MIRIAM DE SOUZA MACRE

**AVALIAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DA
AVIDEZ DOS ANTICORPOS MATERNOS
NA ABORDAGEM LABORATORIAL DA
TOXOPLASMOSE CONGÊNITA**

Dissertação apresentada ao
Departamento de Parasitologia do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2002

**A Deus,
Pela bênção da vida
E da capacidade de pensar**

**Aos meus pais
Moizéis e Ermita,
Ao meu marido e maior incentivador
David**

**Tornar-se sábio vale mais do que o ouro e ser um homem de
bom senso é muito mais precioso do que a prata.**

Provérbios 16:16

A Bíblia Viva

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Junior, orientador desse trabalho, pela dedicação e prontidão nos momentos de dúvidas.

À Professora Dra. Marisa Porta Mirche Hirschfeld pelo incentivo á minha entrada na vida científica.

Ao Dr. Márcio Pires, pela coleta e encaminhamento das amostras das pacientes e auxílio na parte clínica do trabalho.

À Dra. Telma Suely Okay, pelo auxílio nos PCRs

À Roselaine Pereira Alvim Cardoso, técnica do Laboratório de Protozoologia, pelo auxílio na realização dos testes laboratoriais.

À Francisca Lúcio de Oliveira, pelo auxílio na preparação dos materiais de laboratório utilizados no presente trabalho.

À FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo) e ao Laboratório de Investigação Médica (LIM 49) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo suporte financeiro.

Aos colegas do Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical da FMUSP pela amizade e auxílio no decorrer do trabalho.

Às colegas do “Clube da Luluzinha” pela amizade incondicional e pelo apoio experimental.

Às pacientes do Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas que se dispuseram a participar desse estudo, contribuindo para a melhora diagnóstica da toxoplasmose congênita.

Aos membros da Banca de Exame de Qualificação: Prof. Dr. Marcelo Urbano Ferreira, Prof. Dr. Antonio Walter Ferreira e Prof. Dr. Igor Correia de Almeida, pelas críticas e sugestões pertinentes ao trabalho.

RESUMO

A toxoplasmose é uma infecção mundial que é transmitida por carne contendo cistos teciduais, água ou legumes crus contaminados com oocistos, contato com felinos, ou transmissão vertical. A toxoplasmose é usualmente assintomática, mas pode causar doença severa no feto quando transmitida durante fase aguda na mãe. O rastreamento da toxoplasmose congênita é normalmente executado durante o pré-natal, pela detecção de anticorpos IgM específico ou pela demonstração de aumento dos títulos de anticorpos IgG para *T.gondii*. Neste trabalho, 160 mães IgM positivas em rastreamento externo foram avaliadas para IgM, IgG, IgA e avides dos anticorpos IgG em ensaios usando Uréia e NH_4SCN como agente caotrópico, e extrato salino e uma proteína recombinante ROP2 como antígeno. A maioria das mães com resultado positivo de IgM eram negativas (124) quando retestadas, 16 negativas para todos os testes e somente 36 casos de IgM e IgG positivos. Nossa reação foi convalidada pelo Kit VIDAS Toxo IgG (Biomerieux), as 15 amostras aleatórias foram concordantes na maioria das amostras, incluindo as 3 de baixa avides. A maioria das mães com IgG e IgM positivas confirmadas apresentaram índices intermediário e alto de avides, e apenas 3 com índice baixo de avides, que é sugestivo de infecção aguda. O uso de proteína recombinante Rop2 como antígeno resultou em muitos falsos negativos. O rastreamento de toxoplasmose congênita em áreas de alta prevalência induz uma baixa eficiência da sorologia, altos índices de pacientes tratados e baixa detecção. Ensaios de avides são promissores, mas a sua padronização é obrigatória.

ABSTRACT

Toxoplasmosis is a worldwide infection transmitted by meat containing tissue cysts, water or crude vegetables contaminated with oocysts, contact with feline or vertical transmission. Toxoplasmosis is usually asymptomatic, but it can cause severe disease to the fetus during acute mother infection. The screening of congenital toxoplasmosis is usually been performed during prenatal, by detecting specific IgM antibodies or by demonstration of a significant increase specific IgG antibodies. In this work, 160 confirmed IgM positive mothers by external screening were evaluated for IgM, IgG, IgA, and avidity by several approaches using Urea and NH₄SCN as chaotropic agents, and saline extract and a recombinant protein Rop2 as antigen. Most mother (124) were IgM negative when retested, 16 negative for all *T.gondii* tests and only 36 IgM and IgG positive. Our avidity reaction was convalidated by Kit VIDAS Toxo IgG (Biomerieux), 15 aleatory samples were concordant in most samples, including the 03 low avidity. Most of confirmed IgG and IgM positive mothers presented intermediary or high avidity indexes, only 3 presenting low avidity index, suggestive of acute infection. Use of recombinant proteins Rop 2 as antigen resulted in high false negative. Screening congenital toxoplasmosis in high prevalent areas by IgM serology showed low efficiency, higher treatment rates and low detection of acute infection. Avidity assays are promising markers of recent infection, but false negatives could be frequent.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	05
2.1. Histórico.....	05
2.2. Biologia do agente.....	05
2.3. Antígenos específicos.....	09
2.4. Prevalência e transmissão.....	09
2.5. Formas clínicas	10
2.5.1. Toxoplasmose em indivíduos imunocompetentes.....	10
2.5.2. Toxoplasmose ocular.....	11
2.5.3. Toxoplasmose em indivíduos imunodeprimidos.....	12
2.5.4. Toxoplasmose congênita.....	13
2.6. Tratamento.....	14
2.7. Prevenção.....	16
2.8. Diagnóstico.....	17
2.8.1. Demonstração do agente.....	17
2.8.1.1. Isolamento do agente.....	17
2.8.1.2. PCR.....	18
2.8.2. Diagnóstico sorológico.....	18
2.8.2.1. Resposta imune ao <i>T.gondii</i>	18
2.8.2.2. Anticorpos.....	19
2.9. Avidéz dos anticorpos IgG.....	21
3. OBJETIVOS.....	30
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1. Materiais.....	31
4.1.1. Parasitas.....	31
4.1.2. Animais Experimentais.....	31
4.1.3. Obtenção de amostras sorológicas.....	32
4.2. Métodos.....	33
4.2.1. Recepção das amostras.....	33
4.2.2. Obtenção do antígeno de <i>T.gondii</i>	34
4.2.3. Ensaio Imunoenzimático padrão para determinação de IgG e IgA anti- <i>T.gondii</i>	34
4.2.4. Teste de Imunofluorescência Indireta para determinação de IgG e IgM anti <i>T.gondii</i>	35
4.2.5. Determinação das reações de avidéz de IgG.....	37
4.2.5.1. Avidéz na diluição 1/100 do soro na recepção.....	37
4.2.5.2. Avidéz comercial por EIA Sistema Vidas para Avidéz de anticorpos IgG	38
4.2.5.3. Modificações da reação de avidéz utilizando Uréia como agente caotrópico.....	39

4.2.5.4. Modificações da reação de avidéz de IgG anti <i>T.gondii</i> utilizando NH ₄ SCN como agente caotrópico.....	40
4.2.5.5. Reações de ELISA e determinação da avidéz, utilizando como antígeno a proteína recombinante Rop2.....	43
4.2.6 – Comparações entre reações sorológicas das amostras para as várias igs testadas e a determinação da avidéz em todos os métodos realizados.....	44
5. RESULTADOS.....	46
5.1. População de estudo	46
5.2. Convalidação com testes comerