microphthalmia	2 (6.9)	6 (19.4)
Vitreitis	5 (17.2)	5 (16.2)
Uveitis	3 (10.3)	3 (9.7)
Cataract ^d	1 (3.5)	3 (9.7)
Nystagmus ^e	0 (0.0)	3 (9.7)

^a In one patient the lesion of chorioretinitis improved without leaving a scar;

^b One (3.5%) patient exhibited association of strabismus, cataract, and microphthalmia in the first month of life;

^c Seven (22.6%) patients with strabismus associated with chorioretinitis and three (9.7%) patients presented strabismus associated with cataract and/or microphthalmia after the first month of life;

^d One (3.5%) patient presented cataract associated with chorioretinitis in the first month of life.

^e Three (9.7%) patients presented nystagmus associated with chorioretinitis

Table 3 – Sequelae detected in children with congenital toxoplasmosis attended at Outpatient Clinic Hospital of the State University of Londrina, Londrina, Paraná, from January 2000 to December 2010.

Sequelae	Children (n = 29)	
	n	%
Not detectable ^a	9	31.1
Detectable	20	68.9
Visual	16	55.2
Delay of psychomotor development	9	31.0
Convulsion ^b	8	27.5
Motor dysfunction	4	13.8
Hyperactivity and/or deficit of attention	3	10.3
Precocious puberty	2	6.9
Hypothyroidism	1	3.4
Ventricular peritoneal shunt	1	3.4
Hearing damage ^c	3	50.0

^a Two children lost the follow-up.
^b Four children presented convulsion during the first month of life.
^c Detected in six children, all of them with hearing damage also presented concomitant neurological sequelae; 1/31 (3.4%) child co-infected with HIV-1 who died with 12 months of life due to herpetic encephalitis and severe sepsis.

one with central precocious puberty and the other with secondary hypothyroidism.

Laboratory and diagnostic data

Lumbar puncture for cerebrospinal fluid (CSF) collection was performed on 21 (67.7%) children. In the CSF, leukocytes ranged from 2 to 149 cells/mm³ (median 19 cells/mm³), erythrocytes ranged from 3 to 26,400 cells/mm³ (median 56/mm³), and the protein concentration ranged from 34 to 1594 mg/dL (median 104 mg/dL). Although six (28.6%) CSF samples presented elevated erythrocyte count (>1000/mm³), high CSF protein observed could not be explained only by the presence of these cells. Six patients (28.6%) presented CSF protein >180 mg/dL, but erythrocyte counts were >2500 cells/mm³ in only one patient (erythrocyte = 26,400 cells/mm³ and

protein = 879 mg/dL). Of the two patients (9.5%) with CSF protein >1 g/dL, the erythrocyte count was lower than 35 cells/mm³. In total, 19 patients (90.4%) who underwent lumbar puncture for CSF collection also performed imaging exams. Of these patients, 10 (52.6%) had brain calcifications, and two (10.5%) presented with brain calcifications associated with hydrocephaly. There was an association between the presence of ≥ 200 mg/dL protein in CSF and brain calcifications ($p = 0.0352$) (Table 4).

Brain computed tomography (CT) and ultrasonography (USG) results are presented in Table 5.

Fifteen of the 23 (65.2%) patients presented ophthalmic injuries and concomitant brain lesions, while 2/17 (11.8%) patients did not present ophthalmic injuries but showed CNS lesions ($p = 0.1897$, OR: 4.68, 95% CI: 0.73–29.85). There was no association between the presence of eye injuries and changes in brain imaging (hydrocephaly and calcifications). In 20 male patients, 15 (75%) showed eye injuries, while among 11 female patients, nine (81.8%) showed eye injuries ($p = 1.00$, OR: 0.66, 95% CI: 0.10–4.18).

Overall, 15 (48.3%) children showed detectable serum levels of anti-*T. gondii* IgM antibodies. Two patients were seronegative for anti-*T. gondii* IgM in the first sample and seropositive in the second sample. The serum levels of anti-*T. gondii* IgG were obtained during the first week and the first, 3rd, 6th, 9th and 12th months of life. During the first week of life, the values ranged from 1:16 to 1:128,000 [mode = 1:64 (20%) and 1:4000 (20%)]; in the 2nd sample, the levels ranged from 1:1024 to 1:128,000 [mode = 1:8000 (33.3%)]. In the 3rd serial blood sample, the values ranged from 1:16 to 1:64,000 [mode = 1:64,000 (27.3%)], and in the 4th serial blood sample, they ranged from 1:16 to 1:128,000 [mode = 1:32,000 (20%)]. In the 5th serial blood sample, the values ranged from 1:256 to 1:16,000 [mode = 1:4000 (40%)], and in the 6th serial sample, they ranged from 1:16 to 1:32,000 [mode = 1:16 (33.3%)]. During serological evolution of the patients, the rebound effect was detected in nine patients after discontinuing treatment and was detected by an increased level of serum anti-*T. gondii* IgG between 15 and 18 months of life, ranging from 1:16 to 1:128,000 [mode = 1:1024 (28.6%)].

Table 4 – Results of imaging brain exams from children with congenital toxoplasmosis, according to the cerebrospinal fluid protein levels, attended at Outpatient Clinic Hospital of the State University of Londrina, Londrina, Paraná, from January 2000 to December 2010.

CSF protein (mg/dL) ^a	Imaging brain exams		Odds ratio (95% CI)	p value ^b
	With calcification n/total of cases (%)	Without calcification n/total of cases (%)		
≥ 200	5/5 (100)	0/5 (0.0)	19.00	0.0325
<200	5/14 (35.7)	9/14 (64.3)	0.8729–413.6	
≥ 180	5/6 (83.3)	1/6 (16.7)	8.00	0.1409
<180	5/13 (38.5)	8/13 (61.5)	0.7107–90.05	
≥ 150	6/8 (75.0)	2/8 (25.0)	5.25	0.1698
<150	4/11 (36.4)	7/11 (63.6)	0.6979–39.50	

CSF, cerebrospinal fluid.
^a The frequencies of imaging brain exams were distributed according the different cut-off values of CSF protein levels; CI: confidence interval.
^b Fisher's exact test.

Table 5 – Results obtained in brain computed tomography and ultrasonography performed during the first month of life of children with congenital toxoplasmosis, attended at Outpatient Clinic Hospital of the State University of Londrina, Londrina, Paraná, from January 2000 to December 2010.

Results	Brain CT (n = 24) n (%)	Brain USG (n = 13) n (%)	Odds ratio (95% CI)	p value
No changes	11 (45.8)	6 (46.1)	1.182 (0.2950–4.735)	0.8134*
Hydrocephalus	0 (0.0)	6 (46.1)	0.02355 (0.00118–0.4688)	0.0007 [†]
Calcification	8 (33.3)	0 (0.0)	13.91 (0.7337–263.7)	0.0324 [†]
Hydrocephalus and calcification	5 (20.8)	0 (0.0)	7.615 (0.3877–149.6)	0.1398 [†]

CT, computed tomography; USG, ultrasonography; CI, confidence interval.

* Chi-square test, $p < 0.05$.

[†] Fisher's exact test, $p < 0.05$.

Treatment data

Children's age for initiation of toxoplasmosis treatment ranged from one day to nine months (median age, one month). Among the 29 infants who received specific therapy, 28 (90.3%) received sulfadiazine, pyrimethamine, and folinic acid, and one (3.2%) received spiramycin. Ten infants (34.5%) were treated with corticosteroids (prednisone) associated with specific therapy when their CSF protein was ≥ 1 g/dL and/or when they presented chorioretinitis with macular injury. Two children (6.5%) were not treated. One five-year-old child was referred to the reference service but the mother of the other child refused treatment, and the infant had no clinical follow-up. The infant who was treated with spiramycin for three months at another health service was switched to put on sulfadiazine, pyrimethamine, and folinic acid. Among the 29 (93.5%) treated infants, the treatment was temporarily modified in nine (31.0%): two children (6.9%) were treated with clindamycin, one (3.5%) with pyrimethamine and folinic acid, and six (20.7%) were treated with spiramycin.

Regarding the use of associated therapies, three children were treated with ganciclovir, two with zidovudine (AZT), and one with ganciclovir associated with AZT.

During the treatment for toxoplasmosis, 16 of the 29 patients (55.2%) presented adverse effects (Table 6). Six patients (37.5%) received a combination of therapies. Four patients received AZT, and three patients received ganciclovir. One infant treated with spiramycin was presented with frequent vomiting that improved with the reintroduction of sulfadiazine, pyrimethamine, and folinic acid. Hematological changes, including mild neutropenia and/or mild anemia, were reversed with an increased daily dose of folinic acid. When reverted to sulfadiazine, pyrimethamine, and folinic acid therapy, patients who temporarily received modified treatment because of adverse effects were treated with a higher daily dose of folinic acid.

Discussion

As clinical signs and symptoms in pregnancy are limiting factors for diagnosis, systematic serological screening tests during pregnancy are important yet controversial tools, particularly in regions where immunoreactivity before pregnancy is low and the risk for seroconversion during the pregnancy is

high. However, early diagnosis of *T. gondii* infection and appropriate anti-parasitic treatment are measures that can reduce transmission and the severity of fetal consequences, which justifies the screening of all pregnant women with serological tests that detect anti-*T. gondii* IgG and IgM antibodies.^{15,18}

Table 6 – Major adverse effects observed among children with congenital toxoplasmosis during the treatment with sulfadiazine, pyrimethamine, and folinic acid, attended at Outpatient Clinic Hospital of the State University of Londrina, Londrina, Paraná, from January 2000 to December 2010.

Adverse effects	Children (n = 29)	
	n	%
Mild neutropenia ^a (1001–1499 cells/mm ³)	4	13.8
Moderate neutropenia ^b (501–1000 cells/mm ³)	7	24.1
Severe neutropenia ^c (≤ 500 cells/mm ³)	2	6.9
Mild megaloblastic anemia (Hemoglobin: 10.1–11.9 g/dL)	1	3.5
Moderate megaloblastic anemia (Hemoglobin: 8.1–10.0 g/dL)	0	0.0
Severe megaloblastic anemia ^c (Hemoglobin: ≤ 8.0 g/dL)	1	3.5
Mild thrombocytopenia ^c (platelets 101,000–140,000/mm ³)	1	3.5
Moderate thrombocytopenia ^d (platelets 51,000–100,000/mm ³)	1	3.5
Severe thrombocytopenia (platelets $\leq 50,000$ /mm ³)	0	0.0
Mild hepatitis (AST and/or ALT \leq two times the reference value)	3	10.3
Moderate hepatitis (AST and/or ALT $>$ two times the reference value, and normal prothrombine time test)	1	3.5
Severe hepatitis (prothrombine time test $<$ 50.0% or INR $>$ 1.3)	0	0.0

AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; INR, international normalized ratio.

^a 1 patient received zidovudine (AZT) and ganciclovir concomitantly, 1 patient received ganciclovir concomitantly.

^b 1 patient received zidovudine concomitantly.

^c 1 patient that received zidovudine concomitantly presented severe neutropenia, severe megaloblastic anemia, and mild thrombocytopenia.

^d 1 patient received ganciclovir concomitantly.

A study from southern Brazil showed that 47.8% of pregnant women were seropositive for *T. gondii*, indicating previous exposure to the parasite, and 27.2% were not correctly diagnosed for *T. gondii* during pregnancy due to some factors, such as lack of prenatal care or because the serological tests were not performed.¹³ Despite the good prenatal care for pregnant women evaluated in the present study, serological investigation for toxoplasmosis was not performed in the majority of pregnant women.

The high frequency of prematurity and the low birth weight of infants observed in the present study are consistent with previous Brazilian studies that showed birth weight of infected children varying from 1290 to 3790 g.^{13,19-24}

Congenital toxoplasmosis may present different clinical forms, including subclinical infection, disease during the neonatal period, severe disease, mild disease in the first month of life, sequelae or reactivation of previously undiagnosed infection.¹⁵

In newborns and symptomatic infants, clinical presentation is divided into neurological and generalized forms. One neurological form, Sabin's tetrad, results from fetal infection at the beginning of the pregnancy and produces diffuse cerebral calcifications, chorioretinitis, convulsions, hydrocephaly or microcephaly. The generalized form results from infection during late pregnancy and is characterized by chorioretinitis, changes in CSF, hepatosplenomegaly, jaundice, lymphadenomegaly, thrombocytopenia, and anemia.^{15,18}

Brazilian studies carried out between 1990 and 2010 showed that early clinical manifestations were present in 56-100% of the children evaluated. Chorioretinitis was present in 67-80%, and brain calcifications were observed in 11-100% of the cases, many of them without prenatal treatment.^{13,19-25} Other studies reported the presence of hydrocephaly in 6.3-21% of children and microcephaly in 5.3% of the evaluated children.^{24,26}

Ocular injuries are not totally dependent on the gestational age of maternal infection; they may result in severe cases of chorioretinitis, even if the infection is acquired in the second half of the pregnancy. Furthermore, the risk of chorioretinitis - the most frequent sequela - persists for many years.²⁷ Of the ocular manifestations among Brazilian children with congenital toxoplasmosis, 29-100% presented chorioretinitis during the evolution of the disease, with 12-84% presenting bilateral injuries. Frequent symptoms include microphthalmia (9-25% of cases), strabismus (12-60%), nystagmus (3-47%), cataract (1-14%), vitreitis (3-50%), and visual damage (50-100%).^{13,19-28} Therefore, the results of the present study are in line with other Brazilian studies; however, it showed higher frequency of symptomatic children at birth and with ocular manifestations than other studies carried out with children from Europe and North America.²⁷ One possible explanation for this result may be the presence of more virulent strains of *T. gondii* in Brazil.²⁹

The risk factors associated with the development of chorioretinitis include female gender, brain calcifications, and delay of maternal treatment after seroconversion.^{18,30} In the present study, ocular injuries were neither associated with child gender nor with the presence of brain calcifications.

In agreement with other studies conducted in the pre-treatment period among Brazilian and American children,¹⁸

the present study showed that 55.2% of infants exhibited neurological injuries in imaging exams, with calcification in 44.8% of cases.

Asymptomatic infants at birth may progress with no infection sequelae, but may also develop visual damage, delayed neuropsychomotor development, hydrocephaly, convulsions or deafness months or years after birth.^{15,18,20} Sequelae were identified in 68.9% of patients evaluated in this study, and the most frequent sequelae were visual impairment and neurological damage.

One of the benefits of treatment is the decrease in ocular and neurological sequelae in *T. gondii*-infected children.^{18,31} Early treatment prevents ocular damage in children, as shown in two longitudinal studies where a new lesion during the follow-up was detected in 72% of untreated children compared to 31% of treated children.^{32,33}

Studies suggest that CT is more sensitive than USG for detecting brain calcifications.³⁴ However, a study comparing brain CT and USG in 33 children with congenital toxoplasmosis found 94% agreement between these imaging exams.³⁵

In the present study, CT was more sensitive for detecting brain calcifications, and USG was more sensitive for detecting hydrocephaly. However, specific treatment for toxoplasmosis provided during the period between USG and CT evaluations may have been responsible for missing hydrocephaly in CT that was shown with USG. The majority of USG evaluations were performed during the first month of life. The higher number of cases with brain calcifications observed by CT compared to those observed by USG may be explained by the natural evolution of the CNS lesions.

Congenital toxoplasmosis can be transmitted by pregnant women infected with HIV-1 who are those chronically infected with *T. gondii*;^{29,36} there are also reported cases of CMV and *T. gondii* co-infection.^{15,37} In the present study, the four infants co-infected with CMV showed clinical improvement when ganciclovir was added to the specific therapy for toxoplasmosis. This result demonstrates the importance of excluding other associated infections in patients with congenital toxoplasmosis.

Among the adverse effects of toxoplasmosis treatment, the most harmful is neutropenia caused by the myelotoxicity of sulfadiazine and pyrimethamine.¹⁵ In the present study, severe and moderate neutropenia were observed in a few cases, and the majority of them had been treated with other myelotoxic drugs associated with toxoplasmosis treatment, although all adverse effects were reversible with increased folic acid doses and temporary interruption of the treatment. Reversible neutropenia was also observed in a cohort of patients, evaluated from 1981 to 2004 in North America, with daily doses of pyrimethamine for two or six months.³¹

In the present study, anti-*T. gondii* IgM seroprevalence was lower than observed in previous studies that confirmed *T. gondii* infection by the detection of IgM antibodies in 50-75% of newborns.^{15,22,38} The presence of anti-*T. gondii* IgG antibodies in a newborn serum sample is not evidence of infection because maternal IgG antibodies are passively transmitted. The half-life of this immunoglobulin is 23 days and maternal antibodies may persist in the newborn circulation for one year, and about three months are necessary for a 10-fold reduction in titer. Therefore, anti-*T. gondii* IgG antibodies must be

assayed in serial samples from the child to confirm a congenital infection.^{15,26} However, in the present study due to wide variation (ranging from 1:16 to 1:128,000) serum anti-*T. gondii* IgG was of little help to diagnose congenital disease. Other serological methods are necessary to identify cases with false negative results for anti-*T. gondii* IgM.

Although the quality of prenatal care for suspected cases of toxoplasmosis in Londrina and northern Paraná in 2006 was not ascertained, a robust multi-professional team, with the support of governmental institutions, started discussions about this important public health problem, which resulted in the implementation of the Surveillance Program of Congenital Toxoplasmosis, first in the Basic Health Units of Londrina, north of Paraná, and afterwards in other locations in Paraná state.^{39,40} Its objective is to inform, standardize, and guide the management of medical professionals in caring for pregnant women with suspected or confirmed toxoplasmosis and children with congenital toxoplasmosis. To date, there has been excellent adherence to the proposed program in the primary health care units, decreasing the number of pregnant women and children unnecessarily referred to reference centers for diagnosis and treatment of toxoplasmosis by 63.9% and 42.6%, respectively, at the University of Londrina Hospital. Furthermore, the incorrect use of sulfadiazine was decreased by 67.4% after the program was implemented.^{39,40}

Altogether, the results of the present study demonstrated that from 2000 to 2010, the majority of pregnant women whose children presented congenital toxoplasmosis and had received care at the reference center for Pediatric Infectious Diseases of the Outpatient Clinical Hospital of State University of Londrina, were given no treatment for toxoplasmosis during the pregnancy because no diagnostic tests for toxoplasmosis had been requested. The majority of children were symptomatic in the first month of life, and chorioretinitis was the most frequent ocular damage. A high frequency of sequelae was also observed in this cohort of patients. These data reinforce the importance of diagnosis and treatment of toxoplasmosis acquired during pregnancy to reduce the occurrence of congenital toxoplasmosis and its complications in the child. Continuous assessment, consolidation, and expansion of the Surveillance Program of Congenital Toxoplasmosis^{39,40} can contribute to the improvement of health care for pregnant women with suspected toxoplasmosis and for the reduction of congenital toxoplasmosis in the Brazilian population.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- Montoya JG, Boothroyd JC, Kovacs JA. *Toxoplasma gondii*. In: Mandell, Douglas, Bennet, editors. Principles and practice of infectious diseases. 7th. ed. Churchill Livingstone: Philadelphia; 2010.
- Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. Clin Microbiol Infect. 2002;8:634-40.
- Aspöck H. Prevention of congenital toxoplasmosis in Austria. Arch Pediatr. 2003;10:16-7.
- Antoniou M, Tzouvali H, Sifakis S, et al. Incidence of toxoplasmosis in 5532 pregnant women in Crete, Greece: management of 185 cases at risk. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2004;117:138-43.
- Nash JQ, Chissel S, Jones J, Warburton F, Verlander NQ. Risk factors for toxoplasmosis in pregnant women in Kent, United Kingdom. Epidemiol Infect. 2005;133:475-83.
- Hung CC, Fan CK, Su KE, et al. Serological screening and toxoplasmosis exposure factors among pregnant women in the Democratic Republic of São Tomé and Príncipe. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2007;101:134-9.
- Liu Q, Wei F, Gao S, et al. *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women in China. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2009;103:162-6.
- Lopes-Mori FMR, Mitsuka-Breganó R, Gonçalves DD, et al. Factors associated with the seropositivity for anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in pregnant women of Londrina, Paraná, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104:378-82.
- Reiche EMV, Morimoto HK, Farias GN, et al. Prevalência da tripanossomíase americana, sífilis, toxoplasmose, rubéola, hepatite B, hepatite C e da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, avaliada por intermédio de testes sorológicos, em gestantes atendidas no período de 1996 a 1998 no Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná (Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil). Rev Soc Bras Med Trop. 2000;33:519-27.
- Figueiró-Filho EA, Lopes AHA, Senefonte FRA, et al. Toxoplasmose aguda: estudo da frequência, taxa de transmissão e relação entre os testes diagnósticos materno-fetais em gestantes em Estado da Região Centro-Oeste do Brasil. Rev Bras Ginecol Obstet. 2005;27:442-9.
- Neto EC, Anel E, Rubim R, et al. High prevalence of congenital toxoplasmosis in Brazil estimated in 3-year old prospective neonatal screening study. Int J Epidemiol. 2000;29:941-7.
- Segundo GRS, Silva DAO, Mineo JR, Ferreira MS. Congenital toxoplasmosis in Uberlândia, MG, Brazil. J Trop Pediatr. 2004;50:50-3.
- Lago EG, Carvalho RL, Jungblut R, Silva VB, Fiori RM. Screening for *Toxoplasma gondii* antibodies in 2,513 consecutive parturient women and evaluation of newborn infants at risk for congenital toxoplasmosis. Sci Med. 2009;19:27-34.
- Kravetz JD, Federman DG. Toxoplasmosis in pregnancy. Am J Med. 2005;118:212-6.
- Remington JS, Mcleod R, Thulliez P, Desmonts G. Toxoplasmosis. In: Remington JS, et al., editors. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. 6th ed. Philadelphia: Elsevier-Saunders; 2006.
- Lebech M, Joynson DHM, Seitz HM, et al. Classification system and case definitions of *Toxoplasma* infection in immunocompetent pregnant women and their congenitally infected offspring. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1996;15:799-805.
- Camargo ME. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. Rev Inst Med Trop. 1964;6:117-8.
- Mcleod R, Kieffer F, Sautter M, Hosten T, Pelloux H. Why prevent, diagnose and treat congenital toxoplasmosis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104:320-44.
- Melamed J, Domelles F, Eckert GU. Alterações tomográficas cerebrais em crianças com lesões oculares por toxoplasmose congênita. J Pediatr. 2001;77:475-80.
- Sáfadi MAP, Berezin EN, Farhat CK, Carvalho ES. Clinical presentation and follow up of children with congenital toxoplasmosis in Brazil. Braz J Infect Dis. 2003;7:325-33.
- Carvalho CG, Muzzi-Pinhata MM, Yamamoto AY, Souza CBS, Maciel LMZ. Incidence of congenital toxoplasmosis estimated by neonatal screening: relevance of diagnostic

- confirmation in asymptomatic newborn infants. *Epidemiol Infect.* 2005;133:485-549.
22. Lago EG, Neto EC, Melamed J, et al. Congenital toxoplasmosis: late pregnancy infections detected by neonatal screening and maternal serological testing at delivery. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2007;21:525-31.
 23. Melamed J. Contributions to the history of ocular toxoplasmosis in Southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104:358-63.
 24. Vasconcelos-Santos DV, Azevedo DOM, Campos WR, et al. Congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil: results of early ophthalmologic examination of a large cohort of neonates. *Ophthalmology.* 2009;116:2199-205.
 25. Bahia-Oliveira LMG, Wilken-Abreu AM, Azevedo-Silva J, Oréfice F. Toxoplasmosis in southeastern Brazil: an alarming situation of highly endemic acquired and congenital infection. *Int J Parasitol.* 2001;31:133-6.
 26. Rodrigues LMX, Castro AM, Gomes MBF, Amaral WN, Avelino MM. Congenital toxoplasmosis: evaluation of serological methods for detection of anti-*Toxoplasma gondii* IgM and IgA antibodies. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104:434-40.
 27. Gilbert R, Freeman K, Lago EG, et al. Ocular Sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008;2:1-7.
 28. Resende LM, Andrade GMQ, Azevedo MF, Perissimoto J, Vieira ABC. Congenital toxoplasmosis: auditory and language outcomes in early diagnosed and treated children. *Sci Med.* 2010;20:13-9.
 29. Dubey JP, Lago EG, Gennari SM, Su C, Jones JL. Toxoplasmosis in human and animals in Brazil: prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology.* 2012;139:1375-424.
 30. Kieffer F, Wallon M, Garcia P, Thulliez P, Peyron F, Franck J. Risk factors for retinochoroiditis during the first 2 years of life in infants with treated congenital toxoplasmosis. *Pediatr Infect Dis J.* 2008;27:27-32.
 31. Mcleod R, Boyer K, Karrison T, et al. Toxoplasmosis Study Group. Outcome of treatment for congenital toxoplasmosis, 1981-2004: the National Collaborative Chicago-Based, Congenital Toxoplasmosis Study. *Clin Infect Dis.* 2006;42:1383-94.
 32. Phan L, Kasza K, Jalbrzikowski J, et al. Longitudinal study of new eye lesions in treated congenital toxoplasmosis. *Ophthalmology.* 2008;115:553-9.
 33. Phan L, Kasza K, Jalbrzikowski J, et al. Longitudinal study of new eye lesions in children with Toxoplasmosis who were not treated during the first year of life. *Am J Ophthalmol.* 2008;146:375-84.
 34. Grant EG, Williams AL, Shellinger D, Slovis TL. Intracranial calcification in the infant and neonate: evaluation by sonography and CT. *Radiology.* 1985;157:63-8.
 35. Lago EG, Baldisserotto M, Hoefel-Filho JR, Santiago D, Jungblut R. Agreement between ultrasonography and computed tomography in detecting intracranial calcifications in congenital toxoplasmosis. *Clin Radiol.* 2007;62:1004-11.
 36. Delicio AM, Milanez H, Amaral E, et al. Mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus in a ten years period. *Reprod Health.* 2011;8:1-10.
 37. Zegher F, Sluiter JF, Stuurman PM, Van-Der-Voort E, Bos AP, Neijens HJ. Concomitant cytomegalovirus infection and congenital toxoplasmosis in a newborn. *Eur J Pediatr.* 1988;147:424-5.
 38. Lebech M, Andersen O, Christensen NC, et al. Feasibility of neonatal screening for toxoplasma infection in the absence of prenatal treatment. *Lancet.* 1999;353:1834-7.
 39. Mitsuka-Breganó R (dissertation) Programa de Vigilância em Saúde da Toxoplasmose Gestacional e Congênita: elaboração, implantação e avaliação no município de Londrina, Paraná. Londrina, Paraná, Brazil: Universidade Estadual de Londrina; 2009.
 40. Lopes-Mori FMR, Mitsuka-Breganó R, Capobianco JD, et al. Programs for control of congenital toxoplasmosis. *Rev Assoc Med Bras.* 2011;57:581-6.

Artigo 2**Toxoplasmose Adquirida na Gestação e Congênita: uma Abordagem Prática na Notificação da doença.**

Gestational and Congenital Toxoplasmosis: a Practical Approach to Disease Notification.

Autores:

Jaqueline Dario Capobiango

Departamento de Pediatria e Cirurgia Pediátrica, Universidade Estadual de Londrina-Paraná, Brasil.

Regina Mitsuka-Breganó

Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina-Paraná, Brasil.

Fabiana Maria Ruiz Lopes Mori

Centro Universitário Filadélfia, Londrina-Paraná, Brasil.

Italmar Teodorico Navarro

Departamento de Veterinária, Universidade Estadual de Londrina-Paraná, Brasil.

Josemari Sawczuk de Arruda Campos

Núcleo de Epidemiologia do Hospital Universitário de Londrina-Paraná, Brasil.

Linda Tsuiko Tatakihara

Núcleo de Epidemiologia do Hospital Universitário de Londrina-Paraná, Brasil.

Thalita Bento Talizin

Faculdade de Medicina, Universidade Estadual de Londrina-Paraná, Brasil.

Monica dos Santos

Faculdade de Medicina, Universidade Estadual de Londrina-Paraná, Brasil.

Tayná Rolim Galvão Pereira

Faculdade de Medicina, Universidade Estadual de Londrina-Paraná, Brasil.

Simone Garani Narciso

Serviço de Vigilância Epidemiológica da Secretaria Municipal de Saúde, Londrina-Paraná, Brasil.

Edna Maria Vissoci Reiche

Departamento de Patologia, Toxicologia e Análises Clínicas, Universidade Estadual de Londrina-Paraná, Brasil.

Notificação de toxoplasmose na gestante e congênita.

Artigo elaborado a partir da tese de Doutorado do Programa de Pós Graduação de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina-Paraná, Brasil, em 2014.

Endereço para correspondência:

Jaqueline Dario Capobiango. Departamento de Pediatria e Cirurgia Pediátrica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina-Paraná, Brasil. Hospital Universitário de Londrina, Avenida Robert Koch, nº. 60, Vila Operária, Londrina, Paraná, Brasil. CEP: 86038-350; FAX: (43) 3375-1000. E-mail: jaquedc@uel.br

E-mail dos demais autores:

rbregano@gmail.com; fabiuel@yahoo.com.br; italmar@uel.br;

josemarisac@gmail.com; linda@uel.br; thalitabt@yahoo.com.br;

monicauel@yahoo.com.br; tayrgc@yahoo.com.br;

simone.narciso@asms.londrina.pr.gov.br; reiche@sercomtel.com.br

Resumo

Objetivo: demonstrar a experiência de notificação de toxoplasmose durante a gestação e toxoplasmose congênita em uma Unidade Sentinela. **Métodos:** foi implantada uma rotina de notificação de todos os casos suspeitos de toxoplasmose na gestante e toxoplasmose congênita, em um serviço de referência de toxoplasmose no Estado do Paraná, no período de agosto de 2013 a agosto de 2014. Foi utilizada uma ficha de notificação específica integrando dados do Núcleo de Epidemiologia do Hospital Sentinela e da Vigilância Epidemiológica da Secretaria Municipal de Saúde.

Resultados: foram notificados 64 casos suspeitos de toxoplasmose adquirida na gestação; destes, 63 (98,4%) realizaram atendimento pré-natal e 41 (64,1%) foram assintomáticos. O diagnóstico foi realizado no 1º trimestre de gestação em 27 (42,2%) gestantes e 50 (78,1%) receberam tratamento durante a gestação. Quarenta e seis crianças estão em acompanhamento ambulatorial e destas, 7 (15,2%) tiveram o diagnóstico de toxoplasmose congênita confirmado. A ficha de notificação foi útil para a obtenção dos dados epidemiológicos, diagnósticos e de seguimento dos casos suspeitos.

Conclusão: a rotina de notificação implantada em uma Unidade Sentinela pode servir de modelo para a ampliação da notificação da toxoplasmose durante a gestação e congênita para os outros serviços de saúde.

Palavras-chave: Toxoplasmose, Toxoplasma, Toxoplasmose congênita, Vigilância Epidemiológica, Notificação de Doenças.

Abstract

Objective: to demonstrate the experience of the notification of toxoplasmosis during pregnancy and congenital toxoplasmosis in a Sentinel Unit. **Methods:** a routine reporting of all suspected cases of toxoplasmosis in pregnant women and congenital

toxoplasmosis in a reference center of toxoplasmosis in Paraná State, from August 2013 to August 2014. It was used a specific notification form with integration of the Epidemiology Service of the Sentinel Hospital with the Epidemiological Surveillance Service of Municipal Health instruments. **Results:** 64 suspected cases of toxoplasmosis acquired during pregnancy were reported; 63 (98.4%) received pre-natal care and 41 (64.1%) were asymptomatics. The diagnosis was made in the 1st trimester of pregnancy in 27 (42.2%) pregnant women and 50 (78.1%) received treatment during pregnancy. Forty six children are in clinical monitoring and of them, 7 (15%) were asymptomatic. The notification form was helpful for obtaining the data of epidemiology, diagnosis and follow-up of suspected cases. **Conclusion:** the routine notification introduced at the Sentinel Unit can be a model for the expansion of notification of toxoplasmosis during pregnancy and congenital toxoplasmosis for other health services.

Keywords: Toxoplasmosis; *Toxoplasma*; Toxoplasmosis, Congenital; Epidemiologic Surveillance; Disease Notification.

Introdução

A toxoplasmose é uma zoonose cosmopolita causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) e infectante para diversas espécies de aves e mamíferos, incluindo o homem. O gato é o hospedeiro definitivo no qual o protozoário realiza seu ciclo sexuado.^{1,2} A toxoplasmose é considerada uma das cinco infecções parasitárias negligenciadas, um grupo de doenças parasitárias que tem sido alvo das ações em saúde em outros países, graças a sua elevada incidência, mesmo que de forma assintomática.³

A prevalência da soropositividade para toxoplasmose em gestantes na região sul do Brasil varia entre 31,0 e 59,9%.^{4, 5, 6}

Em Londrina, norte do Estado do Paraná, a terceira cidade do sul do Brasil, foi relatado que 49,2% das gestantes apresentam sororreatividade para anticorpos da classe IgG contra o *T. gondii*.⁷ Em estudo realizado no interior do Estado de São Paulo, 64,4% das gestantes foram expostas ao *T. gondii* e apresentavam anticorpos IgG contra o parasita.⁸ Portanto, ainda é elevada a frequência de gestantes susceptíveis a esta infecção no Brasil.

A infecção congênita ou transplacentária do *T. gondii* ocorre nos casos de mulheres que apresentam primoinfecção durante a gestação sendo menos provável durante a reativação da infecção, como pode ocorrer nos pacientes imunossuprimidos.²

O risco de transmissão vertical é menor no primeiro trimestre da gestação (10 a 25%) em relação ao segundo (30 a 45%) e terceiro trimestres (60 a 65%) e atinge até 80% se a infecção ocorrer próximo ao parto¹. Há relatos de que 70% dos recém-nascidos infectados durante a gestação não apresentam sintomas ao nascimento.⁹ Todavia, é documentado que a infecção fetal durante o primeiro trimestre gera consequências mais graves como o abortamento e malformações fetais.¹⁰ Infecções durante o segundo trimestre da gestação podem provocar tanto abortamentos como nascimentos prematuros, a criança pode nascer assintomático ou sintomática com comprometimento ganglionar generalizado, hepatoesplenomegalia, miocardite, anemia, trombocitopenia, coriorretinite, calcificações cerebrais, microcefalia e hidrocefalia.^{1,10} Já no terceiro trimestre, o recém-nascido aparentemente saudável pode apresentar evidências de doença congênita alguns dias ou meses após o nascimento. Portanto, a toxoplasmose congênita é uma doença que pode se apresentar com formas graves ou com sequelas graves tardias, mesmo em crianças assintomáticas ao nascimento. O diagnóstico precoce da infecção permite o tratamento antiparasitário adequado da gestante que pode reduzir a gravidade das sequelas da toxoplasmose no feto.^{11, 12}

Um estudo retrospectivo no período de 2000 a 2010 registrou 31 casos de toxoplasmose congênita atendidos no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina (HU/UEL), um serviço de referência para a toxoplasmose. Os resultados demonstraram que a maioria das gestantes (82,5%) realizaram atendimento pré-natal; no entanto somente 4 (13,0%) receberam tratamento para toxoplasmose, o que resultou em elevada frequência de crianças com toxoplasmose congênita sintomáticas e com sequelas.¹³ Desde a implantação do Programa de Vigilância em Saúde da Toxoplasmose Gestacional e Congênita na atenção primária do município de Londrina, em 2006, com a investigação do perfil sorológico para toxoplasmose durante o atendimento pré-natal, houve uma redução de encaminhamentos desnecessários de gestantes e crianças ao HU/UEL.¹⁴

Porém, faz-se necessária a caracterização epidemiológica da toxoplasmose na gestação e congênita, por meio da notificação de todos os casos suspeitos, o que fornecerá subsídios para a implantação de medidas de prevenção primária e controle dessa infecção. Diante deste cenário, as portarias nº 2.472/2010 e nº 104/2011 do Ministério da Saúde tornaram a notificação de toxoplasmose gestacional e congênita obrigatória em Unidades Sentinelas.^{15,16}

O presente trabalho tem como objetivo apresentar a experiência adquirida por uma Unidade Sentinela com a utilização de uma ficha epidemiológica e de um fluxo de notificação para os casos suspeitos de toxoplasmose adquirida durante a gestação e toxoplasmose congênita. Até a presente data não há publicações nacionais sobre a notificação de toxoplasmose na gestação e congênita, o que justifica e torna relevante o presente estudo.

Metodologia

Trata-se de um estudo descritivo que registra as notificações de toxoplasmose adquirida na gestação e congênita em um instrumento de coleta de dados, no período de agosto de 2013 a agosto de 2014, seguindo uma hierarquia de fluxo de notificação no HU/UEL, um serviço de referência do Estado do Paraná. O HU/UEL é um hospital público terciário com 290 leitos, localizado em Londrina, norte do Estado do Paraná, Brasil. O HU/UEL é considerado um Hospital Sentinela para a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e sua maternidade é considerada referência para atendimentos das gestantes de risco. O atendimento ambulatorial é realizado no Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário (AEHU) para pacientes referenciados da atenção primária do município de Londrina e região e conta com diversos ambulatórios de especialidades, incluindo o Ambulatório de Alto Risco de Obstetrícia e Ambulatório de Infecções Congênitas.

O HU/UEL possui o Núcleo Hospitalar de Epidemiologia (NHE) responsável por identificação de casos de notificação compulsória de acordo com a Portaria nº 104/2011 do Ministério da Saúde e é uma Unidade Sentinela para notificação.¹⁶ O NHE é um campo de estágio extracurricular não obrigatório e de monitoria acadêmica para graduandos dos cursos de Enfermagem e Medicina onde o estagiário auxilia no rastreamento de todos os resultados das reações sorológicas realizadas no HU/UEL e no AEHU de interesse para a Vigilância Epidemiológica, por meio do sistema informatizado do Laboratório de Análises Clínicas (LAC) do HU/UEL. Em agosto de 2013, iniciou-se o rastreamento específico para toxoplasmose adquirida na gestação, no qual a cada dois dias faz-se a busca dos resultados com reatividade para imunoglobulina M (IgM) anti-*T. gondii* em gestantes. Para cada gestante com reatividade para anticorpos IgM anti- *T. gondii* é aberta uma ficha específica de investigação (Figura 1) e

uma ficha do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAM) com dados de identificação da gestante.

Na rede de Unidades Básicas de Saúde (UBSs) do município de Londrina, a primeira amostra para investigação do perfil sorológico para toxoplasmose é coletada no primeiro trimestre de gestação, com repetição trimestral dos exames nas gestantes susceptíveis, ou seja, não expostas ao parasita. Nesta fase do atendimento, as amostras são processadas no Laboratório Central do Município (CENTROLAB) e o resultado do teste de avidéz é comunicado à UBS dentro de três dias úteis. As gestantes com reatividade para IgM anti-*T gondii* iniciam tratamento específico com espiramicina e são encaminhadas ao AEHU para definição diagnóstica e acompanhamento do tratamento, seguindo o protocolo definido no Programa de Vigilância em Saúde da Toxoplasmose Gestacional e Congênita.¹⁷ Toda amostra de gestante recebida pela primeira vez no HU/UEL e AEHU, que apresenta reatividade para IgG e IgM anti-*T. gondii* é avaliada pelo teste de avidéz da IgG pelo Setor de Imunologia Clínica do LAC do HU/UEL.

A ficha de notificação contem os dados da mãe e da criança e os campos foram criados seguindo as recomendações de vigilância do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC)¹⁸ para responder às seguintes perguntas durante a gestação: Qual o provável mecanismo de transmissão? Quais os sinais e sintomas mais frequentes? Qual a idade gestacional de aquisição da infecção? Qual o perfil sorológico? Qual o tratamento realizado e efeitos colaterais? As perguntas realizadas para o preenchimento dos campos relacionadas à criança são: Quais as manifestações clínicas mais frequentes no lactente? Qual a frequência de lesão ocular? Qual a frequência de lesão neurológica? Qual o perfil sorológico? Qual o tratamento realizado e efeitos colaterais? Quais as sequelas mais frequentes nas crianças acometidas? Qual a taxa de transmissão vertical?

Os médicos do Ambulatório de Alto Risco de Obstetrícia do AEHU realizam o preenchimento da ficha da gestante com suspeita de toxoplasmose aguda. O prontuário é carimbado para identificar que o caso já foi notificado e a ficha é encaminhada ao NHE para acompanhamento do caso. Estes dados são conferidos pelos estagiários por meio do sistema informatizado do HU/UEL. Dados incompletos são preenchidos após consulta aos prontuários médicos das pacientes acompanhadas no AEHU e por entrevista, por telefone com as pacientes (Figura 2).

A definição de infecção de todos os casos é realizada após o término da gestação, em reuniões mensais com médico infectologista. Utilizam-se os critérios de Lebech (1996)¹⁹ em relação ao perfil de anticorpos das classes IgG e IgM anti-*T. gondii*, assim como os do Ministério da Saúde, em relação ao teste de avidéz da IgG e reação em cadeia de polimerase (PCR).²⁰

São criadas agendas anuais específicas e um banco de dados no Programa Excel utilizando como modelo a rotina de trabalho do NHE. Para a criação da ficha de notificação, utiliza-se o programa de desenho vetorial CorelDRAW x4. Com o sistema de agendamento e com base na data provável do parto (DPP) organizam-se as datas para revisão dos casos, logo após o nascimento da criança. A equipe do NHE registra, semanalmente, as informações coletadas sobre todos os casos investigados em um banco de dados digital. O NHE encaminha as fichas padronizadas do SINAM de todas as gestantes suspeitas à Vigilância Epidemiológica e arquiva a ficha específica de toxoplasmose para acompanhamento dos casos.

Toda criança com suspeita de toxoplasmose congênita da rede municipal de saúde é encaminhada ao Ambulatório de Infecções Congênitas do AEHU para definição diagnóstica e acompanhamento do tratamento.

O verso da ficha específica de toxoplasmose direcionada à criança é preenchido após o nascimento da mesma, em três momentos: 1) ao nascimento, na Maternidade do HU/UEL quando o pediatra preenche a ficha de notificação e encaminha a mesma para o profissional do NHE, que completa o preenchimento das informações do prontuário do recém-nascido; 2) com um ano de vida, quando o profissional do NHE preenche os dados com base no prontuário de acompanhamento ambulatorial pelo Ambulatório de Infecções Congênitas e 3) no segundo ano de vida, quando o caso é concluído pelo NHE após análise por médico infectologista. Para as crianças provenientes de outras maternidades, a ficha de notificação específica é preenchida pelo médico durante a primeira consulta de atendimento no Ambulatório de Infecções Congênitas e, após este procedimento, a ficha é encaminhada ao NHE. Após 24 meses de vida, a criança com toxoplasmose congênita confirmada tem agendamento anual no Ambulatório de Infecções Congênitas e agendamento anual de notificação do NHE, para detectar possíveis sequelas tardias (Figura 3).

Para a troca de informações entre o NHE e a Vigilância Epidemiológica utiliza-se a rotina semanal de mensagens por correio eletrônico. A busca ativa integrada entre o NHE e a Vigilância Epidemiológica permite a convocação dos pacientes que não comparecem ao serviço de referência. A Vigilância Epidemiológica notifica, semanalmente, os casos suspeitos ao Ministério da Saúde pelo SINAM.

No presente estudo, foram analisadas as variáveis demográficas, epidemiológicas, clínicas, laboratoriais e de defecho dos casos notificados. As variáveis quantitativas foram expressas em mediana e variação interquartil (IQR 25%-75%) e as variáveis qualitativas foram expressas em número absoluto (n) e porcentagem (%). Foi realizada análise descritiva por meio das distribuições de frequências e proporções. As associações entre as variáveis qualitativas foram verificadas mediante o teste do qui-

quadrado ou teste exato de Fisher, quando apropriado, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Utilizou-se o programa *GraphPad Prism 5* (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) para os cálculos estatísticos.

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, com Parecer nº 047/05. Foi garantido o sigilo das informações individuais.

Resultados

De agosto de 2013 a agosto de 2014 foram notificados 64 casos suspeitos de toxoplasmose adquirida na gestação (Tabela 1); destes, 32 (50,0%) eram de Londrina e 32 (50,0%) eram provenientes de outros municípios da região. A idade das gestantes variou de 15 a 37 anos, com mediana de 24 anos e IQR 25% e 75% de 18,3 e 24 anos. Desta, 63 (98,4%) realizaram atendimento pré-natal e 33 (51,6%) tinham, no mínimo, oito anos de escolaridade. A maioria das gestantes não apresentou sintomas de toxoplasmose e, entre as manifestações clínicas, a mais relatada foi cefaleia (23,4%). Porém, ao excluir este sintoma inespecífico, 49 (76,5%) gestantes foram assintomáticas. Entre os fatores de risco associados à aquisição de toxoplasmose, os hábitos de comer vegetais crus e beber água não fervida e não filtrada foram os mais frequentes (46,0% e 49,0%, respectivamente). O diagnóstico foi realizado no 1º trimestre de gestação em 42,2% das gestantes.

Cinquenta (78,1%) gestantes receberam tratamento durante a gestação e em uma (1,6%) o tratamento foi suspenso pela presença de exantema. Os efeitos colaterais do tratamento relatados por 50 (78,1%) gestantes foram resultantes do uso de sulfadiazina, pirimetamina e ácido fólico; no entanto, foram reversíveis em todas. Destas, oito (16,0%) gestantes apresentaram sintomas gastrointestinais (náuseas, vômitos, diarreia) e

duas (4%) relataram exantema; nenhuma gestante apresentou aplasia de medula. Não houve diferença significativa entre a presença de efeitos colaterais apresentados pelas gestantes tratadas com sulfadiazina, pirimetamina e ácido fólico (12/41) e as tratadas com espiramicina (0/10) ($p = 0,0920$).

Entre as 14 (21,8%) gestantes notificadas que não foram tratadas, uma (7,1%) não realizou pré-natal, 6 (42,9%) não tinham indicação de tratamento pois o diagnóstico era improvável e 7 (50,0%) perderam a oportunidade de tratamento; destas duas gestantes com IgG anti- *T. gondii* de avidéz fraca ou intermediária não realizaram o tratamento, pois apresentaram soroconversão ao final da gestação.

Portanto, entre as 29 gestantes com IgG anti-*T. gondii* com avidéz fraca ou intermediária 27 (93,1%) foram tratadas e 2 (6,9%) não receberam o tratamento. Entre as 27 gestantes com IgG anti-*T. gondii* com avidéz forte, 17 (63,0%) foram tratadas e 10 (37,0%) não receberam o tratamento. Houve diferença significativa entre as gestantes que tiveram avidéz de IgG fraca ou intermediária e realizaram tratamento em relação às gestantes com forte avidéz de IgG que foram tratadas ($p = 0,0086$).

Até a presente data, 46 crianças, sendo 27 (58,7%) do sexo masculino, estão em acompanhamento ambulatorial. A idade gestacional mediana foi de 39 semanas (IRQ 25%-75% de 38 e 39 semanas) e a mediana de peso ao nascimento foi de 3.118 g (IRQ 25%-75% de 2.686,2 e 3.117,5 g). Em 7 (15,2%) crianças, o diagnóstico de toxoplasmose congênita já foi confirmado e em 8 (12,5%) foi descartado, as demais crianças continuam em seguimento. Entre as crianças infectadas, 4 (57,1%) eram sintomáticas ao nascimento, 4 (57,1%) crianças apresentaram coriorretinite e 3 (42,9%) calcificação cerebral.

Discussão

O presente estudo demonstra uma significativa mudança no cenário da toxoplasmose adquirida na gestação e congênita, registrados em Londrina e região e atendidos no HU/UEL, comparado com os resultados descritos em estudo prévio.¹³ Enquanto que no período de 2000 a 2010, a maioria das gestantes não era avaliada sorologicamente para toxoplasmose, a implantação da ficha de notificação dos casos de toxoplasmose adquirida na gestação e congênita no período de agosto de 2013 a agosto de 2014 demonstrou melhoria no diagnóstico e tratamento da doença na gestante, como resultado da implantação do Programa de Vigilância em Saúde da Toxoplasmose Gestacional e Congênita.¹⁴

Durante o processo de implantação da vigilância epidemiológica foram identificados alguns fatores dificultadores. O primeiro foi na elaboração da ficha de notificação específica para toxoplasmose, conforme o SINAM. O SINAM foi desenvolvido pelo Ministério da Saúde com o objetivo de padronizar os conceitos de definição de caso e transmitir os dados do município para a unidade federativa e Ministério da Saúde, na rotina da Vigilância Epidemiológica do Sistema Único de Saúde (SUS).²¹ Portanto, é um instrumento que auxilia no planejamento de ações de saúde para se definir as prioridades em saúde e avaliar o impacto das medidas adotadas.

Apesar do instrumento de notificação proposto neste estudo possuir um estilo semelhante às demais fichas de notificação do SINAN, a elegibilidade da maioria das questões foi determinada pela experiência dos pesquisadores envolvidos no processo. Isso ocorreu devido à ausência de um modelo brasileiro de notificação, de acompanhamento das notificações e de compilação de dados. O atual modelo de ficha de notificação foi testado e modificado durante vários meses e a sua última versão mostrou-se mais aceita por ser de mais fácil preenchimento e permitir melhor definição

do caso. Porém, ainda existe um certo grau de dificuldade para o preenchimento da ficha epidemiológica, devido a complexidade de informações inerentes à toxoplasmose.

Ressaltam-se ainda as dificuldades para a realização do diagnóstico da toxoplasmose. Em nosso estudo, a maioria das gestantes negou qualquer sintoma. Estima-se que 90% das mulheres que adquirem a toxoplasmose durante a gestação são assintomáticas^{22, 23}, o que reforça a importância da realização de testes sorológicos para confirmação da presença da infecção no período pré-natal. Porém, há dificuldade de interpretação dos resultados obtidos nos diferentes métodos sorológicos e, muitas vezes, o diagnóstico é inconclusivo ao final da gestação, o que torna necessário o fechamento do caso somente após a definição do diagnóstico na criança. Portanto, diferente das demais doenças de notificação obrigatória, o fechamento do caso como confirmado ou descartado nem sempre pode ser aplicado na gestante com suspeita de toxoplasmose. Os critérios de Lebech¹⁹ não contemplam os métodos de PCR e de avidéz da IgG anti-*T.gondii*; por outro lado, os critérios utilizados pelo Ministério da Saúde²⁰ não levam em consideração as várias possibilidades de evolução dos títulos de IgG anti-*T. gondii*.

Há ainda algumas dificuldades durante o atendimento pré-natal, como má adesão ou início tardio do acompanhamento no pré-natal que dificultam a interpretação dos resultados da avaliação sorológica para toxoplasmose quando realizada somente após o primeiro trimestre de gestação. Outro problema encontrado foi o preenchimento inadequado do cartão de pré-natal, com anotações incompletas dos exames sorológicos para toxoplasmose (ausência de dados, tais como métodos laboratoriais utilizados para pesquisa de IgG e IgM anti-*T. gondii*, título de anticorpos e data da realização do exame) ou até o preenchimento com letra ilegível.

É importante o seguimento ambulatorial a longo prazo das crianças com toxoplasmose congênita pela possibilidade de desenvolvimento de dano visual, atraso

de desenvolvimento neuropsicomotor, hidrocefalia, convulsões ou surdez, meses ou anos após o nascimento, mesmo quando a criança é assintomática no momento do nascimento.^{12, 24, 25} A coriorretinite é a manifestação mais frequente da toxoplasmose congênita e ocorre em até 80,0% das crianças infectadas.^{26,27}

Como a toxoplasmose congênita pode causar várias sequelas tardias, nos deparamos com a dificuldade de definição do tempo de seguimento da criança com diagnóstico confirmado. Portanto, priorizamos na ficha da criança a idade para o fechamento do diagnóstico, com seguimento até os dois anos de idade para todos os casos suspeitos de toxoplasmose. Os dados clínicos e de imagem obtidos nos primeiros dois anos de vida definem o surgimento de lesões precoces para os casos confirmados. Porém, deixamos um campo aberto ao final da ficha, para anotação de sequelas mais tardias para os casos confirmados, incluindo, principalmente, as lesões oftalmológicas e neurológicas, com agendamento de atendimento ambulatorial anual, até os 10 anos de idade.

Na maioria dos países, a toxoplasmose congênita não é uma doença de notificação obrigatória. Em 12 países da Europa, a toxoplasmose sintomática (congênita ou não) é de notificação obrigatória e, somente em três países (França, Alemanha e Itália) há uma vigilância da toxoplasmose congênita. Na Dinamarca, esta vigilância foi interrompida em 2007. A maior parte dos casos é notificada pelos laboratórios; porém, vários profissionais de saúde, médicos e epidemiologistas podem notificar os casos. O grupo de estudos europeu de prevenção da toxoplasmose acredita que o sistema de vigilância e as medidas públicas de prevenção têm que ser melhoradas, pois somente com a manutenção da vigilância podem-se obter dados para avaliar a frequência e gravidade dos casos, além de definir a tendência epidemiológica da doença no decorrer do tempo.²⁸

A aprovação da Portaria nº 2472 do Ministério da Saúde de 2010, Art. 6º, que inclui a toxoplasmose aguda gestacional e congênita na lista de notificação compulsória em Unidades Sentinelas foi, sem dúvida, um grande avanço.¹⁵ O problema é que ainda não há uma rotina de busca ativa na região norte do Estado do Paraná que garanta o encaminhamento para o AEHU de todas as gestantes suspeitas atendidas nas UBS, que são as principais responsáveis pelo encaminhamento das mesmas. Além disso, o instrumento inicial de notificação estabelecido para a Vigilância Epidemiológica foi a “Ficha Individual de Notificação” do Ministério da Saúde, que é utilizada para agravos que não têm ficha específica, é adequada para notificação de surto, mas insuficiente para atender as necessidades técnicas para o acompanhamento dos casos de toxoplasmose.

Provavelmente, a falta de um modelo de ficha de notificação do Ministério da Saúde e de um Programa de Vigilância Nacional justifique a não inclusão da toxoplasmose aguda gestacional e congênita entre as doenças de notificação compulsória em Unidades Sentinelas nas últimas Portarias nº 1.984 e nº 1.271, do Ministério da Saúde, no ano de 2014.^{29,30}

Entre os fatores facilitadores do estudo é possível citar a experiência dos pesquisadores na área da epidemiologia na rotina do NHE e da Vigilância Epidemiológica, além da disponibilidade de maior número de recursos humanos no NHE, com a presença de estudantes de medicina que iniciam a prática extensionista, atuando diretamente com a comunidade.

Com a rotina de notificação dos casos suspeitos de toxoplasmose na gestação, pode ocorrer uma maior busca ativa dos casos suspeitos atendidos na rede municipal de saúde, o que facilitará o encaminhamento da gestante e da criança suspeitas aos serviços de referência para a confirmação diagnóstica e acompanhamento de tratamento. Este

resultado positivo pode explicar, em parte, as diferenças nas características epidemiológicas e clínicas de gestantes e seus recém-nascidos registrados em estudo prévio nesta mesma população.¹³

A notificação do caso para a vigilância, além de obrigatória, é válida para obter dados de incidência da toxoplasmose adquirida na gestação e congênita, obter a taxa de transmissão congênita, avaliar a gravidade da doença no binômio mãe-criança e analisar a eficácia do tratamento materno na prevenção da transmissão congênita e suas sequelas na criança.

A possibilidade de utilização de uma ficha específica de notificação pode trazer o conhecimento das dificuldades locais e facilitar a discussão de soluções para implantação de um fluxo de encaminhamento e acompanhamento dos casos, nos diversos serviços do país. Esta caracterização é crucial para o êxito da adesão e sucesso na implantação da vigilância da toxoplasmose na gestação e congênita em outras localidades do país.

No futuro, a ampliação da implantação de uma rede de assistência, referência e notificação da toxoplasmose durante a gestação e congênita, nas diversas Regionais de Saúde do Brasil, permitirá o acompanhamento sistematizado de todos os pacientes de vários municípios brasileiros, minimizando as falhas neste atendimento, com o diagnóstico e tratamento mais precoces e redução das sequelas na criança.

Conclui-se que a ficha de notificação da toxoplasmose na gestação e congênita pode ser utilizada inicialmente pelos locais de referência de notificação e posteriormente pelos diversos serviços de saúde, para trazer as informações epidemiológicas regionais, que possibilitarão a ampliação do conhecimento da doença no país.

Contribuição dos autores

Capobiango JD participou de todas as etapas da pesquisa, na concepção, metodologia, pesquisa, análise e interpretação dos dados e redação do artigo.

Mitsuka Breganó R, Lopes Mori FMR e Navarro IT participaram no delineamento do estudo, na implantação do método e na redação do artigo.

Campos JSA e Tatakihara LT, Narciso SG participaram na coleta e interpretação de dados e implantação do método.

Talizin TB, Santos M, Pereira TRG participaram da coleta e tabulação dos dados, implantação do método, pesquisa bibliográfica, redação do artigo.

Edna Maria Vissoci Reiche participou na orientação do trabalho e revisão crítica.

Todos os autores aprovaram a versão final do manuscrito e são responsáveis por todos os aspectos do trabalho, incluindo a garantia de sua precisão e integridade.

Referências

1. Montoya JG, Boothroyd JC, Kovacs JA. *Toxoplasma gondii*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and Practice of Infectious Diseases, 7th. ed. Philadelphia: Churchill Livingstone- Elsevier; 2010. p 3495-3526.
2. Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. Clin Microbiol Infect. 2002; 8: 634–640.
3. CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Neglected Parasitic Infections in the United States: Toxoplasmosis [Internet]. [citado 2014 mar 10]. 2 p. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/index.html>.

4. Varella IS, Wagner MB, Darella AC, Nunes LM, Müller RW. Prevalência de soropositividade para toxoplasmose em gestantes. *J Pediatr (Rio J)*. 2003; 79(1): 69-74.
5. Peloso MPC, Falavigna DLM, Araújo SM, Guilherme ALF. Monitoramento de gestantes com toxoplasmose em serviços públicos de saúde. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005; 38(6):532-533.
6. Detanico L, Basso RMC. Toxoplasmose: perfil sorológico de mulheres em idade fértil e gestantes. *RBAC*. 2006; 38(1):15-18.
7. Lopes-Mori FMR, Mitsuka-Breganó R, Gonçalves DD, Freire RL, Karigyo CJT, Wedy GF, et al. Factors associated with the seropositivity for anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in pregnant women of Londrina, Paraná, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 104 (2):378-382.
8. Mattos CCB, Spegiorin LCJF, Meira CS, Silva TC, Ferreira AIC, Nakashima F, et al. Anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in pregnant women and their newborn infants in the region of São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil. *Sao Paulo Med J*. 2011; 129(4):261-266.
9. Petersen E, Pollack A, Reiter-Owona I. Recent trends in research on congenital toxoplasmosis. *Int J Parasitol*. 2001; 31(2):115-144.

10. Remington JS, McLeod R, Wilson C.B., Desmonts G. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein JO. Infectious Disease of the Fetus and Newborn Infant. Philadelphia: Elsevier Saunders; 7th ed; 2011. p. 918–1041.
11. Foulon W; Naessens A; Derde MP. Evaluation of the possibilities for preventing congenital toxoplasmosis. *Am J Perinatol.* 1994; 11:57-62.
12. Hohlfeld P, Daffos F, Thulliez P, Aufrant C, Couvreur J, Macaleese J, et al. Fetal toxoplasmosis outcome of pregnancy and infant follow-up after in utero treatment. *J Pediatr.* 1989; 95:11-20.
13. Capobianco JD, Mitsuka-Breganó R, Navarro IT, Rezende Neto CP, Casella AMB, Lopes-Mori FMR, et al. Congenital toxoplasmosis in a reference center of Paraná, Southern Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2014; 18: 364-371.
14. Mitsuka-Breganó R. Programa de Vigilância em Saúde da Toxoplasmose Gestacional e Congênita: elaboração, implantação e avaliação no município de Londrina, Paraná. [tese]. Londrina (Paraná): Universidade Estadual de Londrina; 2009.
15. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.472, de 31 de agosto de 2010. Define as terminologias adotadas em legislação nacional, conforme o disposto no Regulamento Sanitário Internacional 2005 (RSI 2005), a relação de doenças, agravos e eventos em saúde pública de notificação compulsória em todo o território nacional e estabelece fluxo, critérios, responsabilidades e atribuições aos profissionais e serviços de saúde.

Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília (DF), 2010 setembro 1; Seção 1:50-51.

16. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 104, de 25 de janeiro de 2011. Define as terminologias adotadas em legislação nacional, conforme o disposto no Regulamento Sanitário Internacional 2005 (RSI 2005), a relação de doenças, agravos e eventos em saúde pública de notificação compulsória em todo o território nacional e estabelece fluxo, critérios, responsabilidades e atribuições aos profissionais e serviços de saúde. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília (DF), 2011 jan 25; Seção 1:37.

17. Mitsuka-Breganó R, Lopes-Mori FMR, Navarro IT. Toxoplasmose adquirida na gestação e congênita: vigilância em saúde, diagnóstico, tratamento e condutas. Londrina: Eduel; 2010.

18. CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Updated guidelines for evaluating public health surveillance systems: recommendations from the guidelines working group. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2001; 50(RR-13):1-35.

19. Lebech M, Joynson DHM, Seitz HM, Thulliez P, Gilbert RE, Dutton GN, et al. Classification system and case definitions of *Toxoplasma* infection in immunocompetent pregnant women and their congenitally infected offspring. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1996; 15:799-805.

20. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Atenção à Saúde do Recém-Nascido. Guia para os Profissionais de Saúde: intervenções comuns, icterícia e infecções. 2ª. ed. Brasília: Ministério da Saúde. 2013; 109-122.
21. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAM: normas e rotinas. Brasília: Ministério da Saúde; 2007. 2. ed. (Série A. Normas e Manuais Técnicos)
22. Montoya JG, Rosso F. Diagnosis and management of toxoplasmosis. *Clin Perinatol.* 2005; 32(3):705-726.
23. Jones J, Lopez A, Wilson MS. Congenital Toxoplasmosis. *Am Fam Physician.* 2003; 67(10): 2131-2138.
24. Sáfyadi MAP, Berezin EN, Farhat CK, Carvalho ES. Clinical presentation and follow up of children with congenital toxoplasmosis in Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2003; 7:325-333.
25. Mcleod R, Kieffer F, Sautter M, Hosten T, Pelloux H. Why prevent, diagnose and treat congenital toxoplasmosis? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104: 320-344.
26. Vasconcelos-Santos DV, Azevedo DOM, Campos WR, Oréfice F, Queiroz-Andrade GM, Carellos EVM, et al. Congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil: results of

- early ophtalmologic examination of a large cohort of neonates. *Ophthalmology*. 2009; 116:2199-2205.
27. Gilbert R, Freeman K, Lago EG, Bahia-Oliveira LMG, Tan HK, Wallon M, et al. Ocular Sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. *PLoS Negl Trop Dis* 2008; 2: 1-7.
28. Bénard A, Petersen E, Salamon R, Chêne G, Gilbert R, Salmi LR for the European Toxo Prevention Study Group (Eurotox). Survey of European Programmes for the Epidemiological Surveillance of Congenital Toxoplasmosis. *Euro Surveill*. 2008; 13(4-6):1-7.
29. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 1984, de 12 de setembro de 2014. Define a lista nacional de doenças e agravos de notificação compulsória, na forma do Anexo, a serem monitorados por meio da estratégia de vigilância em Unidades Sentinelas e suas diretrizes. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília (DF)*, 2014 setembro 15; Seção 1:59.
30. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 1271, de 6 de junho de 2014. Define a Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional, nos termos do anexo, e dá outras providências. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília (DF)*, 2014 junho 9; Seção 1:67-69.

Figura 1 – Ficha de notificação dos casos suspeitos de toxoplasmose adquirida na gestação e toxoplasmose congênita, no município de Londrina, Estado do Paraná. Brasil, agosto de 2013 a agosto de 2014



SINAN - SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO
FICHA DE INVESTIGAÇÃO - TOXOPLASMOSE

N°

CASO SUSPEITO: Gestante que apresenta sorologia para toxoplasmose (ELISA, Imunofluorescência, Quimioluminescência) **IgM reagente** em qualquer fase da gestação, independentemente do status sorológico do IgG.

Dados Gerais	1 Tipo de notificação: 2 - Individual	3 Data da notificação:
	2 Agravado/Doença: GESTANTE COM TOXOPLASMOSE Código (CID10): O 98-6	
	4 UF: 5 Município de Notificação: 6 Código (IBGE):	
Notificação Individual	6 Unidade de Saúde (ou outra fonte notificadora):	Código (CNES):
	7 Nome do paciente:	ID Serviço:prontuário
	8 Data de nascimento: 9 Idade: <input type="checkbox"/> 1. Hora 3. Mês 2. Dia 4. Ano 10 Cor: <input type="checkbox"/> 1. Branca 4. Parda 2. Preta 5. Indígena 3. Amarela 9. Ignorada	
Dados de Residência	11 Escolaridade: <input type="checkbox"/> 0- Analfabeto 1- Ensino fundamental incompleto 2- Ensino fundamental completo 3- Ensino médio incompleto 4- Ensino médio completo 5- Educação superior incompleta 6- Educação superior completa 9- Ignorada	
	12 Número do Cartão do SUS: 13 Nome da Mãe:	
	14 UF: 15 Município de Residência: 16 Código (IBGE): 16 Distrito:	
Antecedentes Epidemiológicos e Clínicos	17 Bairro: 18 Logradouro (rua, avenida...)	
	19 Número: 20 Complemento (apto, casa...): 21 CEP:	
	22 (DDD) Telefone: 23 Zona: <input type="checkbox"/> 1. Urbana 3. Periurbana 2. Rural 6. Ignorado 24 País (se residente fora do Brasil):	
Dados Laboratoriais	DADOS COMPLEMENTARES DA GESTANTE	
	25 Ocupação: 26 IG na 1ª sorologia IgM reagente: <input type="checkbox"/> 1. 1º trimestre 2. 2º trimestre 3. 3º trimestre 9. IG ignorado 27 Idade Gestacional na data do primeiro USG: <input type="checkbox"/> semanas <input type="checkbox"/> dias Data: / /	
	28 DPP (Data Provável do Parto): Data: / / 29 USG fetal: <input type="checkbox"/> Não Realizado <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Alterado 1. Sim 2. Não 9. Ignorado Data: / /	
Tratamento	30 Local da realização do Pré-natal: <input type="checkbox"/> Particular/convênio <input type="checkbox"/> Outro: <input type="checkbox"/> UBS: 1. Sim 2. Não 9. Ignorado 31 Sintomas na gestação: <input type="checkbox"/> Febre <input type="checkbox"/> Mialgia <input type="checkbox"/> Cefaleia <input type="checkbox"/> Adenomegalia 1. Sim 2. Não 9. Ignorado <input type="checkbox"/> Exantema <input type="checkbox"/> Corioretinite/uveíte <input type="checkbox"/> Encefalite <input type="checkbox"/> Outros: <input type="checkbox"/>	
	32 Hábitos: <input type="checkbox"/> Limpa fezes de gato <input type="checkbox"/> Contato com terra ou areia <input type="checkbox"/> Ingestão de vegetais crus <input type="checkbox"/> Ingestão de água não fervida/torneira/não filtrada <input type="checkbox"/> Consumo de carne crua/mal passada 33 Contato com gato: <input type="checkbox"/> 1. Sim 2. Não 9. Ignorado	
	34 Viagem/outra procedência 21 dias antes do primeiro resultado de IgM reagente? <input type="checkbox"/> Se sim, qual local: 1. Sim 2. Não 9. Ignorado	
Conclusão	Sorologia	
	35 Data da 1ª coleta: 36 Resultado: <input type="checkbox"/> IgM ELISA (_____) <input type="checkbox"/> IgG ELISA (_____) 1. Reagente 2. Não reagente 3. Indeterminado 9. Ignorado <input type="checkbox"/> IgM Imunofluorescência (_____) <input type="checkbox"/> IgG Imunofluorescência (_____) <input type="checkbox"/> IgM Quimioluminescência (_____) <input type="checkbox"/> IgG Quimioluminescência (_____) Outros: _____	
	37 Data da 2ª coleta: 38 Resultado: <input type="checkbox"/> IgM ELISA (_____) <input type="checkbox"/> IgG ELISA (_____) 1. Reagente 2. Não reagente 3. Indeterminado 9. Ignorado <input type="checkbox"/> IgM Imunofluorescência (_____) <input type="checkbox"/> IgG Imunofluorescência (_____) <input type="checkbox"/> IgM Quimioluminescência (_____) <input type="checkbox"/> IgG Quimioluminescência (_____) Outros: _____	
Investigador	39 Data da 3ª coleta: 40 Resultado: <input type="checkbox"/> IgM ELISA (_____) <input type="checkbox"/> IgG ELISA (_____) 1. Reagente 2. Não reagente 3. Indeterminado 9. Ignorado <input type="checkbox"/> IgM Imunofluorescência (_____) <input type="checkbox"/> IgG Imunofluorescência (_____) <input type="checkbox"/> IgM Quimioluminescência (_____) <input type="checkbox"/> IgG Quimioluminescência (_____) Outros: _____	
	41 Avidéz 1: <input type="checkbox"/> 1. Fraca 3. Forte 2. Intermediária 4. Não realizado Data: / / 42 Avidéz 2: <input type="checkbox"/> 1. Fraca 3. Forte 2. Intermediária 4. Não realizado Data: / /	
	43 Data do início do tratamento: 45 Medicamentos utilizados: <input type="checkbox"/> Sulfadiazina; Pirimetamina; Ácido Folinico <input type="checkbox"/> Espiramicina. <input type="checkbox"/> Clindamicina; Pirimetamina; Ácido Folinico Observações: _____ Efeitos Colaterais: _____	
Conclusão	44 Data do final do tratamento:	Assinatura:
	EXCLUSIVO PARA PREENCHIMENTO PELA VIGILÂNCIA	
	46 Classificação final da gestação: <input type="checkbox"/> 1. Confirmado 3. Possível 9. Ignorado 2. Provável 4. Improvável 5. Descartado 47 Aborto na gestação atual: <input type="checkbox"/> 1. Sim 2. Não 9. Ignorado IG: _____ semanas Data: / / 48 Evolução: <input type="checkbox"/> 1. Natural 2. Óbito 9. Ignorado 49 Data do Óbito: 50 Data do encerramento:	

Notificação Individual	CASO SUSPEITO: Criança com IgM reagente para Toxoplasmose e/ou com hidrocefalia/calcificações cerebrais e/ou com coriorretinite e/ou cuja mãe teve toxoplasmose suspeita ou confirmada na gestação					
	51) Agravo/Doença: TOXOPLASMOSE CONGÊNITA			Código (CID10): P 37-1		
	52) Nome do paciente:		ID Serviço:prontuário	53) Sexo: M-Masculino F-Feminino I-Ignorado	54) Data de nascimento:	
Dados Laboratoriais	55) Data de investigação:	56) Idade Gestacional ao nascer (semanas):	57) Peso ao nascer (em gramas):	58) Natimorto: 1. Sim 2. Não 9. Ignorado		
	59) UF:	60) Município de nascimento:	61) Local de nascimento (maternidade/hospital):			
	Sorologia 62) Data da 1ª coleta: 63) Resultado: <input type="checkbox"/> IgM ELISA (_____) <input type="checkbox"/> IgG ELISA (_____) 1. Reagente 2. Não reagente 3. Indeterminado 9. Ignorado <input type="checkbox"/> IgM Imunofluorescência (_____) <input type="checkbox"/> IgG Imunofluorescência (_____) <input type="checkbox"/> IgM Quimioluminescência (_____) <input type="checkbox"/> IgG Quimioluminescência (_____) Outros _____					
64) Data da 2ª coleta: 65) Resultado: <input type="checkbox"/> IgM ELISA (_____) <input type="checkbox"/> IgG ELISA (_____) 1. Reagente 2. Não reagente 3. Indeterminado 9. Ignorado <input type="checkbox"/> IgM Imunofluorescência (_____) <input type="checkbox"/> IgG Imunofluorescência (_____) <input type="checkbox"/> IgM Quimioluminescência (_____) <input type="checkbox"/> IgG Quimioluminescência (_____) Outros _____						
66) Data da 3ª coleta: 67) Resultado: <input type="checkbox"/> IgM ELISA (_____) <input type="checkbox"/> IgG ELISA (_____) 1. Reagente 2. Não reagente 3. Indeterminado 9. Ignorado <input type="checkbox"/> IgM Imunofluorescência (_____) <input type="checkbox"/> IgG Imunofluorescência (_____) <input type="checkbox"/> IgM Quimioluminescência (_____) <input type="checkbox"/> IgG Quimioluminescência (_____) Outros _____						
68) Sorologia com 12 meses de vida: <input type="checkbox"/> IgM <input type="checkbox"/> IgG <input type="checkbox"/> Outros 1. Reagente 2. Não reagente 3. Indeterminado 9. Ignorado						
Tratamento	69) Data do início do tratamento:	71) Medicamentos utilizados: 1. Sim 2. Não 9. Ignorado Obs: _____				
	70) Data do final do tratamento:	<input type="checkbox"/> Sulfadiazina; Pirimetamina; Ácido Folinico <input type="checkbox"/> Espiramicina. Efeitos: _____ <input type="checkbox"/> Clindamicina; Pirimetamina; Ácido Folinico Colaterais: _____				
Investigador	Nome:		Função:	Assinatura:		
EXCLUSIVO PARA PREENCHIMENTO PELA VIGILÂNCIA						
Manifestações clínicas e oftalmológicas	72) Manifestações clínicas no 1º ano de vida:					
	1. Sim <input type="checkbox"/> Adenomegalia <input type="checkbox"/> Convulsão <input type="checkbox"/> Déficit auditivo 2. Não <input type="checkbox"/> Hepatomegalia <input type="checkbox"/> Déficit motor <input type="checkbox"/> Atraso DNPM 9. Ignorado <input type="checkbox"/> Esplenomegalia <input type="checkbox"/> Microcefalia <input type="checkbox"/> Outro: _____ <input type="checkbox"/> Ictericia colestática <input type="checkbox"/> Macrocefalia					
	73) Exame oftalmológico até 30 dias:		74) Exame oftalmológico do 1º ao 24º mês de vida:			
<input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Alterado → <input type="checkbox"/> Coriorretinite direita <input type="checkbox"/> Coriorretinite esquerda <input type="checkbox"/> Uveíte <input type="checkbox"/> Microftalmia <input type="checkbox"/> Catarata <input type="checkbox"/> Outro: _____ 1. Sim 2. Não 9. Ignorado						
<input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Alterado → <input type="checkbox"/> Coriorretinite direita <input type="checkbox"/> Coriorretinite esquerda <input type="checkbox"/> Uveíte <input type="checkbox"/> Microftalmia <input type="checkbox"/> Catarata <input type="checkbox"/> Outro: _____ 1. Sim 2. Não 9. Ignorado						
Manifestações neurológicas	Exame de imagem no SNC no 1º ano de vida:					
	75) USG crânio: <input type="checkbox"/> Não realizado 1. Sim 2. Não 9. Ignorado		76) TC crânio: <input type="checkbox"/> Não realizado 1. Sim 2. Não 9. Ignorado			
	Idade (meses): _____ <input type="checkbox"/> Realizado → <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Hidrocefalia <input type="checkbox"/> Calcificação		Idade (meses): _____ <input type="checkbox"/> Realizado → <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Hidrocefalia <input type="checkbox"/> Calcificação			
77) Exame de LCR: Data: ____/____/____						
Hemácias _____ mm ³ Leucócitos _____ mm ³ Neutrófilos _____ % Linfócitos _____ % Monócitos _____ % Eosinófilos _____ % Glicose _____ mg Proteínas _____ mg Cloreto _____ mg Lactato _____ mmol/L Proteína C Reativa _____ mg/L						
Conclusão	78) Classificação final: <input type="checkbox"/> 1. Confirmado 2. Descartado 9. Ignorado		79) Critério de confirmação/descarte: <input type="checkbox"/> 1. Laboratorial 2. Clínica/epidemiológico 3. Clínico 4. Sorologia Inconclusiva		80) Evolução: <input type="checkbox"/> 1. Cura sem sequelas 2. Cura com sequelas 3. Óbito pela doença 4. Óbito por outras causas 9. Ignorado	
	81) Se cura com seqüela, qual tipo: <input type="checkbox"/> Ocular <input type="checkbox"/> Neurológica: _____ <input type="checkbox"/> Auditiva <input type="checkbox"/> Outras: _____		82) Data do Óbito: _____		83) Data do encerramento: _____	
Observações						
	AGENDAMENTO: 1ª Revisão: ____/____/____ 2ª Revisão: ____/____/____ SEQUELAS: () Neurológica () Oftalmológica Obs: _____					
Investigador	Nome:		Função:	Assinatura:	Município: _____ Código da Unidade de Saúde _____	

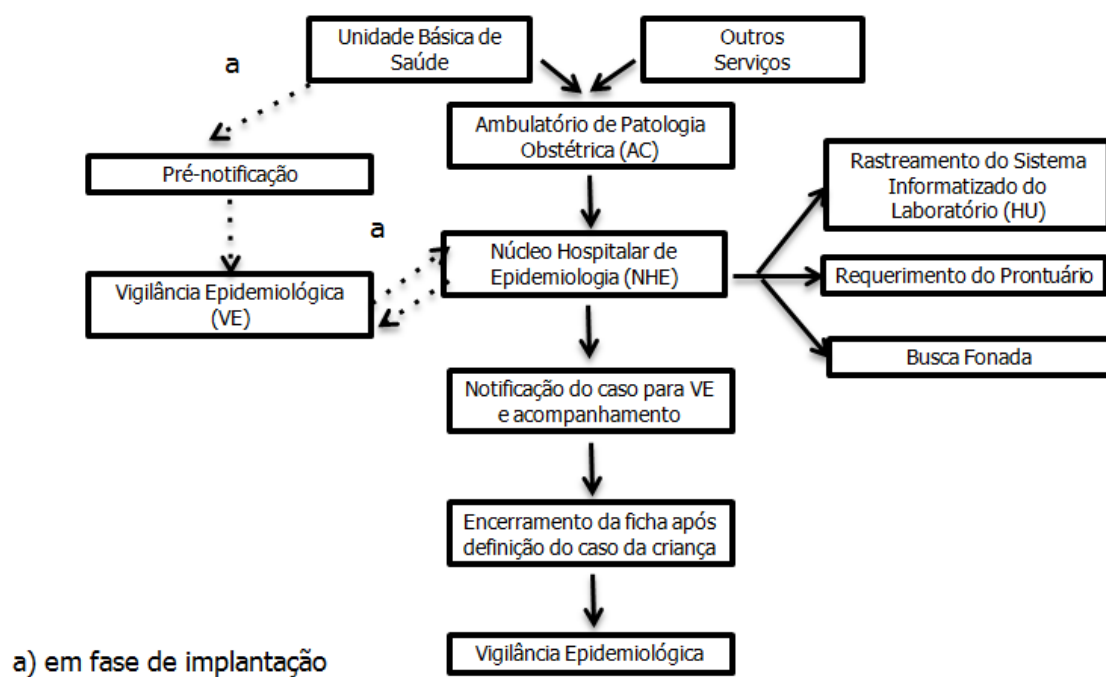


Figura 2 - Fluxo de notificação da gestante com toxoplasmose suspeita ou confirmada durante a gestação, no município de Londrina, Estado do Paraná. Brasil, agosto de 2013 a agosto de 2014

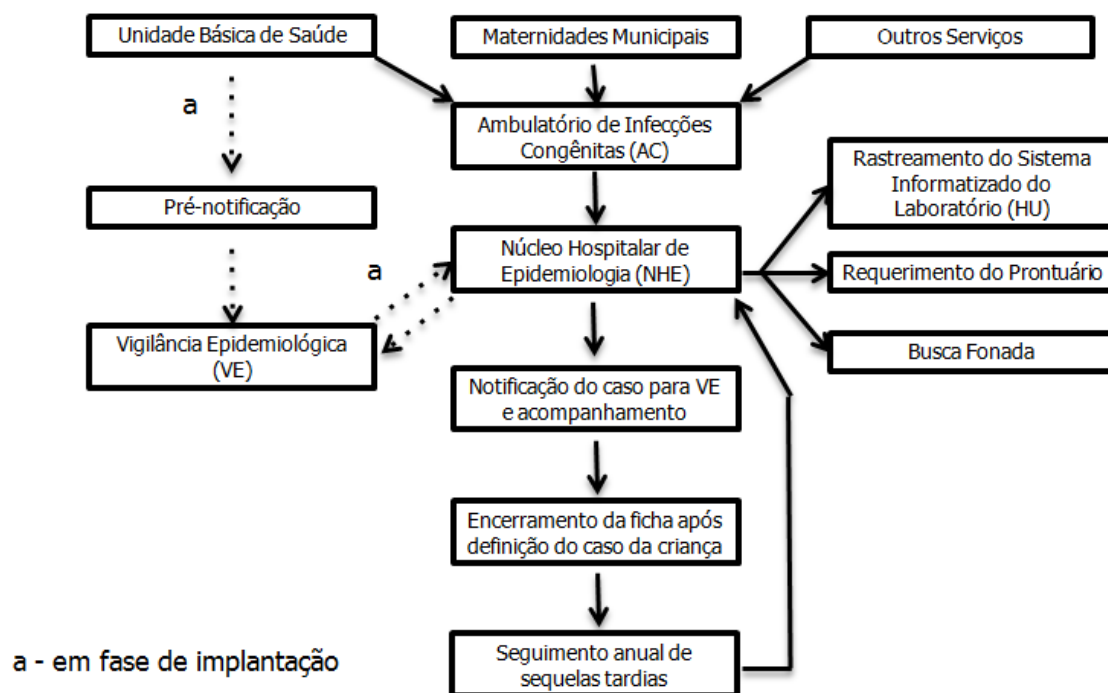


Figura 3 – Fluxo da notificação da criança com toxoplasmose congênita suspeita ou confirmada, no município de Londrina, Estado do Paraná, Brasil, agosto de 2013 a agosto de 2014

Tabela 1 - Características demográficas, clínicas e laboratoriais das gestantes notificadas com suspeita de toxoplasmose aguda, na cidade de Londrina no estado do Paraná. Brasil, no período de agosto de 2013 a agosto de 2014.

Variável	n = 64	%
Procedência		
Zona urbana	57	89,1
Zona rural	5	7,8
Ignorado	2	3,1
Escolaridade		
Analfabeta	0	0,0
1 a 8 anos	23	35,9
> 8 anos	33	51,6
Ignorado	8	12,5
Sintomas		
Febre	0	0,0
Exantema	1	1,7
Mialgia	9	14,1
Cefaleia	15	23,4
Adenomegalia	4	6,5
Ignorado	6	9,4
Ausentes	41	64,1

Variável	n = 64	%
Hábitos associados à aquisição da toxoplasmose		
Limpou fezes de gato	9	14,1
Contato com terra ou areia	19	29,7
Bebeu água não fervida ou filtrada	46	71,9
Comeu vegetais crus	49	76,6
Comeu carne crua	24	37,5
Contato com gatos	27	42,2
Trimestre da gestação no diagnóstico ^a		
1º trimestre	27	42,2
2º trimestre	21	32,8
3º trimestre	11	17,2
Ignorado	5	7,8
Teste de Avidéz de IgG ^b		
Fraca Avidéz	24	37,5
Avidéz Intermediária	5	7,8
Forte Avidéz	27	42,2
Avidéz não realizada	8	12,5
Classificação ^c		
Confirmado	4	6,2
Provável	27	42,2
Possível	17	26,6
Improvável	15	23,4
Susceptível	1	1,6

a) Imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência IgM anti-*T. gondii* (Architect[®], System Abbott, Wiesbaden, Alemanha).

b) Teste de avidéz da IgG por imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência (Architect[®], System Abbott, Wiesbaden, Alemanha).

c) adaptado de Lebech (1996)¹⁹ e do Ministério da Saúde (2013)²⁰.

Artigo 3

Avaliação do método *Western Blot* para o diagnóstico de toxoplasmose congênita.

Jaqueline Dario Capobiango¹, Thaís Cabral Monica², Fernanda Pinto Ferreira³, Regina Mitsuka-Breganó⁴, Italmar Teodorico Navarro⁵, João Luis Garcia⁵, Edna Maria Vissoci Reiche⁶.

¹Departamento de Pediatria e Cirurgia Pediátrica, Centro de Ciências em Saúde, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná, Brasil;

²Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências Agrárias, UEL, Londrina, Paraná, Brasil.

³Laboratório de Zoonoses e Saúde Pública, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, UEL, Londrina, Paraná, Brasil.

⁴Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, UEL, Londrina, Paraná, Brasil.

⁵Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, UEL, Londrina, Paraná, Brasil.

⁶Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, UEL, Londrina, Paraná, Brasil.

Correspondência: Jaqueline Dario Capobiango, Departamento de Pediatria e Cirurgia Pediátrica, Centro de Ciências em Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil. Av. Robert Koch, 60, Vila Operária, CEP 86038-440, Fone: (43)3371-2353; email: jaquedc@uel.br.

Resumo

Muitas são as dificuldades na interpretação dos resultados obtidos nos métodos sorológicos para o diagnóstico de toxoplasmose congênita, pois a maioria das crianças é assintomática ao nascimento e os anticorpos da classe IgM anti-*Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) não são detectados em todos os recém-nascidos. O objetivo do presente estudo foi avaliar o método de *Western Blot* (WB) para a detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* presentes no soro de crianças de mães com toxoplasmose adquirida na gestação para auxiliar no diagnóstico da toxoplasmose congênita. No período de junho

de 2011 a junho de 2014, foram acompanhadas 99 mães com toxoplasmose adquirida na gestação e suas respectivas crianças. Dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais foram coletados das mães e suas crianças. Destas crianças, 15 (15,1%) preencheram os critérios para diagnóstico de toxoplasmose congênita, 32 (32,3%) tiveram o diagnóstico excluído e nas demais 52 (52,5%), não foi possível definir o diagnóstico de infecção congênita no período do estudo e foram excluídas. Os sintomas nos primeiros três meses de vida foram observados em 12 (80,0%) crianças e os mais frequentes foram calcificação cerebral em 9 (60,0%), coriorretinite em 8 (53,3%), hidrocefalia em 4 (26,6%) e vitreíte em 2 (13,3%). Anticorpos IgM anti-*T. gondii* foram detectados em 6 (40,0%) crianças e a reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção do DNA do *T. gondii* foi positiva em 5 das 7 realizadas (71,4%). No WB, as proteínas reconhecidas com maior frequência pelo soro das crianças apresentaram peso molecular (em kDa) de 30 (33,3%), 31 (20,0%), 44 (20,0%), 13 (13,3%), 58 (13,3%) e 94 (13,3%). A sensibilidade do WB foi 60,0% [intervalo de confiança (IC) 95% 32,3 a 83,7%], a especificidade foi 43,7% (IC 95% 26,7 a 62,3%), valor preditivo positivo de 33,3% (IC 95% 16,5 a 54,0%) e valor preditivo negativo de 70,0 % (IC 95% 45,7 a 88,1%), ($p=0.05875$). Com a associação da presença de sintomas clínicos ou WB positivo, verificou-se aumento da sensibilidade para 92,0%. Quando associado a outros marcadores de infecção congênita como a pesquisa de IgM anti-*T. gondii* ou da PCR, a sensibilidade do WB aumentou para 76,0 e 89,1%, respectivamente. Os resultados confirmam que o WB pode ser útil na avaliação sorológica de pacientes com toxoplasmose congênita; no entanto, devido à sensibilidade observada, não deve ser utilizado isoladamente, mas em associação com outros marcadores de infecção congênita.

Palavras-chave: Toxoplasmose, *Toxoplasma gondii*, Toxoplasmose congênita, Western Blot.

Introdução

A maior parte das crianças com toxoplasmose congênita não apresenta sinais ou sintomas ao nascimento, caracterizando infecção subclínica; mesmo assim, a criança apresenta risco de desenvolver sequelas tardias, principalmente oculares e neurológicas (BEVERLEY et al., 1973). Para os casos sintomáticos, há maior gravidade das manifestações clínicas quando a infecção ocorre no primeiro trimestre da gestação; porém, mesmo as crianças infectadas durante o terceiro trimestre da

gestação podem ter lesões oculares e no sistema nervoso central (SNC) (FRENKEL; BERMUDEZ, 2005; REMINGTON et al., 2011).

São consideradas suspeitas todas as crianças, sintomáticas ou não, que são filhas de mães com toxoplasmose aguda no curso da gestação ou que nascem com sinais ou sintomas da doença que incluem icterícia, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, anemia, baixo peso, prematuridade, coriorretinite, estrabismo, nistagmo, microcefalia, iridociclite, microcefalia, convulsões, alterações do líquido cefaloraquidiano (LCR), hidrocefalia e calcificações cerebrais (REMINGTON et al., 2011).

As crianças suspeitas devem ser submetidas à investigação sorológica com pesquisa de anticorpos específicos anti-*Toxoplasma gondii* (*T. gondii*). A obtenção de reatividade de anticorpos da classe IgM e/ou IgA, ou a persistência de IgG após os 12 meses de vida, ou aumento dos títulos de anticorpos da classe IgG em amostras seriadas são perfis sorológicos que caracterizam a infecção congênita (REMINGTON et al., 2011; AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2009).

Porém, o diagnóstico sorológico confirmatório da infecção pelo *T. gondii* pela detecção dos anticorpos da classe IgM contra o parasita não ocorre em todos os recém-nascidos (LEBECH et al., 1999; LAGO et al., 2007; REMINGTON et al., 2011; CAPOBIANGO et al., 2014). Além disto, a presença de anticorpos IgG anti-*T. gondii* nas amostras dos recém-nascidos não é evidência de infecção, visto que os anticorpos IgG maternos são transferidos passivamente e a meia vida destes anticorpos é de, pelo menos, 23 dias e podem persistir por até um ano. Portanto, deve-se avaliar os anticorpos IgG anti- *T. gondii* em amostras seriadas de soro para confirmar a presença da infecção congênita e até que se possa excluir a infecção congênita a criança permanece sob tratamento e acompanhamento ambulatorial. (FRENKEL; BERMUDEZ, 2005; RODRIGUES et al., 2009; REMINGTON et al., 2011).

No feto infectado, anticorpos IgG e IgM produzidos contra os determinantes antigênicos do *T. gondii* podem diferir daqueles anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii* detectados no soro materno. Crianças com toxoplasmose congênita com testes convencionais de IgM não reagente têm sido diagnosticadas nos primeiros meses de vida por meio do método de *Western Blot* (WB) (REMINGTON; ARAÚJO; DESMONT, 1985; PINON et al., 2001; DUPONT et al., 2003; REMINGTON; THULLIEZ; MONTOYA, 2004).

Como são muitas as dificuldades na interpretação dos resultados obtidos nos testes sorológicos para o diagnóstico de toxoplasmose congênita, os exames laboratoriais devem ser definidos por meio da repetição dos testes com a avaliação de outra amostra coletada após algumas semanas ou com o emprego de vários testes

para a pesquisa de diferentes classes de anticorpos, o que pode levar meses para a definição diagnóstica. Assim, torna-se necessário um método de diagnóstico rápido e de baixa complexidade, para que os laboratórios de referência para toxoplasmose possam diferenciar os resultados duvidosos obtidos pelas técnicas sorológicas convencionais de rotina. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o método WB para a detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* presentes no soro da criança e da mãe com toxoplasmose adquirida na gestação para auxiliar no diagnóstico da toxoplasmose congênita.

Materiais e Métodos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (UEL) com o Parecer nº 043/2011. Todas as mães participaram voluntariamente e assinaram o Termo de Compromisso Livre e Esclarecido.

Sujeitos

A população foi constituída por mulheres com suspeita de toxoplasmose adquirida na gestação e seus filhos, atendidos no Ambulatório de Infectologia Pediátrica, do Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário (AEHU), da UEL, no período de junho de 2011 a junho de 2014. Para o grupo de pacientes, foram incluídas as crianças cujas mães tiveram suspeita de toxoplasmose com IgM anti-*T. gondii* reagente durante a gestação. As amostras de sangue das crianças para a realização do WB foram coletadas durante os primeiros três meses de vida. Foram excluídas as gestantes imunocompetentes com diagnóstico de toxoplasmose prévio à gestação e os lactentes com toxoplasmose aguda adquirida, portanto, fora do período gestacional. Foram seguidos os seguintes critérios para a definição da infecção na criança: elevação dos títulos de IgG em amostras seriadas nos primeiros meses de vida e/ou a persistência dos anticorpos IgG anti-*T. gondii* após os 12 meses de vida e/ou IgM anti-*T. gondii* reagente e/ou coriorretinite e/ou lesão de SNC com IgG reagente e/ou PCR para detecção do DNA do *T. gondii* positiva (BRASIL, 2013; AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2009; LEBECH et al., 1996). O grupo controle foi constituído pelas crianças cujas mães tiveram suspeita de toxoplasmose com IgM anti-*T. gondii* reagente durante a gestação, mas não preencheram os critérios de infecção congênita descritos anteriormente.

Foram acompanhadas 99 crianças e suas mães. Destas, 15 (15,1%) crianças tiveram o diagnóstico de toxoplasmose congênita e em 32 (32,3%) crianças foi possível excluir o diagnóstico de toxoplasmose. Em 52 crianças (52,5%) não foi

possível definir o diagnóstico de infecção congênita no período do estudo, portanto não foram incluídas.

Reações sorológicas para detecção de IgM e IgG anti-*T. gondii*

As reações sorológicas realizadas no período pré-natal nas amostras das gestantes e, posteriormente, nas amostras das crianças coletadas nos primeiros três meses de vida foram realizadas pelos métodos convencionais da rotina laboratorial. Anticorpos IgG anti-*T. gondii* foram determinados pelo método de imunofluorescência indireta (IFI) (CAMARGO, 1964, 1973), com reagentes comerciais (Biolab-Merieux (Imunoblot[®], Jacarepaguá, RJ, Brasil), que utiliza *T. gondii* obtido a partir de líquido ascítico de camundongos infectados, e por imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência (QL) (Architect[®], System Abbott, Wiesbaden, Alemanha) que utiliza antígeno recombinante p30 (SAG1) e p35 (GRA8) do *T. gondii*. Anticorpos IgM anti-*T. gondii* foram detectados por imunoensaio de micropartículas por QL (Architect[®], System Abbott, Wiesbaden, Alemanha), que utiliza o antígeno p30 e lisado total de *T. gondii*. As amostras das mães com reatividade simultânea para os anticorpos IgG e IgM foram submetidas ao teste de avidéz da IgG por método de QL (Architect[®], System Abbott, Wiesbaden, Alemanha) para diferenciação entre infecção recente (< 4 meses) e infecção há mais de 4 meses.

Obtenção dos antígenos de *T. gondii*

Cinco camundongos albinos fêmeas, com idade entre 45 a 60 dias e peso entre 25 e 40 g foram utilizados para obtenção de taquizoítas da cepa RH do *T. gondii* a serem utilizados no teste de WB. Os animais foram inoculados pela via intraperitoneal com uma suspensão de taquizoítas vivos (10^5 /mL) em solução fisiológica estéril. Quarenta e oito horas após a inoculação, o exsudato foi obtido por lavagem da cavidade peritoneal com 3,0 mL de solução fisiológica estéril. As amostras foram passadas duas vezes em agulha de 27G para ruptura de células do hospedeiro. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas e o sedimento foi padronizado em 10^9 taquizoítas/ mL por contagem em câmara de Neubauer (LUNDÉN, 1995).

Método de WB

Primeiramente, foram quantificadas as proteínas do *T. gondii* a serem utilizadas no WB por método de Lowry et al (1951). Foi utilizado gel de poliacrilamida 12% para separação eletroforética das proteínas; posteriormente, foi realizada a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose com reagentes comerciais (I BLOT[™]

Gel Transfer System, CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante. O papel de nitrocelulose foi corado com Ponceau por 5 minutos sob agitação, para a avaliação da transferência das proteínas. Após lavagem com água destilada, as fitas de nitrocelulose foram cortadas e bloqueadas com leite desnatado 5% + tampão tris salino (TBS) *Tween*, sob agitação, durante 1 hora ou com incubação *overnight*. Posteriormente, foram realizadas três lavagens, sob agitação, com TBS e leite desnatado 5%. Após a lavagem, foi adicionado o soro do paciente diluído em TBS *Tween* e leite desnatado a 5% e deixado sob agitação por 1 hora e 30 minutos. Após três lavagens sob agitação com TBS *Tween* e leite desnatado 5% foi adicionado o conjugado anti-IgG humano (Invitrogen™, CA, EUA) diluído em TBS *Tween* e leite desnatado 5%, deixado sob agitação por 1 hora e 30 minutos. Após três lavagens, sob agitação, com TBS *Tween* e leite desnatado 5%, foi adicionado o substrato cromógeno diaminobenzidina (DAB) e peróxido de hidrogênio. Quando as bandas eram visualizadas, a reação era interrompida com água destilada. Soros controles positivo e negativo para anticorpos anti-*T. gondii* foram incluídos em cada teste.

A análise qualitativa dos anticorpos contra as proteínas do *T. gondii* foi realizada pelo WB no soro de gestantes com infecção aguda e de seus recém-nascidos caracterizando, desta forma, os anticorpos dirigidos contra as principais proteínas expressas pelo parasita. O teste foi considerado positivo se a criança apresentasse anticorpos que reconhecessem, pelo menos, uma banda de proteína diferente da mãe ou com intensidade maior que a banda correspondente materna, como demonstrado na figura 1 (REMINGTON; ARAÚJO; DESMONT, 1985; CHUMPITAZI, 1995; GROSS et al., 2000; RILLING et al., 2003; MACHADO et al., 2010). Para controlar a subjetividade da leitura, dois avaliadores realizaram a leitura dos testes e houve concordância em 100% dos resultados.

A especificidade do método WB foi determinada com o emprego de 26 amostras de soro de indivíduos soronegativos para a toxoplasmose (IgG e IgM anti-*T. gondii* não reagente) e com reatividade para anticorpos contra outros patógenos como *Treponema pallidum* (n=5), *Trypanosoma cruzi* (n=5), *Leishmania* spp (n=2), *Paracoccidioides brasilienses* (n=5) ou reatividade aos marcadores sorológicos de autoimunidade como anticorpos antinucleares (n=5) e anti-DNA dupla hélice (n=4).

PCR para detecção de DNA do *T. gondii*

A amplificação de DNA do *T. gondii* foi realizada usando o método descrito por Homan et al. (2000). Os *primers* Tox4 (CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG) e Tox5 (CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT) foram usados para a amplificação de um fragmento com 529 pares de bases (pb) (GenBank No. AFI46527) de DNA de *T.*

gondii. A PCR foi realizada em um volume final de 22,5 µL, contendo 2,5 µL de DNA extraído da amostra; 1 µL de 1,0 mM para cada *primer*, 100 mM de dNTP (Invitrogen, Life Technologies, CA, USA), 60 mM de Tris-HCl (pH 9.0), 15 mM de (NH₄)₂SO₄, 2 mM de MgCl₂ e 0,25 uL de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Life Technologies, CA, USA) e 7,75 µL de água Mili Q. A amplificação do DNA do parasita foi realizada com 35 ciclos em termociclador PTC-100 (MJ-Research, CA, USA), utilizando a seguinte condição de ciclagem: 7 min a 94 °C para desnaturação no 1º ciclo, seguida por 33 ciclos de 1 min a 94 °C para desnaturação, 1 min a 55 °C para anelamento e 1 min a 72 °C para extensão e o ciclo 35º foi seguido por uma extensão final de 10 min a 72 °C. Alíquota de cada produto de PCR foi submetida a eletroforese em gel de agarose 2%. Taquizoítas da cepa RH (10⁷/mL) tiveram seu DNA extraído para serem usados como controle positivo. A água foi considerada o controle negativo. Amostras controles positivo e negativo para o *T. gondii* foram incluídas em cada teste.

Análise Estatística

Um banco de dados foi criado no Programa Microsoft Office Excell 2007 e no Programa Epi Info 3.4. A análise estatística foi realizada no Programa *GraphPad Prism 5* (*GraphPad Software, Inc., San Diego, USA*) e no Programa SPSS 15.0. Variáveis categóricas foram expressas em número absoluto (n) e porcentagem (%) e analisadas pelo Teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher, quando apropriado. Variáveis contínuas foram expressas em mediana e variação interquartil (IQR) de 25% e 75%. Para o WB foram calculados os parâmetros de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN), com intervalo de confiança (IC) de 95%. Valores de p < 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

Resultados

A idade das mães no grupo de crianças infectadas variou de 15 a 36 anos, com mediana de 23 anos e IQR (25 e 75%) de 17 e 32 anos. A idade das mães no grupo de crianças não infectadas variou de 15 a 37 anos, com mediana de 22,5 anos, IQR (25 e 75%) de 18 e 27,8 anos (p=0,187).

Segundo os critérios de Lebech et al. (1996) e do Ministério da Saúde (BRASIL, 2013) para a definição da infecção congênita obtivemos os seguintes resultados: das 15 crianças com toxoplasmose congênita, 12 (80,0%) foram sintomáticas e preencheram os critérios clínicos para a definição da doença, 6 (40,0%) apresentaram IgM anti-*T. gondii* reagente, 5 (33,3%) apresentaram elevação de IgG anti-*T. gondii* nos primeiros meses de vida, 1 (6,7%) apresentou persistência dos

títulos de IgG anti- *T. gondii* em amostras seriadas e 5 das 7 (71,4%) que realizaram PCR apresentaram resultado positivo (Tabela 1).

Entre as 15 crianças com toxoplasmose congênita, o teste WB foi positivo em 9 (60,0%) e entre as 32 crianças sem toxoplasmose o teste foi positivo em 18 (56,3%), o que resultou em uma sensibilidade de 60,0% (IC 95% 32,3 a 83,7%), especificidade de 43,7% (IC 95% 26,4 a 62,3%), VPP de 33,3% (IC 95% 16,5 a 54,0) e VPN de 70,0% (IC 95% 45,7 a 88,1) ($p=0,05875$). Em 2 crianças com toxoplasmose congênita, o WB foi negativo e a IgM anti-*T. gondii* foi reagente; em 6 crianças, o WB foi positivo e a IgM anti-*T. gondii* não foi detectada e em 4 crianças os dois testes foram negativos.

O peso molecular (PM) das proteínas reconhecidas pelos anticorpos presentes no soro das crianças com toxoplasmose congênita (casos) variaram de 2 a 94 kDa e das proteínas reconhecidas pelos anticorpos presentes no soro das não infectadas (controles) variaram de 1 a 160 kDa. Entre as 9 crianças diagnosticadas pelo WB, 7 apresentaram bandas diferentes das observadas no soro materno e 2 com bandas de maior intensidade que as apresentadas pela amostra da mãe.

As proteínas reconhecidas com maior frequência pelos anticorpos das amostras dos grupos de caso e controle estão demonstradas na Figura 2. A comparação das frequências das proteínas reconhecidas pelos anticorpos séricos dos dois grupos, em relação à amostra materna, está demonstrada na Tabela 2. Em relação às 26 amostras de pacientes com outras doenças, 2 não apresentaram reatividade e 24 apresentaram reatividade de anticorpos que reconheceram as proteínas de 17 a 118 kDa e as reconhecidas com maior frequência foram p22 (11/40,7%), p34 (9/33,3%), p38 (8/29,6%), p94 (6/22,2%), p56 (5/18,5%) e p30 (5/18,5%).

Ao analisar o teste de IgM anti *T. gondii* detectado por método de QL, obtivemos a sensibilidade de 40,0% (IC 95% 16,3 a 67,6), especificidade de 100,0% (IC 95% 89,1 a 100,0), VPP de 100,0% (IC 95% 54,1 a 100,0), VPN de 78,1% (IC 95% 62,4 a 89,4) ($p = 0,0005$).

Para a detecção do DNA parasita por PCR, a sensibilidade foi de 71,4% (IC 95% 29,0 a 96,3), especificidade de 100,0% (IC 95% 69,2 a 100,0), VPP de 100,0% (IC 95% 47,8 a 100,0) e VPN de 83,3% (IC 95% 51,6 a 98,0) ($p = 0,0034$).

A sensibilidade e especificidade do WB quando associadas à presença da IgM anti-*T. gondii*, à PCR e aos sintomas clínicos observados estão demonstradas na tabelas 3.

O WB foi positivo em 6/9 pacientes (66,7%) com coriorretinite e em 3/6 pacientes (50,0%) sem coriorretinite ($p = 0,6224$), revelando uma sensibilidade de 66,7% (IC 95% 29,9 a 92,5), especificidade de 50% (IC 95% 11,8 a 88,2), VPP de

66,7% (IC95% 29,9 a 92,5) e VPN de 50% (IC 95% 11,8 a 88,2). As proteínas reconhecidas com maior frequência pelos anticorpos das amostras dos pacientes com coriorretinite foram: p20 (3/6, 50,0%), p46 (3/6, 50,0%) e p50 (3/6, 50,0%). Para os pacientes sem coriorretinite, as proteínas mais frequentemente reconhecidas foram p25 (2/3, 67,0%) e p94 (2/3, 67,0%). A proteína p94 não foi reconhecida pelas amostras de soro de pacientes com coriorretinite. Considerando as proteínas reconhecidas, não houve diferença significativa entre os grupos ($p = 0,1494$).

Em relação aos 9 pacientes com calcificação cerebral, 6 (66,7%) pacientes apresentaram WB positivo, enquanto que entre os 6 pacientes sem calcificação cerebral, 3 (50,0%) apresentaram WB positivo ($p = 0,6224$).

Discussão

O diagnóstico de toxoplasmose congênita é um desafio na prática clínica, pois a sensibilidade da soropositividade da IgM anti *T. gondii* tem sido relatada entre 50,0% e 75,0% das crianças com a doença (LEBECH et al., 1999; LAGO et al., 2007). Em estudo prévio, relatamos uma soropositividade de 48,3% para IgM anti-*T. gondii* em pacientes com toxoplasmose congênita (CAPOBIANGO et al., 2013) e no presente estudo obtivemos soropositividade de 40,0%. A ausência da IgM anti-*T. gondii* pode ser justificada pelo fato da infecção fetal ter ocorrido no início da gestação ou em consequência do tratamento materno precoce para toxoplasmose, realizado nos dois primeiros trimestres da gestação, que causaria um bloqueio da resposta imunológica ou atraso da mesma (SENSINI, 2006). Outro inconveniente deste marcador é o atraso na coleta da amostra da criança, pois Lago, Oliveira e Bender (2014) demonstraram que os anticorpos IgM anti-*T. gondii* não eram detectados em 19,6% das amostras de crianças com 30 dias de vida e em 54,9% dos pacientes aos 90 dias de vida. Portanto, muitas vezes é necessário o seguimento sorológico para a definição de toxoplasmose congênita, com a identificação dos títulos de IgG anti *T. gondii* estáveis ou em ascensão, o que atrasa o diagnóstico e causa insegurança nos familiares (GROSS et al., 2000). Neste contexto, o WB pode ser usado para comparar os padrões de anticorpos anti-*T. gondii* nas amostras do soro de mães e suas crianças, o que possibilita a determinação se os anticorpos são os transmitidos passivamente ou os sintetizados pelo feto ou lactente nos casos de infecção congênita (CHUMPITAZI et al., 1995).

L'Olliver et al. (2012) observaram maior contribuição do WB para o diagnóstico de toxoplasmose congênita que a detecção de IgM anti-*T. gondii* no primeiro mês de vida, com positividade de 45,8% dos casos para IgM e 78,8% para WB.

Em uma coorte de 97 crianças (14 infectadas) em que foram comparados os anticorpos IgG da mãe e do recém nascido, a sensibilidade encontrada do WB foi 82,4%, especificidade 93,0%, VPP 73,7% e VPN 95,7%. Ao associar o WB com a presença de IgM e/ou IgA para toxoplasmose determinados por ELISA, a sensibilidade aumentou para 85,7% (GROSS et al., 2000).

Os resultados da sensibilidade do WB no presente estudo estão mais próximos aos encontrados por Machado et al (2010) que relataram sensibilidade de IgG-WB de 73,5%; porém, estes autores obtiveram especificidade de 97,5%, superior aos nossos resultados. Machado et al (2010) também relataram que a combinação de IgG-WB e IgM-WB aumentou a sensibilidade do diagnóstico de infecção congênita para 86,5%.

A menor sensibilidade obtida no presente estudo pode ser explicada, em parte, porque todos os pacientes com toxoplasmose congênita estavam em tratamento com sulfadiazina, pirimetamina e ácido fólico. Porém, as crianças com toxoplasmose que apresentavam títulos de IgG anti-*T. gondii* em queda, em amostras seriadas, e teriam o diagnóstico excluído, apresentaram WB positivo, o que permitiu confirmar o diagnóstico e manter o tratamento adequado.

Comparando a sensibilidade da pesquisa de anticorpos séricos IgM anti-*T. gondii* por métodos convencionais (ISAGA e ELISA) e do WB para detecção de IgG e IgM, realizados com amostra coletada ao nascimento, um estudo relatou sensibilidade de 52,0% e 67,0%, respectivamente, e especificidade de 99,0% e 96,0%, respectivamente. Ao combinar os dois métodos, a sensibilidade aumentou para 78,0% ao nascimento e para 85,0% aos três meses de vida, com a detecção de 94,0% dos casos de toxoplasmose congênita (RILLING et al., 2003). Magi e Migliorini (2011) avaliaram a utilidade do WB-IgG e IgM no diagnóstico de toxoplasmose congênita nos primeiros meses de vida em 56 pares de mães e crianças. Nenhuma das crianças, entre as sete com toxoplasmose congênita, tinha manifestações clínicas e em três casos o WB foi capaz de detectar a infecção ao nascimento ou nos primeiros meses de vida, pois o ISAGA foi negativo para IgM anti-*T. gondii*. Nestes casos, o diagnóstico poderia ter sido atrasado caso fossem usados apenas os métodos sorológicos convencionais.

Dupont et al. (2003) demonstraram que a combinação de IgM-WB com IgG-WB nos primeiros três meses de vida aumentou a sensibilidade do diagnóstico de toxoplasmose congênita. Demonstraram, ainda, que a sensibilidade do método foi maior ao se coletar duas amostras, ao nascimento e outra no período dos primeiros três meses de vida.

No presente estudo, ao longo dos meses, foram analisadas amostras seriadas de algumas das crianças e de suas mães de forma concomitante. Entre as crianças

infectadas, com 1ª amostra com resultado falso negativo no WB, 2/6 (33,3%) crianças reconheceram proteínas diferentes em relação às maternas na segunda coleta, antes dos seis meses de vida, caracterizando a neossíntese dos anticorpos IgG anti-*T. gondii*. Em amostra seriada do Paciente 1 foram detectados anticorpos diferentes dos maternos contra as proteínas p61, p57, p52, p47, p44, p40, p37, p32, p23 e p8; no Paciente 7, detectaram-se anticorpos contra a p40; no Paciente 8, não houve diferença entre os anticorpos detectados na 2ª amostra da criança em relação à materna; no Paciente 9, não se detectaram anticorpos contra proteínas na 2ª amostra da criança; nos Pacientes 12 e 15 não obtivemos 2ª amostra para análise. Portanto, um resultado negativo na 1ª amostra de WB não exclui a infecção congênita, justificando a necessidade de repetição do exame em 2ª amostra seriada, possibilitando a confirmação ou a exclusão da infecção na evolução sorológica, preferencialmente, nos primeiros três meses de vida.

Em estudo prévio, o tempo de coleta da amostra materna teve influência no resultado do teste de WB, pois as mães podem não reagir mais aos antígenos do *T. gondii* no período pós parto tardio, com resultado falso negativo, em decorrência do tratamento da infecção até o parto (GROSS et al., 2000). No presente estudo, este fenômeno foi observado em uma das mães do grupo de crianças infectadas. Porém, outras mães apresentaram um aumento do número de bandas reconhecidas nas amostras subsequentes coletadas logo após a suspensão do tratamento específico para *T. gondii* no parto.

Machado et al. (2010) relataram que os antígenos reconhecidos pelos anticorpos dos recém nascidos variaram o PM de 21 a 116 kDa, sendo mais frequentes os que variaram de 45 a 66 kDa e de 97 a 116 kDa.

Gross et al. (2000) e Chumpitazi et al. (1995) encontraram, na maioria das amostras de crianças com toxoplasmose congênita, anticorpos contra as proteínas maiores que 30 kDa. No presente estudo, com exceção da proteína p13, reconhecida por duas amostras, as demais proteínas reconhecidas também apresentaram PM maiores ou iguais a 30 kDa (p30, p31, p44, p58, p78 e p94).

Remington, Araújo e Desmont (1985) relataram que em amostras de crianças não infectadas observa-se maior frequência de reação contra as proteínas entre 14 e 21 kDa. Em comparação com suas mães, no grupo de crianças infectadas, os autores ainda encontraram uma maior frequência de IgG anti-*T. gondii* contra as proteínas 94 kDa, entre 92 e 66 kDa, entre 66 e 45 kDa, entre 45 e 31kDa e entre 31 e 21kDa. Nossos resultados não diferem dos obtidos por estes autores em relação às proteínas reconhecidas com maior frequência nas amostras de crianças com toxoplasmose congênita. Porém, em relação às proteínas reconhecidas por amostras de crianças

não infectadas, os resultados foram discordantes dos autores citados, uma vez que anticorpos presentes nestas amostras reconheceram proteínas de baixo e elevado PM.

As diferenças no PM das proteínas reconhecidas podem ser explicadas por diferentes condições metodológicas. Sensini (2006) cita os problemas com a padronização do método WB pelas dificuldades de preparo do antígeno, condições do gel, diluições do soro e fonte de anticorpos secundários. E ainda sugere que a semiautomação do método, com a utilização de um programa de computador para a leitura da intensidade das bandas visualizadas no WB facilitaria a leitura e reprodutibilidade dos resultados.

É possível que em algumas amostras avaliadas, a presença ou ausência de reconhecimento de certas proteínas no WB seja devido a diferenças nas concentrações de anticorpos específicos no soro do recém nascido e da sua mãe (REMINGTON; ARAÚJO; DESMONT, 1985). A diversidade genética entre as cepas de *T. gondii*, que pode ocorrer entre as mães infectadas provenientes de diferentes áreas geográficas, também poderia levar ao reconhecimento de diferentes proteínas nas amostras avaliadas, além do que, o reconhecimento imune dos diferentes antígenos de *T. gondii* pode variar entre os indivíduos; alguns reconhecem múltiplas proteínas, enquanto outros uma única proteína (SUN et al., 2013).

No presente estudo, o WB também foi útil para demonstrar a síntese ativa de IgG anti-*T. gondii* em um caso (Paciente 4). Neste paciente, o título de anticorpos IgG anti-*T. gondii* foi < 1:16 na IFI na 1ª amostra e não aumentou significativamente nas amostras seriadas, atingindo título de 1:64; no entanto, pelo método de WB, foi possível demonstrar a síntese ativa de IgG anti-*T. gondii* que reconheceu as proteínas p22 e p46 que estavam ausentes no soro materno. No mesmo paciente, houve desaparecimento dos anticorpos IgG anti-*T. gondii* detectados pelos métodos de QL e IFI após o tratamento. Até a presente data, esta criança com 3 anos de idade, permanece não reagente para anticorpos IgG anti-*T. gondii* avaliados pela QL e IFI, porém apresenta persistência da positividade no WB.

Sensini (2006) também cita a possibilidade de infecção congênita com IgG e IgM anti-*T.gondii* não reagentes em consequência do tratamento da mãe e do recém nascido para toxoplasmose. Pinon et al. (2001) também citam que o tratamento da criança durante um ano após o nascimento pode causar a negatização dos anticorpos no soro dos pacientes. Porém, na maioria destes casos ocorre a detecção da IgG anti-*T.gondii* logo após a suspensão do tratamento, denominado efeito rebote (PINON et al., 2001; SENSINI, 2006; REMINGTON et al., 2011).

No presente estudo, o Paciente 1 apresentou soronegatividade; porém, voltou a apresentar anticorpos anti-*T.gondii* detectáveis após a suspensão do tratamento. Os Pacientes 4, 6, 8 e 9 persistiram com a soronegatividade para anticorpos anti-*T. gondii* após a suspensão do tratamento.

O Paciente 9 apresentava títulos de IgG anti-*T. gondii* > 1:512.000 na IFI, valores mais elevados que os obtidos na amostra materna. Como foi iniciado o tratamento para toxoplasmose, seus títulos de anticorpos caíram e negativaram nos métodos de IFI e QL após os 12 meses de vida. Este paciente não apresentava IgM anti-*T. gondii* detectável e o resultado do WB foi negativo; portanto, o seu diagnóstico foi possível somente com a positividade na PCR quando detectou-se DNA do parasita em amostra de sangue periférico.

O Paciente 8, que também apresentou resultado não reagente nas reações de IFI e QL para IgG anti-*T. gondii* durante a evolução, apresentou na amostra inicial reatividade no WB contra as proteínas p79, p73, p58, p44, p42, p40, p39, p33, p30, p28, p27, p25, p22, p20, p13, p5 e p2. O Paciente 6 também apresentou anticorpos reagentes e negativou somente na QL na evolução da infecção, persistindo com a IFI reagente em baixos títulos. No início, apresentou reatividade para as proteínas p94, p72, p64, p58, p46, p39, p31, p25, p22, p16 e p11 no WB. Porém, como não havia amostra de soro após os 12 meses de vida destes pacientes, não foi possível demonstrar o desaparecimento dos anticorpos anti-p30. É possível que estes pacientes não reconheçam mais a proteína p30 que está presente no teste de QL, o que justifica a não reatividade neste teste com a evolução da infecção. Nenhum destes pacientes apresentou reatividade contra a p35 nos primeiros meses de vida e poderiam persistir não reativos nas amostras seriadas, também explicando a não detecção de anticorpos pela QL.

Deste modo, ao invés de avaliar somente a persistência dos anticorpos IgG anti-*T. gondii* pela QL que detecta anticorpos somente contra as proteínas p30 e p35, sugere-se que o método de WB seja utilizado na evolução sorológica, uma vez que a criança infectada pode produzir anticorpos contra outras proteínas do parasita e assim permanecer positivo após os 12 meses de vida. Sendo assim, a negativação de anticorpos contra a p30 e p35 por QL pode não excluir a infecção congênita.

Atualmente, o método de WB tem sido relatado com maior positividade que a detecção de IgM anti-*T. gondii* por métodos convencionais. Questionamos se o WB possa ser utilizado como padrão ouro para o diagnóstico da toxoplasmose adquirida na gestação e congênita, porém com associação da pesquisa de IgM e IgG anti *T. gondii* pelo WB. Este procedimento poderia descartar a possibilidade de resultado falso negativo entre alguns lactentes incluídos no grupo controle deste estudo, e que

poderiam apresentar reatividade no WB para detecção de IgM anti-*T. gondii*, aumentando a sensibilidade do método proposto. Estudos futuros poderão avaliar a IgM pelo WB nas amostras da presente coorte de pacientes.

No presente estudo, muitos pacientes foram sintomáticos ao nascimento, pois o ambulatório em que foram atendidos é um centro de referência para toxoplasmose, o que pode não acontecer na prática clínica, pois a maioria das crianças é assintomática ao nascimento (REMINGTON et al., 2011). Deste modo, o achado de sintomas clínicos sugestivos de toxoplasmose congênita aumentou a sensibilidade do diagnóstico desta infecção.

Machado et al. (2010) relataram que os pacientes com IgM reagente pelo método de WB (IgM-WB) apresentaram maior frequência de lesão macular, com risco 1,4 vezes maior de lesão ativa que os pacientes com IgM-WB negativa. Porém, estes autores não encontraram diferença significativa entre a positividade de IgG-WB e a presença de lesão macular. No presente estudo foi avaliada a presença de coriorretinite, sem considerar a lesão em mácula, e não se observou diferença significativa entre a presença de IgG-WB no grupo com coriorretinite em comparação ao grupo sem coriorretinite.

Machado et al. (2010) também avaliaram a associação entre calcificação cerebral e WB positivo (IgG e IgM) e não encontraram diferença significativa entre os grupos. No presente estudo não foi encontrando diferença significativa entre os grupos analisados quanto a estas duas variáveis.

O pequeno número de amostras com WB positivo não permitiu obter resultados robustos em relação a coriorretinite e calcificação cerebral. Portanto, mais estudos são necessários para definir se existem proteínas específicas associadas com lesões oculares e do SNC. É necessário que estudos realizados em indivíduos brasileiros definam estas proteínas, pois as cepas de *T. gondii* que circulam no Brasil têm constituição antigênica diferente das encontradas em outros países, o que também poderia explicar as diferenças encontradas entre a positividade de anticorpos contra diferentes proteínas relatadas (CHUMPITAZI et al., 1995; MACHADO et al., 2010). Além disso é documentado que os pacientes com toxoplasmose congênita no Brasil têm maior frequência de lesão ocular que os da Europa e Estados Unidos da América (GILBERT et al., 2008; CAPOBIANGO et al., 2013).

Conclusões

Os resultados obtidos reforçam a utilidade do método de WB para a avaliação sorológica de pacientes com toxoplasmose congênita, com maior sensibilidade que a detecção de IgM anti-*T. gondii* por QL. Embora não deva ser utilizado isoladamente

para o diagnóstico de toxoplasmose congênita, quando associado à presença de sintomas clínicos compatíveis com toxoplasmose congênita ou com a pesquisa de IgM anti-*T. gondii* ou de PCR para DNA do *T. gondii*, o WB apresenta aumento na sensibilidade. Além disso, o procedimento técnico é de baixa complexidade e custo acessível, o que o torna viável na rotina laboratorial. O inconveniente de ser demorado para o método *in-house* poderia ser reduzido com a padronização de um conjunto de reagentes de fabricação nacional. Portanto, o WB é um método promissor para o diagnóstico de toxoplasmose congênita e merece a continuidade de estudos para melhorar a sua eficácia.

Referências

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Report of Committee on Infectious Diseases. *Toxoplasma gondii* infections (Toxoplasmosis). In: _____ (Ed.). **Red Book**. 28. ed. Illinois: Elk Grove Village, 2009. p. 667-672.

BEVERLEY, J.K.A. A new look at infectious diseases. Toxoplasmosis. **British Medical Journal**, London, v.2, n. 5864, p.475-478, 1973.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. **Atenção à Saúde do Recém-Nascido. Guia para os Profissionais de Saúde: intervenções comuns, icterícia e infecções**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2013. p. 109-122.

CAMARGO, M. E. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 6, n.117-118, 1964.

CAMARGO, M. E. Introdução às técnicas de imunofluorescência. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, Rio de Janeiro, v. 10, p. 143-171, 1973.

CAPOBIANGO, J. D. et al. Congenital toxoplasmosis in a reference center of Paraná, Southern Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Disease**, Salvador, v. 18, n. 4, p. 364-371, 2014.

CHUMPITAZI, B. F. F et al. Diagnosis of congenital toxoplasmosis by immunoblotting and relationship with other methods. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n. 6, p. 1479, 1995.

DUPONT, T. D. et al. Usefulness of Western Blot in serological follow-up of newborns suspected of congenital toxoplasmosis. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Berlin, v. 22, p. 122-125, 2003.

FRENKEL, J. K.; BERMUDEZ, J. E. V. Toxoplasmose. In: VERONESI, R.; FOCACCIA R. **Tratado de Infectologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. v. 2, p. 1633- 1650.

GILBERT, R. et al. Ocular Sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. **PLoS Neglected Tropical Disease**, San Francisco, v.2, n.8, e.277, p.1-7, 2008.

GROSS, U. et al. Comparative Immunoglobulin G Antibody Profiles between Mother and Child (CGMC Test) for Early Diagnosis of Congenital toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 10, p. 3619-3622, 2000.

HOMAN, W. L. et al. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 30, p. 69-75, 2000.

LAGO, E. G.; OLIVEIRA A.P.; BENDER, A.L. Presence and duration of anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulin M in infants with congenital toxoplasmosis. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 90, n. 4, p. 363-369, 2014.

LAGO, E. G., et al. Congenital toxoplasmosis: late pregnancy infections detected by neonatal screening and maternal serological testing at delivery. **Paediatric and Perinatology Epidemiology**, Boston, v. 21, p. 525-531, 2007.

LEBECH, M. et al. Feasibility of neonatal screening for toxoplasma infection in the absence of prenatal treatment. **Lancet** , London, v. 353, p. 1834-1837, 1999.

LEBECH, M. et al. Classification system and case definitions of *Toxoplasma* infection in immunocompetent pregnant women and their congenitally infected offspring. **European Journal clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Berlin, v. 15, n. 10, p. 799-805, 1996.

L'OLLIVIER, C. et al. Comparison of Mother and Child Antibodies that Target High-Molecular-Mass *Toxoplasma gondii* Antigens by Immunoblotting Improves Neonatal

Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 19, n. 8, p. 1326-1328, 2012.

LUNDÉN, A. Immune responses in sheep after immunization with *Toxoplasma gondii* antigens incorporated into iscoms. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 56, p. 23-35, 1995.

MACHADO, A. S. et al. IgG and IgM western blot assay for diagnosis of congenital toxoplasmosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 6, p. 757-761, 2010.

MAGI, B.; MIGLIORINI, L. Western blotting for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. **The New Microbiologica**, Pavia, v. 34, p. 93-95, 201.

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

REMINGTON, J. S.; ARAÚJO F. G., DESMONTS G. Recognition of different *Toxoplasma* antigens by IgM and IgG antibodies in mothers and their congenitally infected newborns. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 152, n. 5, p. 1020-1024, 1985.

REMINGTON, J. S.; THULLIEZ P.; MONTOYA J. G. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, p. 941-945, 2004.

REMINGTON, J. S. et al. Toxoplasmosis. In: _____ (Ed.). **Infections Diseases of the Fetus and Newborn Infant**. 7. ed. Philadelphia: Elsevier-Saunders, 2011. p. 918-1041.

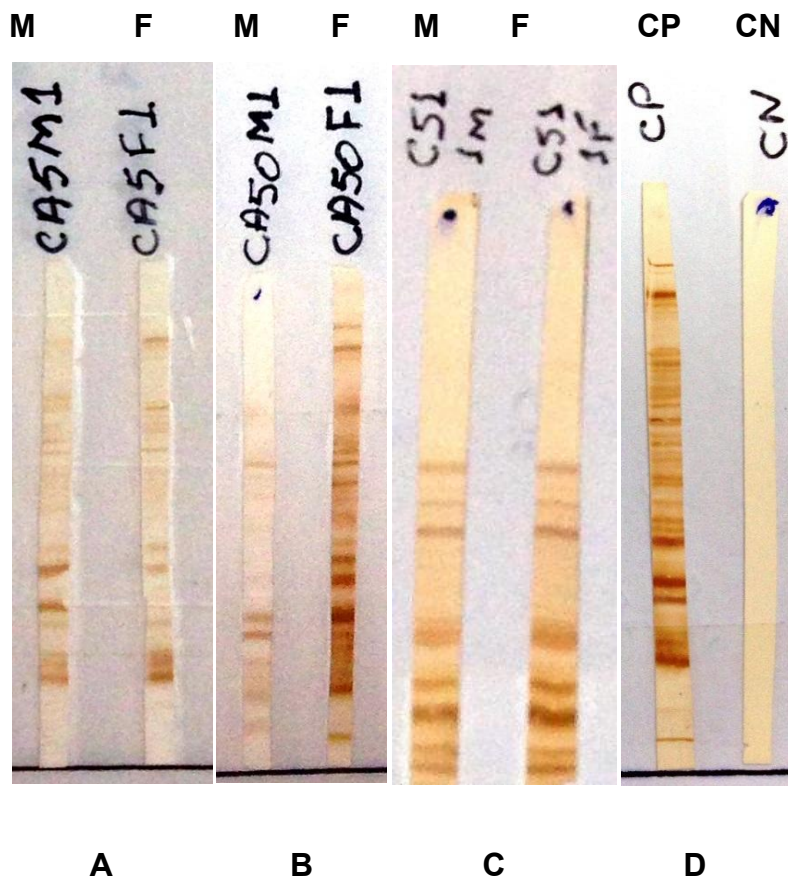
RILLING, V. et al. Evaluation of a Commercial IgG/IgM Western Blot Assay for Early Postnatal Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis. **European Journal of Clinical Microbiology Infectious Disease**, Berlin, v. 22, p.174-180, 2003.

RODRIGUES, L. M. X. et al. Congenital toxoplasmosis: evaluation of serological methods for detection of anti-*Toxoplasma gondii* IgM and IgA antibodies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, p. 434-440, 2009.

SENSINI, A. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy: opportunities and pitfalls of serological diagnosis. **Clinical Microbiology Infectious**, London, v. 12, p. 504-512, 2006.

SUN, X. et al. A comparative study of *Toxoplasma gondii* seroprevalence in three healthy Chinese populations detected using native and recombinant antigens. **Parasites & Vectors**, London, v. 6, n. 241, 7p., 2013.

Figura 1 Padrão de reconhecimento de proteínas do *Toxoplasma gondii* cepa RH, pelo método de *Western Blot* (WB) realizado com amostras de soro de mães com toxoplasmose adquirida na gestação e de suas crianças com toxoplasmose congênita



M: mães; F: filhos

A – WB positivo: Bandas iguais visualizadas com maior intensidade em amostra da criança em comparação com amostra materna

B – WB positivo: Bandas diferentes visualizadas com amostra da criança em comparação com a amostra materna

C – WB negativo: Bandas iguais visualizadas com amostras da criança e da mãe

D – CP: controle positivo; CN: controle negativo

Figura 2 Distribuição das proteínas do *Toxoplasma gondii* mais frequentemente reconhecidas pelos anticorpos IgG presentes no soro das crianças com toxoplasmose congênita e das crianças sem a doença ($p > 0,05$ para todas as proteínas reconhecidas)

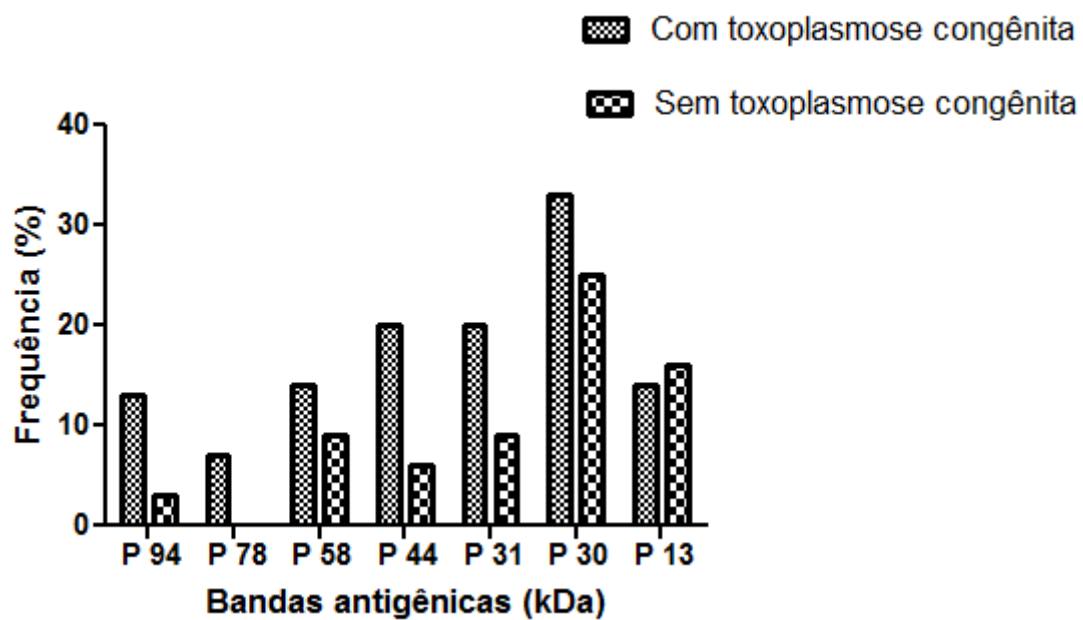


Tabela 1. Caracterização clínica e laboratorial de 15 crianças com toxoplasmose congênita atendidas em Londrina, Paraná, Brasil, no período de junho de 2011 a junho de 2014

Caso	IgM anti- <i>T. Gondii</i>	PCR	IgG 1ª amostra*		IgG seguimento**	Western Blot**	Sinais e sintomas clínicos no 1º mês de vida
			IFI	QL			
1	Neg	NR	1:512.000	NR	↓	Neg	coriorretinite+ calcificação+ hidrocefalia
2	Pos	NR	1:32.000	926,8	↑	Pos	coriorretinite+ calcificação
3	Pos	NR	1:512.000	NR	↓	Pos	vitreíte (depois coriorretinite)+calcificação + hidrocefalia
4	Neg	NR	<1:16	NR	↑	Pos	coriorretinite
5	Neg	NR	1:1024	162,0	↔	Pos	calcificação
6	Neg	Pos	NR	200,0	↑	Pos	assintomático
7	Neg	Pos	1:32.000	147,5	NR	Neg	hidrocefalia
8	Neg	Neg	1:8.000	312,0	↑	Neg	assintomático

Caso	IgM anti- <i>T. Gondii</i>	PCR	IgG 1ª amostra*		IgG seguimento**	Western Blot**	Sinais e sintomas clínicos no 1º mês de vida
			IFI	QL			
9	Neg	Pos	1:512.000	175,6	↓	Neg	assintomático
10	Pos	Pos	1:512.000	188,1	↓	Pos	coriorretinite
11	Neg	Pos	1:32.000	139,8	NR	Pos	calcificação
12	Pos	Neg	NR	84,8	↑	Neg	vitreíte + calcificação
13	Pos	NR	NR	200,0	NR	Pos	coriorretinite+ calcificação
14	Neg	NR	NR	173,9	↓	Pos	coriorretinite+ calcificação+ hidrocefalia
15	Pos	NR	NR	1655,0	↓	Neg	coriorretinite+ calcificação

PCR: reação em cadeia da polimerase para detecção do DNA do *Toxoplasma gondii*; IFI: imunofluorescência indireta para detecção de IgG anti-*T. gondii*; QL: imunoensaio de micropartícula por quimioluminescência para detecção de IgG anti-*T. gondii*, expressa em UI/mL; Pos: positivo; Neg: negativo; NR: não realizado; ↑: aumento dos níveis de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em amostras de soro seriadas; ↔: persistência dos níveis de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em amostras de soro durante o seguimento; ↓: declínio dos anticorpos; *amostra coletada no 1º mês de vida; **amostra coletada até o 3º mês de vida, com todas as crianças em tratamento.

Tabela 2 Frequência das proteínas do *Toxoplasma gondii* reconhecidas por anticorpos pelo método de Western Blot presentes em amostras de crianças com toxoplasmose congênita e sem infecção congênita e ausentes em suas respectivas mães, atendidos em Londrina, Paraná, no período de 2011-2014

proteína (kDa)	Com toxoplasmose congênita (n=9)		Sem toxoplasmose congênita (n=18)	
	n	%	n	%
	94	2	22,2	-
84	-	-	3	16,7
81	1	11,1	-	-
78	1	11,1	-	-
74	1	11,1	-	-
72	-	-	4	22,2
71	1	11,1	-	-
64	1	11,1	-	-
59	1	11,1	-	-
58	2	22,2	-	-
47	-	-	3	16,7
44	3	33,3	2	11,1
38	1	11,1	-	-
37	-	-	4	22,2
36	1	11,1	-	-
32	-	-	6	33,3
31	3	33,3	-	-
30	5	55,5	-	-
27	-	-	3	16,7
13	2	22,2	-	-
8	-	-	4	22,2
6	-	-	4	22,2
3	1	11,1	-	-

Tabela 3 Sensibilidade e especificidade do método de *Western Blot* para detecção de IgG anti-*Toxoplasma gondii* e dos testes IgM anti-*Toxoplasma gondii*, de reação em cadeia da polimerase (PCR) para *Toxoplasma gondii* e da presença dos sintomas clínicos compatíveis com toxoplasmose congênita, avaliados em série e em paralelo, segundo a presença ou ausência de toxoplasmose congênita

Teste	Sensibilidade	Especificidade
WB +	60,0%	43,7%
IgM <i>T. gondii</i> +	40,0%	100,0%
IgM anti- <i>T. gondii</i> ou WB +	76,0%	43,7%
IgM anti- <i>T. gondii</i> e WB +	24,0%	100,0%
PCR +	71,7%	100,0%
PCR + ou WB +	89,1%	43,7%
PCR + e WB +	42,6%	100,0%
Clínica +	80,0%	100,0%
Clínica + ou WB +	92,0%	43,7%
Clínica + e WB +	48,0%	100,0%

WB: Western Blot para diagnóstico de infecção congênita;

IgM anti-*Toxoplasma gondii* detectada por quimioluminescência;

PCR: reação em cadeia de polimerase;

Clínica+: presença de sintomas e/ou sinais clínicos compatíveis com toxoplasmose congênita;

+: teste positivo.

Artigo 4

Evaluation of Recombinant Rhostry Protein 2 Enzyme-linked Immunoassay (ELISA-rROP2) for Diagnosis of Toxoplasmosis Acquired During Pregnancy.

Jaqueline Dario Capobianco¹, Sthefany Pagliari², Aline Kuhn Sbruzzi Pasquali², Beatriz Nino², Fernanda Pinto Ferreira³, Thaís Cabral Monica², Nely Norder Tschurtschenthaler⁴, Italmar Teodorico Navarro⁵, João Luis Garcia⁵, Regina Mitsuka-Breganó⁶ Edna Maria Vissoci Reiche⁷

¹Departamento de Pediatria e Cirurgia Pediátrica, Centro de Ciências em Saúde, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná, Brasil;

²Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências Agrárias, UEL, Londrina, Paraná, Brasil.

³Laboratório de Zoonoses e Saúde Pública, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, UEL, Londrina, Paraná, Brasil.

⁴Secretaria de Saúde do Município de Cascavel, Cascavel, Paraná;

⁵Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, UEL, Londrina, Paraná, Brasil.

⁶Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, UEL, Londrina, Paraná, Brasil.

⁷Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, UEL, Londrina, Paraná, Brasil.

Corresponding author: Jaqueline Dario Capobianco, Departamento de Pediatria e Cirurgia Pediátrica, Centro de Ciências em Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil. Av. Robert Koch, 60, Vila Operária, CEP 86038-440, Fone: (43) 3371-2353; FAX: (43) 3371-2715; email: jaquedc@uel.br.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the detection of IgG anti- *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) using the enzyme-linked immunoassay with recombinant rhoptry protein 2 (ROP2) as antigen (ELISA-rROP2) in samples from pregnant women. The study included 236 samples, divided in groups according to their serological screening profile for toxoplasmosis: susceptible (n=65), acute infection (n= 48), infection for more than 4 months (n =58), and exposed to the parasite (n=65). When the indirect immunofluorescence assay (IFI) for IgG anti-*T. gondii* was considered as gold standard, ELISA-rROP2 presented sensitivity of 61.8 % [confidence interval (CI) 95% 54.0-69.1], specificity of 62.8% (CI 95% 51.7-73.0), predictive positive value of 76.6% (CI 95% 68.7-83.4), predictive negative value of 45.4% (IC 95% 36.2-54.8), and kappa index 0.224 (p= 0.0002). Considering the chemiluminescence (CML) for IgM anti-*T.gondii* with reactivity and low avidity of IgG anti-*T. gondii* (acute infection) and CML IgM anti-*T. gondii* nonreactive (exposed) as gold-standard, the ELISA-ROP2 was reactive in 30/48 (62.5%) pregnant with acute infection and 26/65 (40.0%) with previous exposition (p= 0.0180). The results underscored that *T. gondii* ROP2 is recognized by IgG antibodies presented in both acute and chronic phases of the toxoplasmosis during pregnancy, limiting its use to distinguish the phases of the infection.

Keywords: Toxoplasmosis, Congenital Toxoplasmosis, Pregnancy, Rhoptry Protein ROP2, Recombinant Proteins, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.

INTRODUCTION

The clinical diagnosis of toxoplasmosis is difficult because there are few signs and symptoms and, if present, they are inespecific, mimicking those of other infectious diseases. Therefore, serological methods are still an important tool for the diagnosis of the disease. Prevention and treatment of toxoplasmosis are possible when sensitive and specific methods are used for detection of *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) infection (Montoya et al. 2010, Remington et al. 2011). The IgM antibodies are not an accurate marker of the acute phase of infection and low IgG avidity index not always confirms acute infection due to delayed antibody maturation in some infected individuals (Kotresha & Noordin 2010). Therefore, it is necessary the development of methods with antigens that are adequate and can be produced in large quantity for the diagnosis of toxoplasmosis in pregnant women and their children (Wu et al. 2009).

T. gondii belongs to the protozoan phylum Apicomplexa that includes *Plasmodium* sp., *Cryptosporidium* sp., *Neospora caninum*, and *Eimeria* sp. These parasites have in common the presence of an apical complex with the secretory organelles, micronemes, rhoptries (ROPs), and dense granules (GRAs) that are involved in host-cell invasion. (Hajj et al. 2006). Therefore, several genes have been cloned and expressed to produce recombinant proteins, such as surface antigens (SAGs), ROPs, and GRAs, which are presented in *T. gondii* tachyzoite and bradyzoite (Kotresha & Noordin 2010). *T. gondii* tachyzoites possess a bundle of 8–12 ROPs (Dubremetz 2007) and ROP2, ROP4, and ROP7 are the major protein members identified of the ROPs family highly specific to *T. gondii*. ROP2 and ROP4 have been shown to be also expressed both in bradyzoites and sporozoites (Hajj et al. 2006).

ROPs contain two sets of proteins segregated either in the neck (rhoptry neck proteins) that are involved in the initial steps of invasion, or in the posterior bulb (rhoptry bulb proteins) involved in later stages of invasion (Bradley et al. 2005, Dubremetz 2007). The ROP2 protein is involved in the formation of parasitophorous membranes during parasite invasion (Besteiro et al. 2011, Dubremetz 2007).

Therefore, the use of ROP2 protein for the diagnosis of the toxoplasmosis at different stages of the infection has been evaluated in pregnant women. The aim of this study was to evaluate an indirect enzyme-linked immunosay (ELISA) with recombinant ROP2 (rROP2) of *T. gondii* as antigen to detect IgG in serum samples from pregnant women, and also to compare the levels of IgG using the ELISA-rROP2 with those obtained using the conventional serological methods for the toxoplasmosis diagnosis in these patients.

MATERIALS AND METHODS

Subjects and serum samples - The study included 236 serum samples from pregnant women that were evaluated during the routine laboratorial screening of prenatal care within the "Surveillance Program Gestational and Congenital Toxoplasmosis of Health" of pregnant suspected of acute toxoplasmosis (Lopes-Mori et al 2011). The samples were from two cities, Londrina and Cascavel, Paraná State, Southern Brazil.

The protocol of this study was approved by the Institutional Research Ethic Committee of the University of Londrina, Paraná State, Southern Brazil (CEP n. 043/2011).

The sample size was determined considering the expected proportion of 50.0% infected pregnant women, with confidence interval (CI) of 95.0%, and a total range of the CI of 0.25, the number of samples required was 61 for each group analyzed. If the

total extent of the CI was 0.30, the number of samples required was 43 (Hulley et al. 2006).

Sample groups - The 236 samples included in the study were divided in groups according to their serological profile obtained in the conventional serological, as follow: Group A: 65 samples from susceptible pregnant with nonreactive IgG and IgM anti-*T. gondii*; Group B: 48 samples from pregnant with acute infection with seroreactivity to IgG and IgM anti *T.gondi*, and IgG with low or intermediate avidity; Group C: 58 samples from pregnant with infection for more than 4 months, with seroreactivity to IgG and IgM anti-*T. gondii* and IgG with high avidity; Group I: 65 samples from pregnant previously exposed to the parasite, reactive to IgG and nonreactive to IgM anti-*T. gondii*.

Serological tests for toxoplasmosis diagnosis - Prenatal serological screening was performed by the determination of IgG anti-*T. gondii* antibodies using indirect immunofluorescence (IFI) with the parasite fixed in slides (IMUNO-COM®, WAMA Diagnóstica, Brazil) with the initial serum dilution of 1:16 (Camargo 1973). Value < 1:16 was considered susceptible and \geq 1:16 was considered exposed or immune to the parasite. The IgG anti-*T. gondii* was also evaluated using immunoassay of microparticles by chemiluminescence (CML) (Architect®, System Abbott, Wiesbaden, Germany) and expressed as IU/mL. The presence of anti-*T. gondii* IgM was evaluated using CML (Architect®, System Abbott, Wiesbaden, Germany) e and the values were expressed as reactive and non reactive. Samples with concomitant reactivity for IgG and IgM anti-*T. gondii* in these methods were assayed to evaluate the IgG avidity using CML (Architect®, System Abbott, Wiesbaden, Germany) and was expressed as low, intermediate, or high avidity.

Obtention of rROP2 antigen - The rROP2 antigen was prepared as previously described (IGARASHI et al., 2008). Briefly, a 1103 base-pair (bp) (segment nt 1022-2125, fragment 196-561 (Martin et al. 1998, Nigro et al. 2001) of the *ROP2* gene (Genbank Accession No. Z36906) were expressed in *Escherichia coli* (*E. coli*), and the rROP2 with about 47 kDa obtained was evaluated using the sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The protein concentration was determined using the Lowry method (Lowry et al. 1951) and resulted in 2.5 µg/mL.

ELISA rROP2 for detecting IgG anti-T. gondii - To detect IgG antibodies against *T. gondii*, ELISA with rROP2 as antigen was performed according to previously described (IGARASHI et al, 2008), with some modifications. Optimal ELISA conditions were determined using checkerboard titrations with different dilutions of sera samples, rROP2 antigen, and peroxidase goat anti-human IgG conjugate. Briefly, microplates (Nunc-Immuno Plate, MaxiSorp, Denmark) were coated with rROP2 antigen (2.5µg/mL) diluted in 0.1M carbonate buffer (pH 9.6) by incubation overnight at 4° C. The plates were washed three times with PBS-T (0.05% Tween 20, pH 7.4). The free sites were blocked with 8% non-fat milk in PBS-T by incubation for 1 h at 37°C. The microplates were washed as described above and 100 µL of positive and negative controls and the serum samples of all groups of the study were applied in duplicate to each well, diluted at 1:200 in PBS-T 5% non-fat milk and incubated for 1h at 37° C. After the washing, 100 µL of peroxidase goat anti-human IgG diluted at 1:20.000 in PBS-T 5% non-fat milk were added to each well. After the incubation for 1h at 37°C, the microplates were washed tree times and the assay was developed by adding 100 µL chromogenic substrate (40 mg ortho-phenylenediamine/100 mL of 0.1 M phosphate citrate buffer, pH 6.0 and 40 µL of H₂O₂). After 15 min, the reaction was stopped with

50 μ L of 1 N HCl. The optical density (OD) was read at 450 and 620 nm using a microplate reader (Spectra II Microplate Reader, Tecan, (Tecan Group, Mannedorf, Switzerland). Positive and negative control sera were included on every microplate. All samples were run in duplicate and the results were presented as mean OD values. The cut-off values were expressed as the mean OD of negative sera (six for of each microplate) plus two standard deviations (SD) (Pagliari 2013, Gatkowska et al. 2010). A sample was considered positive when the ratio sample/ cut-off was ≥ 1.0 (Gatkowska et al. 2010).

Determination of the specificity of ELISA-rROP2 - Twenty one serum samples from patients with unrelated infections, diagnosed with other diseases, such as Chagas' disease (n=4), syphilis (n=2), paracoccidioidomycosis (n=2), autoimmune diseases with seropositivity for antinuclear antibody (ANA, n=4), and for double-stranded DNA (anti-DNAs, n=4), human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection (n=4), and leishmaniosis (n= 1). This group was used to evaluate the cross-reactivity with the rROP2 antigen. All these samples showed no seropositivity for IgG and IgM anti-*T. gondii* by conventional serological methods used in routine to toxoplasmosis, such as IFI and CML.

Statistical Analysis - A database was created in Microsoft Office Excell 2007 ad Epi Info 3.4 programs. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA) and SPSS 15.0 programs. Categorical variables were expressed as absolute number (n) and percentage (%) and were analyzed using chi-square or Fisher Exact test, when appropriate. Continuous variables were expressed as median and interquartile range (IQR) of 25% and 75%. For the analysis of continuous variables with three groups, such as the comparison of antibody levels between the

groups of samples, the Kruskal Wallis test was used. Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) were determined for all the serological methods performed. To assess the concordance between the results obtained in ELISA-rROP2, IFI and CML methods, the kappa index was determined. The p values <0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

This study included a total 257 serum samples, from 236 pregnant women and 21 serum samples of patients with other diseases. The age of the pregnant ranged from 12 to 48 years, median 26 years, IQR (25 and 75%) of 21 and 32 years, respectively.

The 21 samples characterized that were nonreactive for IgG anti *T. gondii* using serological methods employed in the laboratory screening and reactive for other unrelated diseases also showed no reactivity for IgG in the ELISA-rROP2.

The comparison of the reactivity of IgG anti-*T. gondii* obtained from the total samples when they were assayed using the IFI, CML, and ELISA-rROP2 is shown in Tables 1 and 2.

The analysis of sensitivity and specificity of the ELISA-rROP2 in comparison with CML and with IFI for IgG anti-*T. gondii* in samples from pregnant women with acute infection (group B), with infection for more than 4 months (group C), and previously exposed (group I) is shown in Tables 3 and 4.

Using the CML method as the gold standard, positive ELISA-rROP2 was present in 30/48 (62.5%) pregnant women with acute infection (Group B) and in 26/65 (40.0%) pregnant women previously exposed (Group I) (p= 0.0180). The frequency of IgG reactivity using ELISA-rROP2 in the other groups of pregnant women was also evaluated. Among the susceptible pregnant women (Group A) seropositivity was

observed in 32/65 (49.2%) patients, and for those with infection for more than 4 months (Group C), the seropositivity was observed in 50/58 (86.2%).

The levels of IgG anti-*T. gondii* obtained using ELISA-rROP2 demonstrated a significant difference between the samples of the group A (susceptible) vs C (infection for more than 4 months) ($p < 0.0001$), samples of the group B (acute infection) vs group C ($p < 0.0001$), and between the group C vs group I (previously exposed) ($p < 0.0001$) (Figure 1).

DISCUSSION

The use of recombinant proteins is an alternative source of antigens for diagnosis of toxoplasmosis, because it is not necessary to use the *T. gondii* obtained in animal models or *in vitro* culture, which are expensive, laborious, time-consuming and can be hazardous to laboratory staff. The ROP2 antigen has been shown in tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites (Van Gelder et al. 1993) and is one of the antigens of *T. gondii* that has been expressed by vectors to produce recombinant proteins. This parasite protein is efficient to promote humoral and cell immune-mediated responses in the infected host. Therefore, it may be used for diagnosis and vaccination against toxoplasmosis. The antigen rROP2 expressed in *E. coli* is able to detect IgA, IgM, and IgG anti-*T. gondii* antibodies in human toxoplasmosis (Chang et al. 2011).

An adequate selection of recombinant antigens may also be used in serological tests for differentiating recently acquired infections from those acquired in the past. The definition of the stage of toxoplasmosis infection on pregnant women during the prenatal health care is very important to guide the medical conduct (Buffolano et al. 2005, Martin et al. 1998, Wu et al. 2009).

An *E. coli*-expressed rROP2 was used in the ELISA to detect specific IgG anti-*T. gondii* antibodies in infected patients and this procedure was able to detect reactivity to IgG in 89.0% of serum samples from patients with acute toxoplasmosis and in 78.0% of samples from those with chronic infection (Van Gelder et al., 1993). As the present study, these authors did not evaluate IgM anti *T.gondii* by ELISA-rROP2.

In samples from pregnant women of the present study, the ELISA-rROP2 showed the highest positivity for the group with infection for more than 4 months, followed by groups B and I. This result demonstrates that the reactivity in the ELISA-rROP2 for IgG may be present in acute infection during pregnancy, consistent with Van Gelder and others (1993). Moreover, the results are consistent with Martin et al (1998) reporting that rROP2 antigen induces a humoral immune response involving both markers of acute phase, IgM and IgA, as well as IgG, considered marker either of acute or chronic stages of the infection. Martin and others (1998) evaluated samples from Brazilians and Argentines and detected 62.1% of the reactivity of IgM anti-*T. gondii* using an immunoglobulin-M immunosorbent agglutination assay (ISAGA) and ROP2 as antigen. These authors showed sensitivity of 91.0% in detecting IgG and the reactivity was higher among the groups of patients with acute infection (97.6%) compared to the group of chronic infection (82.8%), and they concluded that the antigen ROP2 is recognized by antibodies presented in both chronic and acute infections.

Macre et al (2009) evaluated the IgG anti *T. gondii* by ELISA-rROP2 in Brazilian pregnant women with acute infection. Using the conventional ELISA for IgG detection as the gold standard, they found excellent concordance between the two methods, with sensitivity of 87.0%, specificity of 88.0%, PPV of 98.0%, and NPV of 43.0% for the ELISA-rROP2. However, when this test was used to investigate the

avidity of IgG anti-rROP2, these authors did not obtain good sensitivity and accuracy; moreover, they reported that this antigen exhibited good stability to be assessed by immunoblotting assay when stored at -70 °C.

In a previous study, it has been already demonstrated in our laboratory the low sensitivity and specificity of ELISA-rROP2 to detect IgG in samples from individuals with acute and chronic toxoplasmosis. The detection of IgM anti-rROP2 could increase the sensitivity of this method for the diagnosis of acute infection (Pagliari 2013)

Serum samples from patients with other diseases did not present reactivity to the ELISA-rROP2. These data are partially in agreement with previous study (Martin et al. 1998), who showed low reactivity of the ELISA-rROP2 in samples of both patients seronegative for toxoplasmosis and for other diseases, demonstrating 100.0% of specificity. However, the samples of group A assessed in the present study showed low specificity, which can be explained, in part, because the genetic diversity of the host immune response with no recognition of some antigens by commercial tests. Actually, some samples could be considered with false negative results by commercial tests. Other explanations could be due the individuals might be recently infected by *T. gondii* at the sample time collection (Sun et al. 2013), and the variability of the rROP2 protein lots obtained in different days. All the samples of patients with other diseases were evaluated in the same day and using on unique lot of rROP2.

Several serologic commercial tests that are available for the diagnosis of *T. gondii* infection are based on the use of whole extracts of tachyzoites, as IFI, which contains a lot of proteins that can influence the result of the test. Some authors have described pseudopositivity concordance by these tests, with higher positivity when compared to Western Blot (Wu et al. 2009).

The rROP2 was evaluated using Western Blot with human *T. gondii* seropositive and seronegative samples, and samples from patients diagnosed with amebiasis, cysticercosis, filariasis, malaria, and toxocariasis (Chang et al. 2011). These authors showed sensitivity of 90.0% and specificity of 95.0% with rROP2 for diagnosis of toxoplasmosis. However, it was a better antigen for detection of IgG (91.7%) rather than IgM (80.0%) (Chang et al. 2011). In the present study, the Western Blot was not evaluated, which could show different sensitivity and specificity compared to ELISA-rROP2.

The use of recombinant antigens to detect IgG anti-*T. gondii* ELISA shows more sensitivity than native parasite antigens, such as *T. gondii* tachyzoites of RH and ME49 strains. However, due to the genetic diversity of the *T. gondii* isolates, it is necessary a method that can detect most of the different specific antibodies (Sun et al. 2013).

Aubert et al. (2000) evaluated the diagnostic utility of eleven *T. gondii* recombinant antigens to detect IgG and IgM using the ELISA and they showed that rROP2 was recognized by 58.0% of serum samples from individuals with chronic infection and by 80.0% of serum samples from individuals with potential acute infection. A combination of three recombinant antigens to detect IgG using ELISA (p29, p30, and p35) and three recombinant antigens to detect IgM using ELISA (p29, p35, and p66) improved the sensitivity from 93.1% to 98.4% (Aubert et al. 2000).

Other recombinant ROPs have been evaluated, such as rROP8 antigen expressed in *E. coli* that presented 94.0% of specificity and 90.0% of sensitivity for early acute toxoplasmosis, 92.0% for acute, and 82.0% for chronic infections (Sonaimuthu et al. 2014).

The antigen SAG1 (major surface antigen) is used in some commercially available tests, because it exhibits high antigenicity and immunogenicity (Gatkowska et al. 2010). Therefore, the combination of ROP proteins with other *T. gondii* antigens, such as SAG1, may improve their performance. The use of a single antigen in the ELISA may fail to recognize all the positive samples, and a probable explanation for this false negative result could be that some infected individuals may not produce an antibody response against the epitopes present on this recombinant antigen. This fact suggests that the combination of different antigens in the same test may be a better approach than single antigen (Gatkowska et al. 2010, Aubert et al. 2000, Van Gelder et al. 1993).

However, Van Gelder et al. (1993) explained that their recombinant antigen was unable to detect antibodies in about 10.0% of infected individuals, because the 53 to 54 kDa ROP2 antigen delays to make IgG response, suggesting that the antibodies against this antigen are more present at a chronic stage of infection. In the very early stage of toxoplasmosis, antibodies against the ROP2 antigen are not yet detectable. In the present study, we also found positivity at acute and chronic stages of infection, with the same specificity in the both groups. But, we detected higher sensitivity and NPV for the groups with acute infection (B) and infection with more than 4 months (C).

Moreover, false negative results could be due the variation in the procedures to obtain the rROP2, which can compromise the stability and the conformational structure of epitopes, leading to non-recognition by the specific antibodies (Gatkowska et al. 2010).

The false positive results obtained in the samples of susceptible pregnant may be explained by the presence of protein fractions not belonging to the rROP2 protein that

were viewed using the SDS-PAGE after the step of purification of this protein. This result underscores the need to improve the purification procedure to provide greater purity for this antigen than the used in the current study. This procedure may reduce the noise level obtained of negative controls in the spectrophotometric lectures of the rELISA-ROP2 microplates, as reported by Pagliari (2013).

The expression of rROP2 as a recombinant protein in *E. coli* is not an easy task. The production of the rROP2 protein has shown low expression and solubilization techniques have generated high degree of protein degradation (Van Gelder et al. 1993). Authors describes low levels of expression or degradation and solubility problems, but they have obtained high levels of expression in bacteria growing broth (Nigro et al. 2001). We encountered some difficulties to obtain the expression and maintenance of the stability of rROP2 protein that can be attributed to the rROP2 sensitivity to host proteases. The rROP2 obtained in the present study showed low level of expression and was always found in the insoluble fraction. High degradability was observed in the expression and purification stages, and also during storage of this protein (Pagliari 2013), which may have contributed to the decreased reactivity of the test. A yeast expression system that allowed a production of recombinant antigen in large scale, with easily and fast growth and inexpensive media was previously used (Chang et al. 2011).

The ELISA rROP was not assessed to detect IgM antibodies in the sample groups that may improve the results for the performance of this test for the diagnosis of acute toxoplasmosis in pregnant women.

Taken together, the results underscore that rROP2 can be recognized by antibodies present in samples from patients with both acute and chronic phases of *T. gondii* infection, but the sensitivity of ELISA-rROP2 was higher between the pregnant

women with acute infection, mainly among those with high avidity of IgG. Therefore, the combination of rROP2 with other recombinant antigens should be investigated to differentiate the phases of toxoplasmosis in pregnant women.

ACKNOWLEDGEMENTS

The program of Health Surveillance of Gestational and Congenital Toxoplasmosis had financial support from the Health Department of the State of Paraná, Department of Science and Technology of the State of Paraná and Araucaria Foundation and from CNPq.

REFERENCES

- Aubert D, Maine GT, Villena I, Hunt JC, Howard L, Sheu M, Brojanac S, Chovan LE, Nowlan SF, Pinon JM 2000. Recombinant antigens to detect *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G and immunoglobulin M in human sera by enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 38: 1144–1150.
- Besteiro S, Dubremetz JF, Lebrun M 2011. The moving junction of apicomplexan parasites: a key structure for invasion. *Cell Microbiol* 13 (6): 797–805.
- Bradley PJ, Ward C, Cheng SJ, Alexander DL, Coller S, Coombs GH, Dunn JD, Ferguson DJ, Sanderson SJ, Wastling JM, Boothroyd JC 2005. Proteomic analysis of rhoptry organelles reveals many novel constituents for host–parasite interactions in *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* 280: 34245–34258.
- Buffolano W, Beghetto E, Del Pezzo M, Spadoni A, Di Cristina M, Petersen E, Gargano N 2005. Use of recombinant antigens for early postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 43: 5916–5924.
- Camargo ME 1973. Introdução às técnicas de imunofluorescência. *Rev Bras Patol Clín* 10: 143-171.

- Chang PY, Fong MY, Nissapatorn V, Lau YL 2011. Evaluation of *Pichia pastoris* expressed recombinant Rhoptry protein 2 of *Toxoplasma gondii* for its application in diagnosis of toxoplasmosis. *Am J Trop Med Hyg* 85: 485–489.
- Dubremetz JF 2007. Rhoptries are major players in *Toxoplasma gondii* invasion and host cell interaction. *Cell Microbiol* 9: 841–848.
- Gatkowska J, Dziadek B, Brzostek A, Dziadek J, Dzitko K, Dlugonska H 2010. Determination of diagnostic value of *Toxoplasma gondii* recombinant ROP2 and ROP4 antigens in mouse experimental model. *Pol J Microbiol* 59: 137-141.
- Hajj HE, Demey E, Poncet J, Lebrun M, Wu B, Galéotti N, Fourmaux MN, Mercereau-Puijalon O, Vial H, Labesse G, Dubremetz JF 2006. The ROP2 family of *Toxoplasma gondii* rhoptry proteins: Proteomic and genomic characterization and molecular modeling. *Proteomics* 6: 5773-5784.
- Hulley SB, Cummings SR, Browner WS, Grady D, Hearst N, Newman TB 2006. *Delineando a pesquisa clínica. Uma abordagem epidemiológica*, 2a ed., Artmed, Porto Alegre, p93, p.110.
- Igarashi M, Kano F, Tamekuni K, Machado RZ, Navarro IT, Vidotto O, Vidotto MC, Garcia JL 2008. *Toxoplasma gondii*: Evaluation of an intranasal vaccine using recombinant proteins against brain cyst formation in BALB/c mice. *Exp Parasitol* 118: 386–392.
- Kotresha D, Noordin R 2010. Recombinant proteins in the diagnosis of toxoplasmosis. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 118: 529-542.
- Lopes-Mori FMR, Mitsuka-Breganó R, Capobiango JD, Inoue IN, Reiche EMV, Morimoto HK, Casella AMB, Bittencourt LHFB, Freire RL, Navarro IT 2011. Programs for control of congenital toxoplasmosis. *Rev Assoc Med Bras* 57: 581-586.

- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: p. 265-275.
- Macre MS, Pires M, Meirelles LR, Angel SO, Andrade HF 2009. Serology using rROP2 antigen in the diagnostic of toxoplasmosis in pregnant women. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 51: 283-288.
- Martin V , Arcavi M , Santillan G , Amendoeira MR , Souza-Neves E , Griemberg G , Guarnera E , Garberi JC , Angel SO 1998. Detection of human *Toxoplasma* -specific immunoglobulins A, M, and G with a recombinant *Toxoplasma gondii* rop2 protein. *Clin Diagn Lab Immunol* 5: 627 – 631.
- Montoya JG, Boothroyd JC, Kovacs JA 2010. *Toxoplasma gondii*. In GL Mandell, JE Bennett, R Dollin (eds.), *Mandell, Douglas & Bennett's. Principles and Practice of Infectious Diseases*, 7th ed., Churchill Livingstone, Philadelphia, p. 3495-3526.
- Nigro M, Martin V, Kaufer F, Carral L, Angel S, Pszenny V 2001. High level of expression of the *Toxoplasma gondii*-recombinant rop2 protein in *Escherichia coli* as a soluble form for optimal use in diagnosis. *Mol Biotechnol* 8: 269-273.
- Pagliari S 2013. *Avaliação do antígeno recombinante rop2 do Toxoplasma gondii no ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos IgG e IgM em soro humano*, Tese, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 57 pp.
- Remington JS, Mcleod R, Wilson CB, Desmonts G 2011. Toxoplasmosis. In JS Remington, JO Klein, CB Wilson, V Nizet, YA Maldonado (eds.), *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*, 7a ed., Elsevier Saunders, Philadelphia, p. 918-1041.

- Sonaimuthu P, Fong MY, Kalyanasundaram R, Mahmud R, Lau YL 2014. Serodiagnostic evaluation of *Toxoplasma gondii* recombinant Rhoptry antigen 8 expressed in *E. coli*. *Parasit Vectors* 7, 6 pp.
- Sun X, Lu H, Jia V, Chang Z, Peng S, Yin V, Chen V, Jiang N 2013. A comparative study of *Toxoplasma gondii* seroprevalence in three healthy Chinese populations detected using native and recombinant antigens. *Parasit Vectors*. 6, 7 pp.
- Van-Gelder P, Bosman F, Demeuter F, Vanheeuverswyn H, Herion P 1993. Serodiagnosis of toxoplasmosis by using a recombinant form of the 54-kilodalton rhoptry antigen expressed in *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 31: 9-15.
- Wu K, Chen XG, Li H, Yan H, Yang PL, Lun ZR, Zhu XQ 2009. Diagnosis of human toxoplasmosis by using the recombinant truncated surface antigen 1 of *Toxoplasma gondii*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 64: 261-266.

TABLE 1

Evaluation of sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and kappa index for the detection of IgG anti-*Toxoplasma gondii* using the commercial chemiluminescence method (CML) and enzyme linked immunoassay with recombinant rhoptry 2 as antigen (ELISA-rROP2) and indirect immunofluorescence (IFI) as the gold standard for the serodiagnosis of toxoplasmosis in serum samples from pregnant women

IgG anti- <i>T. gondii</i>	IgG anti- <i>T. gondii</i> (IFI)					p value
	Sensitivity (%) (CI 95%)	Specificity (%) (CI 95%)	PPV (%) (CI 95%)	NPV (%) (CI 95%)	Kappa index	
CML	97.7 (94.1-99.4)	98.8 (93.7-99.8)	99.4 (96.7-100.0)	95.5 (88.9-98.8)	0.957	<0.0001 ^a
ELISA- rROP2	61.8 (54.0-69.1)	62.8 (51.7-73.0)	76.6 (68.7-83.4)	45.4 (36.2-54.8)	0.224	0.0002 ^b

n= 256 samples (1 sample was excluded from group C); a: Fisher Exact test; b: chi-square test

IFI: indirect immunofluorescence

CML: microparticle chemiluminescence method

ELISA: enzyme linked immunoassay

rROP2: recombinant antigen of rhoptry 2 of *Toxoplasma gondii*

PPV: positive predictive value

NPV: negative predictive value

CI: confidence interval

TABLE 2

Evaluation of sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and kappa index for the detection of IgG anti-*Toxoplasma gondii* using the indirect immunofluorescence (IFI) and enzyme linked immunoassay with recombinant rhostry 2 as antigen (ELISA-rROP2) using the commercial chemiluminescence (CML) method as the gold standard for the serodiagnosis of toxoplasmosis in serum samples from pregnant women

IgG anti- <i>T. gondii</i> (CML)						
	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)	Kappa	p value
IgG anti- <i>T. gondii</i>	(CI 95%)	(CI 95%)	(CI 95%)	(CI 95%)	index	
IFI	99.4 (96.7-100.0)	100.0 (95.8-100.0)	100.0 (97.8-100.0)	98.8 (93.7- 99.8)	0.991	<0.0001 ^a
ELISA- rROP2	62.3 (54.5-69.7)	62.4 (51.2- 72.6)	76.5 (68.4-83.3)	45.7 (36.4-55.2)	0.226	0.0002 ^b

n= 252 samples (5 samples were excluded: 1 from group A, 2 from group B and 2 from group I); a: Fisher Exact test; b: chi-square test

IFI: indirect immunofluorescence

CML: microparticle chemiluminescence method

ELISA: enzyme linked immunoassay

rROP2: recombinant antigen of rhostry 2 of *Toxoplasma gondii*

PPV: positive predictive value

NPV: negative predictive value

CI: confidence interval

TABLE 3

Evaluation of sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and kappa index of IgG anti-*T. gondii* by the enzyme linked immunoassay with recombinant rhoptry 2 as antigen (ELISA-rROP2) compared with the commercial chemiluminescence (CML) method as the gold standard in serum samples from pregnant women with acute toxoplasmosis, with low avidity (Group B) and high avidity (Group C) of IgG anti *T. gondii*, and previously exposed to *T. gondii* (Group I)

Groups	CML		Sensitivity (%) (CI 95%)	Specificity (%) (CI 95%)	PPV (%) (CI 95%)	NPV (%) (CI 95%)	Kappa index	p value ^a
	R (n)	NR (n)						
Group B	46	85	60.9 (45.4-74.9)	62.4 (51.2- 72.6)	46.7 (33.7- 60.0)	74.7 (62.9-84.2)	0.217	0.0109
Group C	58	85	86.2 (74.6 -93.9)	62.4 (51.2- 72.6)	61.0 (49.6-71.6)	86.9 (75.8- 94.2)	0.456	<0.0001
Group I	63	85	41.3 (29.0-54.4)	62.4 (51.2 -72.6)	44.8 (31.7-58.5)	58.9 (48.0 -69.2)	0.045	0.6553

n= samples; R: reactive; NR: nonreactive; a: chi-square test

IFI: indirect immunofluorescence

CML: microparticle chemiluminescence method

ELISA: enzyme linked immunoassay

rROP2: recombinant antigen of rhoptry 2 of *Toxoplasma gondii*

PPV: positive predictive value

NPV: negative predictive value

CI: confidence interval

TABLE 4

Evaluation of sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and kappa index of IgG anti-*T. gondii* by the enzyme linked immunoassay with recombinant rhoptry 2 as the antigen (ELISA-rROP2) compared with the indirect immunofluorescence (IFI) method as the gold standard in serum samples from pregnant women with acute toxoplasmosis, with low avidity (Group B) and high avidity (Group C) of IgG anti *T. gondii*, and and previously exposed to *T. gondii* (Group I)

Groups	IFI		Sensitivity (%) (CI 95%)	Specificity (%) (CI 95%)	PPV (%) (CI 95%)	NPV (%) (CI 95%)	Kappa index	p value ^a
	R (n)	NR (n)						
Group B	48	86	62.5 (47.4-76.1)	62.8 (51.7-73.0)	48.4 (35.50-61.4)	75.0 (63.4-84.5)	0.238	0.0049
Group C	57	86	86.0 (74.2-93.7)	62.8 (51.7-73.0)	60.5 (49.0-71.2)	87.1 (76.2- 94.3)	0.455	<0.0001
Group I	65	86	40.0 (28.0- 52.9)	62.8 (51.7-73.0)	44.8 (31.7-58.5)	58.1 (47.4-68.2)	0.028	0.7270

n= samples; R: reactive; NR: nonreactive; a: chi-square test

IFI: indirect immunofluorescence

CML: microparticle chemiluminescence method

ELISA: enzyme linked immunoassay

rROP2: recombinant antigen of rhoptry 2 of *Toxoplasma gondii*

PPV: positive predictive value

NPV: negative predictive value

CI: confidence interval

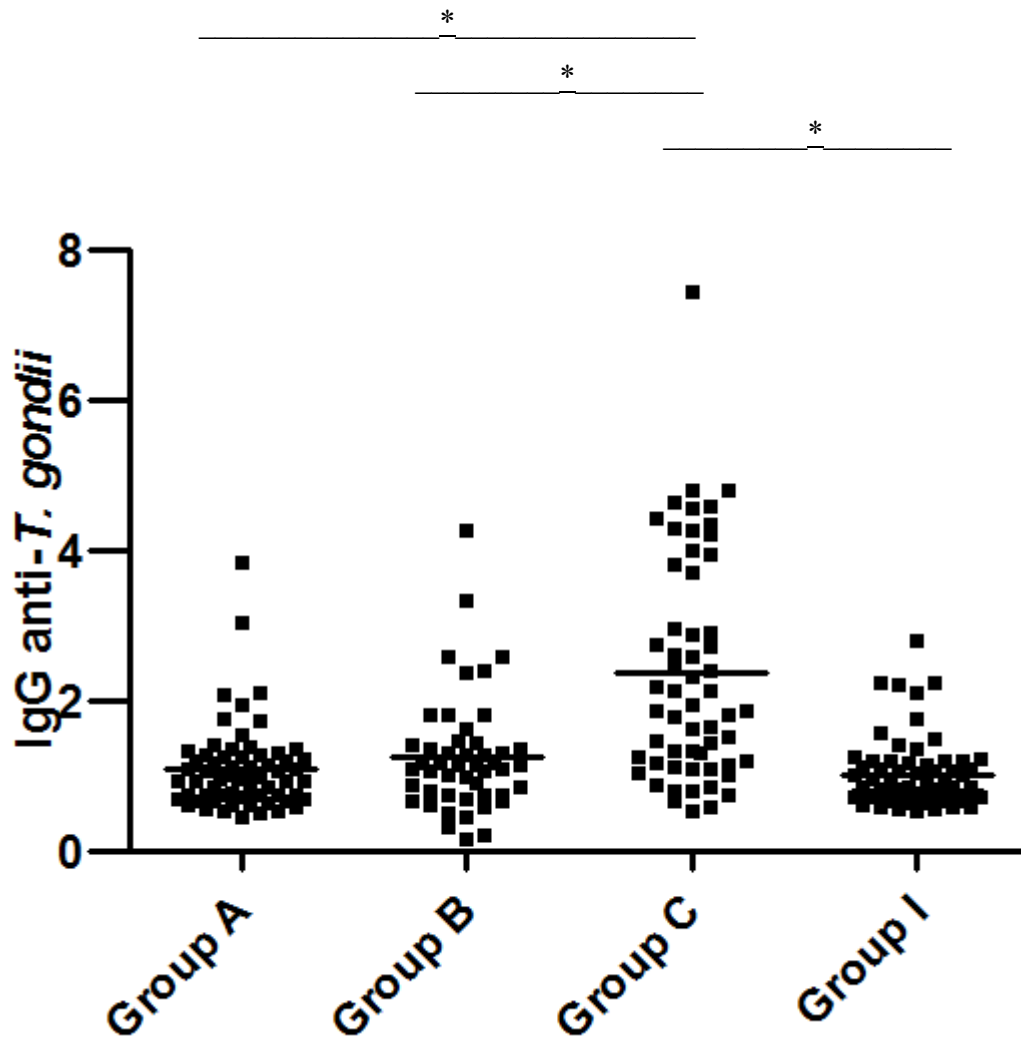


Fig 1: Levels of IgG anti-*Toxoplasma gondii* antibodies obtained using enzyme linked immunoassay with rhoptry 2 as antigen (ELISA-rROP2) in samples of pregnant women susceptible or non exposed (group A), with acute infection (group B), infection for more than 4 months (group C), and previously exposed (group I). The values are expressed in ELISA index ≥ 1 , obtained with the mean optical density (OD) of sample / mean OD for the negative controls plus 2 standard deviation. Bars represent the median of the titers obtained for each group (Kruskal-Wallis test with Dunn's post test) * $p < 0.0001$; for comparison with other groups, the difference was not significant ($p > 0.05$).

Apresentação de pôster em congresso com publicação em anais.**Perfil dos casos de toxoplasmose congênita em um serviço de referência do Paraná.**

Autores: JD CAPOBIANGO, CP REZENDE, RM BREGANÓ, IT NAVARRO, AMB CASELLA, FMR LOPES, S PAGLIARO, IT INOUE, EMV REICHE.

PO 28, pág 85 dos anais do congresso

Evento: II Simpósio Brasileiro de Toxoplasmose

Data: 01/02/2013

Local: Anfiteatro da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
– SP

Trabalho premiado com Menção Honrosa, entre os 12 melhores trabalhos apresentados no congresso.

Pôsteres

30 de janeiro de 2013 - 17h00 - 18h00

Número do pôster	Título do trabalho	Autores
PO 01	VERIFICAÇÃO DA REAÇÃO CRUZADA DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS, ANTI - <i>Neospora caninum</i> NC-1, PRODUZIDOS PELO CLONE 1E1 E12 A11, COM O <i>Toxoplasma gondii</i>	Devens et al.
PO 02	ANTICORPOS CONTRA <i>Toxoplasma gondii</i> EM GATOS APREENDIDOS PELO CENTRO DE CONTROLE DE ZOOSES DE LAGES, SC	Trevisani et al.
PO 03	TOXOPLASMOSE CONGÊNITA EM MINAS GERAIS - ASSOCIAÇÃO COM CONDIÇÕES SÓCIOECONÔMICAS ADVERSAS E FATORES DE RISCO RELACIONADOS À INGESTÃO DE OOCISTOS	Carelllos et al.
PO 04	ASSOCIATION BETWEEN IgG SUBCLASSES AGAINST <i>Toxoplasma gondii</i> AND CLINICAL SIGNS IN NEWBORNS WITH CONGENITAL TOXOPLASMOSIS	Souza-e-Silva et al.
PO 05	REPRODUCTIVE ALTERATIONS IN EXPERIMENTALLY REINFECTED GOATS BY <i>Toxoplasma gondii</i> OOCYSTS	da Silva et al.
PO 06	ANÁLISE DE CÉLULAS DE PANETH EM RATOS Wistar infectados com <i>Toxoplasma gondii</i> CEPA ME-49	Vicentino et al.
PO 07	CORRELATION BETWEEN <i>Toxoplasma gondii</i> INFECTION AND RECURRENT MISCARRIAGES IN HUMANS	Ferreira et al.
PO 08	DETECTION OF MOLECULAR AND SEROLOGICAL <i>Toxoplasma gondii</i> INFECTION IN BLOOD DONORS	Nakashima et al.
PO 09	OCORRÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI- <i>Toxoplasma gondii</i> EM ANIMAIS SILVESTRES RECEBIDOS EM UM CETAS	Fournier et al.
PO 10	SEROPREVALENCE AND VARIABLES ASSOCIATED TO <i>Toxoplasma gondii</i> INFECTION IN CATS AND DOGS ATTENDED BY THE BIRTH CONTROL PROJECT OF THE UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA (UEL) – PR	Caldart et al.
PO 11	CONCEITOS DE MORADORES DO MUNICÍPIO DE ARAÇATUBA, SP SOBRE A INFECÇÃO POR <i>Toxoplasma gondii</i>	Viol et al.
PO 12	PREVALENCE OF TOXOPLASMOSIS IN A RURAL AREA OF SANTA TERESA, ESPÍRITO SANTO	Buery et al.
PO 13	ISOLAMENTO DE <i>Toxoplasma gondii</i> EM GESTANTES DO MUNICÍPIO DE MARINGÁ, PARANÁ, BRASIL	Higa et al.
PO 14	RELAÇÃO ENTRE A VULNERABILIDADE DE AQUÍFEROS E A PREVALÊNCIA DA TOXOPLASMOSE HUMANA E ANIMAL EM CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ	Vieira et al.
PO 15	EFEITO DA PIRIMETAMINA E SULFADIAZINA, ISOLADAMENTE E EM ASSOCIAÇÃO, SOBRE CEPAS RECOMBINANTES DE <i>Toxoplasma gondii</i> OBTIDAS DE CASOS HUMANOS DE TOXOPLASMOSE CONGÊNITA: RESULTADOS PRELIMINARES.	Fernandes et al.
PO 16	TOXOPLASMOSE EM ESCOLARES DE JATAIZINHO, PARANÁ, BRASIL	Cezar et al.
PO 17	ABSENCE OF TOXOPLASMIC RETINOCHOROITIS IN MBYA ABORIGINES WITH POSITIVE SEROLOGY AGAINST TOXOPLASMA GONDII FROM MISIONES, ARGENTINA	Meyer et al.
PO 18	BILATERAL OCULAR TOXOPLASMIC RETINOCHOROITIS IN YOUNG HIV NEGATIVE PATIENTS FROM MISIONES, ARGENTINA	Rudzinski e Couto
PO 19	INVESTIGAÇÃO PARASITOLÓGICA E SOROLÓGICA DE <i>Toxoplasma gondii</i> EM GESTANTES COM SUSPEITA LABORATORIAL DE TOXOPLASMOSE AGUDA, PARANÁ, BRASIL	Zangari et al.
PO 20	PERFIL IMUNOLÓGICO EM RECÉM-NASCIDOS COM TOXOPLASMOSE CONGÊNITA NO ESTADO DE MINAS GERAIS: RESULTADOS PRELIMINARES	Machado et al.
PO 21	OCORRÊNCIA DA INFECÇÃO POR <i>T. gondii</i> EM GALINHAS-D'ANGOLA CRIADAS EXTENSIVAMENTE NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, BRASIL	Ferreira et al.
PO 22	MEAT AND TRANSMISSION OF <i>Toxoplasma gondii</i> : WHAT IS THE RISK FROM BEEF, PORK, AND SHEEP?	Ewald et al.

31 de janeiro de 2013 - 17h00 - 18h00

Número do pôster	Título do trabalho	Autores
PO 23	VIABILITY OF <i>Toxoplasma gondii</i> IN RAM SEMEN AFTER FREEZING	Silva et al.
PO 24	<i>Toxoplasma gondii</i> IN HORSES FROM RIO DE JANEIRO STATE, BRAZIL	Venturi et al.
PO 25	PERDAS EMBRIONÁRIAS EM CABRAS EXPERIMENTALMENTE INFECTADAS COM SÊMEN CONTAMINADO COM TAQUIZOÍTOS DE <i>Toxoplasma gondii</i>	Wanderley et al.
PO 26	A MULTIPROFISSIONALIDADE NO CUIDADO AO BINÔMIO MÃE-FILHO EXPOSTOS A TOXOPLASMOSE	Nagahama et al.
PO 27	INDUCTION OF TH2 IMMUNE RESPONSE IN IMMUNIZED A/SN MICE WITH <i>Toxoplasma gondii</i> EXCRETED/SECRETED ANTIGENS (ESA)	Costa-Silva et al.
PO 28	PERFIL DOS CASOS DE TOXOPLASMOSE CONGÊNITA EM UM SERVIÇO DE REFERÊNCIA DO PARANÁ	Capobianco et al.
PO 29	T AND B CELLS MEMORY OF IMMUNIZED BALB/C MICE WITH IRRADIATED TACHYZOITES OF <i>Toxoplasma gondii</i>	Zorgi et al.
PO 30	INVESTIGAÇÃO DE PROVAVEL SURTO DE TOXOPLASMOSE HUMANA EM ANGRA DOS REIS, RIO DE JANEIRO, BRASIL, 2012	Barroso et al.
PO 31	DINÂMICA DA INFECÇÃO TOXOPLÁSMICA EM FELINOS INFECTADOS PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA FELINA.	Zanutto et al.
PO 32	TRANSMISSÃO CONGÊNITA DE <i>Toxoplasma gondii</i> EM CABRA EXPERIMENTALMENTE INFECTADA COM SÊMEN CONTAMINADO COM TAQUIZOÍTOS DA CEPA "CPG"	Wanderley et al.
PO 33	5,7,8-TRIMETHYL-1,4-BENZOXAZINE ANALOGUES ARREST <i>Toxoplasma gondii</i> PROLIFERATION IN VITRO	Martins-Duarte et al.
PO 34	IDENTIFICATION OF <i>Toxoplasma gondii</i> IN LIVER OF OVINE DESTINED FOR HUMAN CONSUMPTION IN RIO DE JANEIRO, BRAZIL	Silva et al.
PO 35	LINFADENOPATIA ASSOCIADA À TOXOPLASMOSE AGUDA: DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO EM UM GRUPO DE PACIENTES ATENDIDOS NO INSTITUTO EVANDRO CHAGAS, ANANINDEUA, PARÁ – RESULTADOS PRELIMINARES	Mota et al.
PO 36	ESTUDO BIOLÓGICO E MOLECULAR DE ISOLADOS DE <i>Toxoplasma gondii</i> OBTIDOS DE RECÉM-NASCIDOS COM TOXOPLASMOSE CONGÊNITA EM MINAS GERAIS REVELAM ISOLADO INCOMUM	Pinheiro et al.
PO 37	SOROPREVALÊNCIA DE TOXOPLASMOSE HUMANA NO MUNICÍPIO DE NOVO REPARTIMENTO ESTADO DO PARÁ, BRASIL.	Carmo et al.
PO 38	IgG AND SUBCLASSES EVALUATION IN CEREBRAL TOXOPLASMOSIS/AIDS USING TWO <i>Toxoplasma gondii</i> ANTIGENS	Motoie et al.
PO 39	EVALUATION OF NESTED PCR FOR MOLECULAR DIAGNOSIS OF TOXOPLASMOSIS	Gava et al.
PO 40	EPIDEMIOLOGY OF TOXOPLASMOSIS IN CHILDREN AND THE RESPECTIVE MOTHER IN HIGHLY ENDEMIC AREAS IN BRAZIL	Mangiavacchi et al.
PO 41	CANINE TOXOPLASMOSIS ON THE BORDER OF BRAZIL, ARGENTINA AND PARAGUAY: SEROPREVALENCE IN DOMICILED DOGS FROM FOZ DO IGUAÇU CITY, BRAZIL	Dias et al.
PO 42	OCORRÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA <i>Toxoplasma gondii</i> EM EQUINOS DAS MESORREGIÕES SERRANA E LITORÂNEA DO ESTADO DE SANTA CATARINA	Silva et al.
PO 43	VIGILANCIA DA TRANSMISSÃO VERTICAL DA TOXOPLASMOSE	Castilho-Peres et al.

PO 28

**PERFIL DOS CASOS DE TOXOPLASMOSE CONGÊNITA EM UM SERVIÇO DE
REFERÊNCIA DO PARANÁ.**

J.D. Capobiango, C. P. Rezende Neto, R. M. Breganó, I. T. Navarro, A. M. B. Casella, F. M. R. Lopes, S. Pagliari, I. T. Inoue, E. M. V. Reiche.

Universidade Estadual de Londrina, Paraná. Email: jaquedc@sercomtel.com.br

Foram descritas as características clínicas e laboratoriais dos pacientes com toxoplasmose congênita, atendidos no Ambulatório do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Londrina, de janeiro de 2000 a dezembro de 2010. Foram avaliados, retrospectivamente, 236 prontuários e os casos foram definidos pela classificação de Lebech (1996). De 31 crianças com toxoplasmose congênita, 20 eram do sexo masculino (64,5%) e 11 feminino (35,5%); o peso de nascimento variou de 1.150g a 3.800g e 37,9% apresentaram < 2.500g. A idade gestacional variou de 26,2 a 41,0 semanas; 85,2% das gestantes realizaram pré-natal e o diagnóstico de toxoplasmose não foi realizado em 20 (64,5%) gestantes. Entre 11 gestantes (35,5%) que apresentaram IgM anti-*Toxoplasma gondii* reagente durante a gestação, o tratamento foi realizado em quatro (13%) gestantes; portanto 27 (87,0%) não foram tratadas. Em 10/29 crianças (34,5%), o exame físico foi normal no primeiro mês de vida. As principais manifestações encontradas no primeiro mês de vida foram hepatomegalia e/ou esplenomegalia (58,1%), icterícia (13,8%), microcefalia (6,9%), macrocefalia (3,4%) e febre (3,4%). Na avaliação oftalmológica inicial, 67,7% das crianças apresentaram lesões, sendo 48,4% coriorretinite, 25,8% estrabismo, 12,9% vitreíte, 12,9% microftalmia e 9,7% catarata. Anticorpos IgM anti-*Toxoplasma gondii* foram demonstrados em 48,3% dos casos. Na 1ª amostra de sangue coletada, os níveis séricos de IgG anti-*Toxoplasma gondii* variaram de 1:16 a > 1:128.000. No líquido cefalorraquidiano, os leucócitos variaram de 2 a 149 células/mm³ e as proteínas de 34 a 1.594 mg/dL. Os exames de imagem de crânio foram normais em 44,8% das crianças, calcificações difusas em 27,6%, hidrocefalia em 10,3% e hidrocefalia com calcificações em 17,2%; 31,0% apresentaram atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, com seqüela motora em 13,8%, convulsão em 27,5%, déficit de atenção e/ou hiperatividade em 10,3%, puberdade precoce em 6,9% e hipotireoidismo em 3,4%. Houve seqüela visual em 55,2% dos casos. Duas crianças eram co-infectadas por HIV e três por CMV. Todos os pacientes foram tratados com sulfadiazina, pirimetamina e ácido fólico. Os dados reforçam a importância do diagnóstico e tratamento da toxoplasmose adquirida na gestação para a redução dos casos de toxoplasmose congênita e suas conseqüências para a criança.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, Toxoplasmose Congênita, diagnóstico, criança.

II SIMPÓSIO BRASILEIRO DE TOXOPLASMOSE



CERTIFICADO

Certificamos que o artigo científico intitulado **“Perfil dos casos de toxoplasmosse congênita em um serviço de referência do Paraná”** de autoria de JD CAPOBIANGO, CP REZENDE NETO, RM BREGANÓ, IT NAVARRO, AMB CASELLA, FMR LOPES, S PAGLIARO, IT INOUE, EMV REICHE recebeu menção honrosa tendo sido selecionado como um dos doze melhores trabalhos apresentados no **“II SIMPÓSIO BRASILEIRO DE TOXOPLASMOSE”** realizado de 30 de janeiro a 01 de fevereiro de 2013, na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

São Paulo, 01 de fevereiro de 2013.

Solange Maria Gennari
Presidente do Simpósio

Luciana R. Meireles J. Ekman
Secretária do Simpósio

CBPV

6 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo demonstraram que, de 2000 a 2010, a maioria das gestantes cujas crianças apresentaram toxoplasmose congênita e foram acompanhadas no Ambulatório de Infectologia Pediátrica do AEHU da UEL não recebeu tratamento específico para toxoplasmose durante a gravidez. Nesta coorte retrospectiva de pacientes, a maioria das crianças era sintomática no primeiro mês de vida e a coriorretinite foi o dano ocular mais frequente. A alta frequência de sequelas também foi observada neste grupo de pacientes. Estes dados reforçam a importância do diagnóstico e tratamento da toxoplasmose adquirida durante a gravidez para reduzir a ocorrência de toxoplasmose congênita e suas complicações na criança.

A implantação do Programa de Vigilância Epidemiológica de Toxoplasmose na Gestação e Congênita no município de Londrina, em 2006, mudou esta realidade local, demonstrada com o uso de uma ficha de notificação específica, no período de agosto de 2013 a agosto de 2014. Nesta coorte prospectiva, o diagnóstico foi realizado com maior frequência no 1º trimestre de gestação e a maioria das gestantes recebeu o tratamento durante a gestação. Não houve diferença sobre a presença de efeitos colaterais entre as pacientes que receberam sulfadiazina, pirimetamina com ácido folínico e as que receberam espiramicina. A possibilidade de utilização de uma ficha específica de notificação pode trazer o conhecimento das dificuldades nos diversos serviços de saúde do país e facilitar a discussão de soluções para implantação de um fluxo de encaminhamento e acompanhamento dos casos. Além disso, determinar a incidência da infecção aguda em gestantes e congênita, a taxa de transmissão congênita, identificar falhas no encaminhamento e tratamento das gestantes e crianças e propiciar a busca ativa a fim de reduzir as sequelas da toxoplasmose congênita.

A detecção de IgG anti-*T. gondii* com o método de WB mostrou-se útil para o diagnóstico de pacientes com toxoplasmose congênita. Anticorpos contra proteínas do *T. gondii* foram detectados em diferentes proporções entre os grupos de crianças infectadas e não infectadas. Porém, o WB isoladamente apresentou sensibilidade e especificidades insatisfatórias e deve ser utilizado em conjunto com outros marcadores convencionais para o diagnóstico de toxoplasmose congênita. Quando associado à presença de sinais e sintomas clínicos de toxoplasmose congênita, à presença de IgM anti-*T. gondii* ou PCR positiva para *T. gondii*, apresentou aumento na sua sensibilidade.

O teste de ELISA- rROP2 para detecção de IgG anti *T. gondii* mostrou baixa sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e baixa concordância com os teste de QL e IFI, não se mostrando útil para a confirmação da infecção aguda, pois foi reagente nas amostras de soro de gestantes com infecção aguda e infecção crônica. Porém, a sensibilidade do ELISA- rROP2 foi maior para as

gestantes com infecção aguda e principalmente, para as gestantes com infecção com mais de 4 meses de evolução, caracterizadas pela presença simultânea de IgG e IgM anti-*T. gondii* com forte avidéz de IgG.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Há urgência de ampliação da notificação da toxoplasmose adquirida na gestação e da toxoplasmose congênita para as Unidades Básicas de Saúde de Londrina e região, e não só nas Unidades Sentinelas, a fim de promover um melhor conhecimento dos dados epidemiológicos e planejar ações de prevenção da doença na gestante.

Com estes resultados fica clara a dificuldade encontrada pelos médicos para o diagnóstico da toxoplasmose adquirida na gestação e a congênita. Resultados discordantes nos desafiam para a continuidade de estudos de diferentes estratégias para melhorar o diagnóstico desta infecção. O problema da pesquisa não se resolve com este estudo mas continua a merecer nossa atenção nos próximos projetos de pesquisa, embora muitos avanços foram conquistados desde a implantação do Programa de Vigilância em Saúde da Toxoplasmose Gestacional e Congênita, no Município de Londrina.

Entre outras estratégias a serem avaliadas incluem a realização dos testes de WB e ELISA rROP2 para a detecção de IgM anti-*T. gondii* e do teste de ELISA empregando a associação de ROP2 com outras proteínas recombinantes, que podem melhorar a acurácia dos resultados.

Visualizamos a necessidade de implantação do WB na rotina laboratorial; porém, o ideal seria que houvesse a padronização de um conjunto de reagentes de fabricação nacional para facilitar a execução do teste. Acreditamos que o WB deva conter a associação das proteínas mais frequentemente reconhecidas pelos anticorpos presentes no soro de crianças brasileiras com toxoplasmose congênita.

REFERÊNCIAS

American Academy of Pediatrics. Report of Committee on Infectious Diseases. *Toxoplasma gondii* infections (Toxoplasmosis). In: _____ (Ed.). **Red Book**. 28. ed. Illinois: Elk Grove Village, 2009. p. 667-672.

AMATO-NETO V, BARONE A. A. Toxoplasmose. In: AMATO-NETO V.; BALDY J.L.S. (Org.). **Doenças Transmissíveis**. 3. ed. São Paulo: Savier, 1989. p. 831-843.

ANTONIOU, M. et al. Incidence of toxoplasmosis in 5532 pregnant women in Crete, Greece: management of 185 cases at risk. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, Amsterdam, v. 117, n. 2, p. 138-143, 2004.

ASPOCK, H. Prevention of congenital toxoplasmosis in Austria. **Archives de Pédiatrie**, Paris, v. 10, sup. 1, p. 16-17, 2003.

AVELINO, M.M. et al. Pregnancy as a risk factor for acute toxoplasmosis seroconversion. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, Amsterdam, v. 108, p.19-24, 2003.

AZEVEDO, K.M.L. et al. Congenital toxoplasmosis transmitted by human immunodeficiency virus infected women. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 14, n. 2, p. 186-189, 2010.

BAHIA, M.D.; ORÉFICE, F., ANDRADE, G.M.Q. Análise clínica das lesões de coriorretinite em crianças portadoras de toxoplasmose congênita. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, Rio de Janeiro, v. 51, n. 5, p. 265-271, 1992.

BAHIA-OLIVEIRA, L.M.G. et al. Toxoplasmosis in southeastern Brazil: an alarming situation of highly endemic acquired and congenital infection. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 31, p. 133 -136, 2001.

BESSIÈRES, M. H. et al. Dossier Scientifique. Parasitologie. Les difficultés d'interprétation de la sérologie de la toxoplasmose. **Revue Francophone des Laboratoires**, Paris, n. 383, p. 43-49, jun. 2006.

BESSIÈRES, M. H. et al. Neonatal screening for congenital toxoplasmosis in a cohort of 165 women infected during pregnancy and influence of in utero treatment on the results of neonatal tests. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, Amsterdam, v. 94, p. 37-45, 2001.

BEVERLEY, J. K. A. A new look at infectious diseases. Toxoplasmosis. **British Medical Journal**, London, v. 2, n. 5864, p. 475-478, 1973.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. **Atenção à Saúde do Recém-Nascido. Guia para os Profissionais de Saúde**: intervenções comuns, icterícia e infecções. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2013. p. 109-122.

BRITO, V. N.; LATRONICO, A. C. Manuseio da Puberdade Precoce. In: VILAR, L. et al. (Org.). **Endocrinologia clínica**, 5. ed. Rio Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. p. 231- 248,

CALABET, A. et al. Toxoplasmose congénitale et échographie encéphalique trans-fontanelaire. **Journal de Radiologie**, Paris, v. 65, n. 5, p. 367-373, 1984.

CAMARGO, M. E. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 6, p. 117-118, 1964

CAMARGO, M. E. Introdução às técnicas de imunofluorescência. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, Rio de Janeiro, v. 10, p. 143-171, 1973.

CARELLOS, E. V. M. et al. Congenital toxoplasmosis in the state of Minas Gerais, Brazil: a neglected infectious disease? **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 142, n. 3, p. 644-655, 2014.

CARELLOS, E. V. M.; ANDRADE, G. M. Q.; AGUIAR, R. A. L. P. Evaluation of prenatal screening for toxoplasmosis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil: a cross-sectional study of postpartum women in two maternity hospitals. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, p. 391-401, 2008.

CARVALHEIRO, C. G. et al. Incidence of congenital toxoplasmosis estimated by neonatal screening: relevance of diagnostic confirmation in asymptomatic newborn infants. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 133, n. 3, p. 485-491, 2005.

CASTILHO-PELLOSO, M. P. ; FALAVIGNA, D. L. M. ; FALAVIGNA-GUILHERME, A. L. Suspected acute toxoplasmosis in pregnant women. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 27-34, 2007.

COUVREUR, J. et al. A homogeneous series of 210 cases of congenital toxoplasmosis in 0-11-month-old infants detected prospectively. **Annales de Pédiatrie**, Paris, v. 31, p. 815-819, 1984.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. DATASUS: Tecnologia da informação a serviço do SUS. Informações de Saúde. 2012. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinasc/cnv/nvpr.def>>. Acesso em: 01 dez. 2014.

DEAN, A. G. et al. **Epi Info, Version 6**: a word processing, data bases, and statistic program for epidemiology on microcomputers. Atlanta: Center for Diseases Control and Prevention, 1994.

DELICIO, A. M. et al. Mother –to- child transmission of human immunodeficiency virus in a ten years period. **Reproductive Health**, London, v. 8, n. 35, p. 1-10 , 2011.

DEMIAN, S. D.; DONNELLY, W. J.; MONIF, G.R. Coexistent congenital cytomegalovirus and toxoplasmosis in a stillborn. **American Journal of Disease of Children**, Chicago, v. 125, p. 420-421, 1973.

DESMONTS, G. Acquired toxoplasmosis in pregnant women: evaluation of the frequency of transmission of toxoplasma and congenital toxoplasmosis. **Lyon Medical**, Lyon, v. 248, p. 115-123, 1982.

DESMONTS, G. et al. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. **Lancet**, London, v. 325, n. 8427, p. 500-504, 1985.

DETANICO, L.; BASSO, R. M. C. Toxoplasmose: perfil sorológico de mulheres em idade fértil e gestantes. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 1, p. 15-18, 2006.

DIEBLER, C.; DUSSER, A.; DULAC, O. Congenital toxoplasmosis – clinical and neuroradiological evaluation of the cerebral lesions. **Neuroradiology**, Berlin, v. 27, p. 125 -130, 1985.

DUBEY, J. P. et al. Toxoplasmosis in human and animals in Brazil: prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, London, v. 139, n. 11, p. 1375-1424, 2012.

DUBREMETZ, J. F. Rhoptries are major players in *Toxoplasma gondii* invasion and host cell interaction. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 9, n. 4, p. 841–848, 2007.

DUNN, D. et al. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: Risk estimates for clinical counseling. **Lancet**, London, v. 353, n. 9167, p. 1829-1833, 1999.

FERNANDES, R. C. S. C. et al. Vertical transmission of HIV and Toxoplasma by reactivation in a chronically infected woman. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 13, n. 1, p. 70-71, 2009.

FIGUEIRÓ-FILHO, E. A. et al. Toxoplasmose aguda: estudo da frequência, taxa de transmissão e relação entre os testes diagnósticos materno-fetais em gestantes em Estado da Região Centro-Oeste do Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 8, p. 442-449, 2005.

FOULON, W.; NAESSENS, A.; DERDE, M. P. Evaluation of the possibilities for preventing congenital toxoplasmosis. **American Journal of Perinatology**, New York, v. 11, n. 1, p. 57-62, 1994.

FRENKEL, J. K.; BERMUDEZ, J. E. V. Toxoplasmose. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. (Org.). **Tratado de Infectologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. v. 2, p. 1633 – 1650.

GABANI, F. L.; SANT'ANNA, F. H. M.; ANDRADE, S. M. Caracterização dos nascimentos vivos no município de Londrina (PR) a partir de dados do SINASC, 1994 a 2007. **Ciência, Cuidado e Saúde**, Maringá, v. 9, n. 2, 2010.

GALISTEU, K. J. et al. Prevalência e fatores de risco associados à toxoplasmose em grávidas e suas crianças no Noroeste Paulista, Brasil. **Revista Panamericana de Infectologia**, São Paulo, v. 9, n. 4, p. 24-29, 2007.

GARCIA, J. L. et al. *Toxoplasma gondii*: Detection by mouse bioassay, histopathology, and polymerase chain reaction in tissues from experimentally infected pigs. **Experimental Parasitology**, New York, v. 113, n. 4, p. 267-271, 2006.

GARCIA, J. L. et al. *Toxoplasma gondii*: isolation of tachyzoites rhoptries and incorporation into Iscom. **Experimental Parasitology**, New York, v. 108, n. 1-2, p. 40-46, 2004.

GILBERT, R. et al. The European multicentre Study on Congenital Toxoplasmosis (EMSCOT). Ocular Sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil Compared with Europe. **PloS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 2, n. 8, e.277, p. 1-7, 2008.

GOLKAR, M. et al. Serodiagnosis of recently acquired *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women using enzyme-linked immunosorbent assays with a recombinant dense granule GRA6 protein. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, New York, v. 61, p. 31-39, 2008.

GRANT, E. G. et al. Intracranial calcification in the infant and neonate: evaluation by sonography and CT. **Radiology**, Easton, v. 157, n. 1, p. 63-68, 1985.

HAJJ, H. E. et al. The ROP2 family of *Toxoplasma gondii* rhoptry proteins: Proteomic and genomic characterization and molecular modeling. **Proteomics**, Weinheim, v. 6, p. 5773-5784, 2006.

HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, v. 8, n. 10, p. 634-640, 2002.

HOHFELD, P. et al. Fetal toxoplasmosis: outcome of pregnancy and infant follow-up after *in utero* treatment. **Journal of Pediatrics**, Saint Louis, v. 115, n. 5, p. 765-769, 1989

HOLEC-GASIOR, L.; KUR, J.; HISZCZYNSKA-SAWICKA, E. GRA2 and ROP1 recombinant antigens as potential markers for detection of *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G in humans with acute toxoplasmosis. **Clinical Vaccine Immunology**, Washington, v. 16, n. 4, p. 510-514, 2009.

HULLEY, S. B. et al. **Delineando a pesquisa clínica**. Uma abordagem epidemiológica. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. p. 93, p. 110.

HUNG, C. C. et al. Serological screening and toxoplasmosis exposure factors among pregnant women in the Democratic Republic of São Tomé and Príncipe. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 101, n. 2, p. 134-139, 2007.

IGARASHI, M. et al. *Toxoplasma gondii* evaluation of an intranasal vaccine using recombinant proteins against brain cysts formation in BALB/c mice. **Experimental Parasitology**, New York, v. 118, n. 3, p. 386-392, 2008.

JONES, J. L.; LOPEZ, A.; WILSON, M. Congenital Toxoplasmosis. **American Family Physician**, Kansas City, v. 67, n.10, p. 2131-2138, 2003.

KIEFFER, F. et al. Risk factors for reetinochoroiditis during the first 2 years of life in infants with treated congenital toxoplasmosis. **Journal of Pediatric Infectious Diseases**, Amsterdam, v. 27, n. 1, p. 27-32, 2008.

KOTRESHA, D.; NOORDIN, R. Recombinant proteins in the diagnosis of toxoplasmosis. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica, Copenhagen**, v. 118, n. 8, p. 529-542, 2010.

KRAVETZ, J. D; FEDERMAN, D.G. Toxoplasmosis in pregnancy. **The American Journal of Medicine**, New York, v. 118, n. 3, p. 212-216. 2005.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAGO, E. G. et al. Congenital toxoplasmosis: late pregnancy infections detected by neonatal screening and maternal serological testing at delivery. **Paediatric and Perinatology Epidemiology**, Boston, v. 21, p. 525-531; 2007.

LAGO, E. G. et al. Agreement between ultrasonography and computed tomography in detecting intracranial calcifications in congenital toxoplasmosis. **Clinical Radiology**, Edinburgh, v. 62, p. 1004-1011, 2007.

LAGO, E. G. et al. Screening for *Toxoplasma gondii* antibodies in 2,513 consecutive parturient women and evaluation of newborn infants at risk for congenital toxoplasmosis. **Scientia Medica**, Porto Alegre , v. 19, n. 1, p. 27-34, 2009.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, Washington, v. 33, p. 159-174, 1977.

LEBECH, M. et al. Feasibility of neonatal screening for toxoplasma infection in the absence of prenatal treatment. **Lancet**, London, v. 353, p. 1834-1837, 1999

LEBECH, M. et al. Classification system and case definitions of *Toxoplasma* infection in immunocompetent pregnant women and their congenitally infected offspring. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Berlin, v. 15, n. 10, p.799-805, 1996.

LIESENFELD, O. et al. Confirmatory serologic testing for acute toxoplasmosis and rate of induced abortions among women reported to have positive *Toxoplasma* immunoglobulin M antibody titers. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, Saint Louis, v. 184, p. 140-145, 2001.

LIU, Q. et al. *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women in China. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 103, n. 2, p. 162-166, 2009.

LOPES-MORI, F. M. R. et al. Programs for control of congenital toxoplasmosis. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 57, n. 5, p. 581-586, 2011.

LOPES-MORI, F. M. R. et al. Factors associated with the seropositivity for anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in pregnant women of Londrina, Paraná, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.104, n.2, p. 378-382, 2009.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 193, p. 265-276, 1951.

LUNDÉN, A. Immune responses in sheep after immunization with *Toxoplasma gondii* antigens incorporated into iscoms. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 56, p. 23-35, 1995.

MCAULEY, J. B. et al. Toxoplasmosis. In: FEIGIN, R.D. et al. (Org.). **Feigin and Cherry's Textbook of Pediatric Infectious Diseases**. 6. ed. Philadelphia: Saunders. 2009. v. 2, p. 2954-2971.

MCLEOD, R. et al. Why prevent, diagnose and treat congenital toxoplasmosis? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 2, p.320-344, 2009.

MELAMED, J. Contributions to the history of ocular toxoplasmosis in Southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n.2, p.358-363; 2009.

MELAMED, J.; DORNELLES, F.; ECKERT, G. U. Alterações tomográficas cerebrais em crianças com lesões oculares por toxoplasmose congênita. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 77, n. 6, p. 475-480; 2001.

MITSUKA-BREGANÓ, R.; LOPES-MORI, F.R.; NAVARRO, I.T. **Toxoplasmose adquirida na gestação e congênita: vigilância em saúde, diagnóstico, tratamento e condutas**. Londrina: Eduel, 2010. 62 p.

MITSUKA-BREGANÓ, R. **Programa de Vigilância em Saúde da Toxoplasmose Gestacional e Congênita: elaboração, implantação e avaliação no município de Londrina, Paraná**. 2009. 112 fls. Dissertação (Doutorado) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil, 2009.

MONTOYA, J. G.; BOOTHROYD, J. C.; KOVACS, J. A. *Toxoplasma gondii*. In: MANDELL, G. L.; BENNETT, J. E.; DOLIN, R. (Org.). **Mandell, Douglas, and Bennet's Principles and Practice of Infectious Diseases**. 7. ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2010. v. 2, p. 3495-3526.

MOZZATTO, L.; PROCIANOY, R. S. Incidence of congenital Toxoplasmosis in Southern Brazil: a prospective study. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 45, n. 3, p. 147-151, 2003;

NASH, J. Q. et al. Risk factors for toxoplasmosis in pregnant women in Kent, United Kingdom. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 133, n. 3, p. 475-483, 2005.

NETO, E. C. et al. High prevalence of congenital toxoplasmosis in Brazil estimated in 3-year old prospective neonatal screening study. **International Journal of Epidemiology**, London, v. 29, n. 5, p. 941-947, 2000.

NÓBREGA, O. T.; KARNIKOWSKI, M. G. O. An estimation of the frequency of gestational toxoplasmosis in the Brazilian Federal District. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 38, n. , p. 358-360, 2005.

NUNES, V. S. et al. Hipopituitarismo: Diagnóstico e tratamento. In: VILAR, L. et al. (Org.) **Endocrinologia clínica**. 5. ed. Rio Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. p.24-38.

PFREPPER, K. I. et al. Seroreactivity to and Avidity for Recombinant Antigens in Toxoplasmosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, Washington**, v. 12, n. 8, p. 977-982, 2005.

PHAN, L. et al. Longitudinal Study of New Eye Lesions in children with Toxoplasmosis who were not treated during the first year of life. **American Journal of Ophthalmology**, New York, v. 146, n. 3, p. 375-384; 2008a.

PHAN, L. et al. Longitudinal Study of New Eye Lesions in Treated Congenital Toxoplasmosis. **Ophthalmology**, Philadelphia, v. 115, n. 3, p. 553-559; 2008b.

PINARD, J. A, LESLIE, N. S., INVINE, P. J. Maternal serologic screening for toxoplasmosis. **Journal of Midwifery & Women's Health**, New York, v. 48, n. 5, p. 308-316, 2003.

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

PORTO, A. M. F. et al. Perfil sorológico para toxoplasmose em gestantes. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 54, n. 3, p. 242-248, 2008.

REICHE, E. M. V. et al. Prevalência da tripanossomíase americana, sífilis, toxoplasmose, rubéola, hepatite B, hepatite C e da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, avaliada por intermédio de testes sorológicos, em gestantes atendidas no período de 1996 a 1998 no Hospital

Universitario Regional do Norte do Paraná (Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 33, n. 6, p. 519-527, 2000.

REMINGTON, J. S. et al. Toxoplasmosis. In: _____ (Ed.). **Infections Diseases of the Fetus and Newborn Infant**. 7. ed. Philadelphia: Elsevier-Saunders, 2011. p. 918-1041.

REMINGTON, J. S. et al. Toxoplasmosis. In: _____ (Ed.). **Infections Diseases of the Fetus and Newborn Infant**. 6. ed. Philadelphia: Elsevier-Saunders, 2006. p. 947-1091.

REMINGTON, J. S.; THULLIEZ P.; MONTOYA J. G. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, p. 941-945, 2004.

REMINGTON, J. S.; ARAÚJO F. G., DESMONTS G. Recognition of different *Toxoplasma* antigens by IgM and IgG antibodies in mothers and their congenitally infected newborns. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 152, p.1020-1024, 1985.

RESENDE, L. M. et al. Congenital toxoplasmosis: auditory and language outcomes in early diagnosed and treated children. **Scientia Medica**, Porto Alegre, v. 20, n. 1, p. 13-19, 2010.

RESENDE, L. M. et al. Congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil: results of early ophthalmologic examination of a large cohort of neonates. **Ophthalmology**, Philadelphia, v. 116, n. 11, p. 2199-2205e1, 2009.

RODRIGUES, L. M. X. et al. Congenital toxoplasmosis: evaluation of serological methods for detection of anti-*Toxoplasma gondii* IgM and IgA antibodies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 3, p. 434-440, 2009.

SABIN, A. B. Toxoplasmic encephalitis in children. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 116, p. 801–807, 1941.

SÁFADI, M. A. P. et al. Clinical presentation and follow up of children with congenital toxoplasmosis in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 7, n. 5, p. 325-331, 2003.

SEGUNDO, G. R. S. et al. Congenital toxoplasmosis in Uberlândia, MG, Brazil. **Journal of Tropical Pediatrics**, London, v.50, n.1, p.50-53, 2004.

SOUSA, S. et al. Use of GRA6-Derived Synthetic Polymorphic Peptides in an Immunoenzymatic Assay To Serotype *Toxoplasma gondii* in Human Serum Samples Collected from Three Continents. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 15, n. 9, p. 1380–1386, 2008.

SPALDING, S. M. et al. Estudo prospectivo de gestantes e seus bebês com risco de transmissão de toxoplasmose congênita em município do Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 36, n.4, p. 483-491, 2003.

TISSOT- DUPONT, D. et al. Usefulness of Western Blot in serological follow-up of newborns suspected of congenital toxoplasmosis. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**. Berlin, v.22, p.122-125, 2003.

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedures and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

VARELLA, I. S. et al. Prevalência de soropositividade para toxoplasmose em gestantes. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 79, n. 1, p. 69-74, 2003.

VASCONCELOS-SANTOS, D.,V. et al. Congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil: results of early ophthalmologic examination of a large cohort of neonates. **Ophthalmology**, Philadelphia, v. 116, n. 11, p. 2199-2205e1, 2009.

WILSON, M.; MCAULEY, J. B. Toxoplasma. In: MURRAY, P. R. et al. (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology**, 7 ed., Washington: American Society for Microbiology, 1999. p. 1374-1382.

ZEGHER, F. et al. Concomitant cytomegalovirus infection and congenital toxoplasmosis in a newborn. **European Journal of Pediatrics**, Heidelberg, v. 147, n .6, p. 424-425, 1988.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título do Projeto: Avaliação do método imunoenzimático (ELISA) com proteínas recombinantes e do *Western Blot* para o diagnóstico de toxoplasmose adquirida na gestação e congênita. Pesquisador Responsável : Edna Reiche Telefone para contato (inclusive ligações a cobrar): (043) 3371-2000

Pesquisador participante: Jaqueline Dario Capobiango

Telefones para contato : (043) 3371-2237

A Toxoplasmose é uma doença transmitida pela ingestão de carne crua contaminada ou de alimentos contaminados pelo *Toxoplasma gondii*. Este protozoário pode causar infecção na gestante com risco de transmissão para o feto. A infecção no feto pode causar sérios problemas com risco de sequelas. Esta pesquisa tem como objetivo avaliar um novo exame para o diagnóstico da toxoplasmose adquirida na gestação e da toxoplasmose congênita em recém nascidos cujas mães tiveram toxoplasmose na gestação, o que permitirá o início do tratamento o mais precoce possível quando indicado. Portanto, precisamos de sua amostra de sangue e da amostra de sangue do seu filho(a) para realizar exames para toxoplasmose. A coleta de sangue não acarretará riscos para você e seu filho(a), somente o incômodo da picada da agulha.

Os resultados do estudo serão mantidos em sigilo. Você e seu filho receberão o acompanhamento e tratamento necessários. Você tem a liberdade de retirar o

consentimento, em qualquer momento, sem prejuízo da continuidade do acompanhamento e do tratamento seu e do seu filho(a).

Nome e Assinatura do pesquisador _____

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____,

n.º CFF ou RG _____, RG do HU: _____ abaixo

assinado, concordo em participar do estudo: Avaliação do método imunoenzimático (ELISA) com proteínas recombinantes e do *Western Blot* para o diagnóstico de toxoplasmose adquirida na gestação e congênita, como sujeito. Fui devidamente informado e esclarecido pelos pesquisador Jaqueline Dario Capobiango, sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve à qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento e/ou assistência e/ou tratamento.

Local e data _____ / _____ / _____

Nome do RN: _____

RG do HU do RN: _____

Assinatura do sujeito ou responsável: _____

APÊNDICE B - Questionário para Coleta de Dados Demográficos, Clínicos e Terapêuticos dos Indivíduos Inseridos no Estudo

File Edit Options Help

Caso no.

GESTANTE

Nome Data de nascimento Idade RG do HU

Profissão Escolaridade Endereço

Município Fone Fone 2 Consultas pré-natal

DUM IG pela DUM IG pela USG (em semanas) Tipo de parto

Sintomas Outros Alterações à USG Data da USG

Data do diagnóstico sorológico IG do Diagnóstico (pela DUM - em semanas) IG do diagnóstico (pela USG - em semanas)

PCR de líquido amniótico Epidemiologia Epidemiologia 3

PCR TOXD positivo 1 (gestação) Data do PCR de Líquido Amniótico Epidemiologia2 Contato com gato

Medicação inicial Uso de medicamento Início do Tratamento Término do Tratamento

Início do ttm / IG Trocado tratamento IG troca tratamento Término do ttm / IG

Suspensão do Ttm. por efeitos colaterais Coinfecção HIV Obs Mãe

Diagnostico Categoria da infecção Materna Anotações Mãe

PCR TOXD positivo (puerpério)

APÊNDICE B - Questionário para Coleta de Dados Demográficos, Clínicos e Terapêuticos dos Indivíduos Inseridos no Estudo (continuação)

File Edit Options Help

CRIANÇA

Nome criança Rg da Criança Sexo

Data de Nascimento criança IG ao nascimento (semanas) Apgar de 1o min Apgar 5o min

Peso ao Nascer (gramas) Estatura (cm) Perímetro Cefálico

Cidade de Nascimento Hospital de Nascimento

Medicações Início tratamento Término tratamento

Tratamento alternativo Início do Tratamento alternativo Suspensão do Tratamento alternativo

Causa troca tratamento Uso de corticóides

Exame físico 1o. mês Alterações laboratoriais primeira semana Coinfecção

Convulsão Avaliação Neurológica Inicial Déficit motor no período neonatal

USG de crânio TC de Crânio Fundo de Olho

Teste Da Orelhinha Óbito Idade do óbito (meses)

Obs Outro tratamento/Diagnóstico Alteração dos exames durante tto.

Data alta ambulatorial Mais anotações

Toxo Congênita Classificação do Dx da criança PCR TOXD positivo 1 PCR TOXD positivo 2
PCR TOXD positivo 3

APÊNDICE B - Questionário para Coleta de Dados Demográficos, Clínicos e Terapêuticos dos Indivíduos Inseridos no Estudo (continuação)

e Edit Options Help

DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO NA CRIANÇA


1a Coleta Bebe	<input type="text" value=".."/>	IgG IFI B1	<input type="text"/>	IgG ELISA B1	<input type="text"/>	IgG QUIMIO B1	<input type="text"/>	Título Químio B1	<input type="text" value="."/>	VR 1	<input type="text"/>
Idade Bebe 1 (sem)	<input type="text"/>	IgM ELISA B1	<input type="text"/>	Avidez B1	<input type="text"/>	IgM QUIMIO B1	<input type="text"/>				
2a Coleta Bebe	<input type="text" value=".."/>	IgG IFI B2	<input type="text"/>	IgG ELISA B2	<input type="text"/>	IgG QUIMIO B2	<input type="text"/>	Título Químio B2	<input type="text" value="."/>		
Idade Bebe 2 (sem)	<input type="text"/>	IgM ELISA B2	<input type="text"/>	Avidez B2	<input type="text"/>	IgM QUIMIO B2	<input type="text"/>			VR 2	<input type="text"/>
3a Coleta Bebe	<input type="text" value=".."/>	IgG IFI B3	<input type="text"/>	IgG ELISA B3	<input type="text"/>	IgG QUIMIO B3	<input type="text"/>	Título Químio B3	<input type="text" value="."/>		
Idade Bebe 3	<input type="text"/>	IgM ELISA B3	<input type="text"/>	Avidez B3	<input type="text"/>	IgM QUIMIO B3	<input type="text"/>			VR 3	<input type="text"/>
4a Coleta Bebe	<input type="text" value=".."/>	IgG IFI B4	<input type="text"/>	IgG ELISA B4	<input type="text"/>	IgG QUIMIO B4	<input type="text"/>	Título Químio B4	<input type="text" value="."/>		
Idade Bebe 4	<input type="text"/>	IgM ELISA B4	<input type="text"/>	Avidez B4	<input type="text"/>	IgM QUIMIO B4	<input type="text"/>			VR 4	<input type="text"/>
5a Coleta Bebe	<input type="text" value=".."/>	IgG IFI B5	<input type="text"/>	IgG ELISA B5	<input type="text"/>	IgG QUIMIO B5	<input type="text"/>	Título Químio B5	<input type="text" value="."/>		
Idade Bebe 5	<input type="text"/>	IgM ELISA B5	<input type="text"/>	Avidez B5	<input type="text"/>	IgM QUIMIO B5	<input type="text"/>			VR 5	<input type="text"/>
6a Coleta Bebe	<input type="text" value=".."/>	IgG IFI B6	<input type="text"/>	IgG ELISA B6	<input type="text"/>	IgG QUIMIO B6	<input type="text"/>	Título Químio B6	<input type="text" value="."/>		
Idade Bebe 6	<input type="text"/>	IgM ELISA B6	<input type="text"/>	Avidez B6	<input type="text"/>	IgM QUIMIO B6	<input type="text"/>			VR 6	<input type="text"/>
7a. Coleta Bebê	<input type="text" value=".."/>	IgG IFI B7	<input type="text"/>	IgM Químio B7	<input type="text"/>	Obs 2	<input type="text"/>				
O Bebe possui outras coletas		<input type="text"/>									

ANEXOS

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UEL




COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
 Universidade Estadual de Londrina
 Registro CONEP 268

Parecer de Aprovação nº 043/2011 CAAE nº 0042.0.268.000-11 Folha de Rosto nº 411776 Processo nº 2687/2011	Londrina, 05 de abril de 2011.
PESQUISADOR(A): Edna Maria Vissoci Reiche CCS – Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas	
Prezado(a) Senhor(a): O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina" (Registro CONEP 268) – de acordo com as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto: <p align="center">"Avaliação do Método Imunoenzimático (Elisa) com Proteínas Recombinantes e do Western Blot para o Diagnóstico de Toxoplasmose Adquirida na Gestação e Congênita"</p>	
Situação do Projeto: APROVADO Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá apresentar ao CEP/UEL relatório final da pesquisa.	
<p align="center">Atenciosamente,</p>  <p align="center">Profa. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos Universidade Estadual de Londrina</p>	

ANEXO B - Emenda do Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UEL



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
Universidade Estadual de Londrina
Registro CONEP 268

Parecer CEP/UEL:	043/2011
CAAE:	0042.0.268.000-11
Processo:	15973/2011
Folha de Rosto:	402445
Pesquisador(a):	Edna Maria Viissoci Reiche
Unidade/Órgão:	CCS – Departamento de Medicina
<p>Prezado(a) Senhor(a):</p> <p>O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina" (Registro CONEP 268) – de acordo com as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:</p> <p>"Avaliação do método imunoenzimático (ELIZA) com proteínas recombinantes e do western blot para o diagnóstico de toxoplasmose adquirida a gestação e congênita.</p>	
<p>Emenda: realização de levantamento, a partir dos prontuários médicos do Hospital universitário e do Ambulatório do hospital de Clínicas, das características clínicas, laboratoriais e epidemiológicos das gestantes com toxoplasmose adquirida na gestação e de crianças com toxoplasmose congênita, atendidas no Ambulatório de infectologia Pediátrica do Hospital de Clínicas de Londrina, no período de 2000 a 2010.</p>	
<p>Situação do Projeto: Aprovado.</p> <p>Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá apresentar ao CEP/UEL relatório final da pesquisa.</p>	
<p>Londrina, 02 de agosto de 2011.</p> <p></p> <p>Prof. Dra. Paula Mariza Zedu Alliprandini Vice-coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos Universidade Estadual de Londrina</p>	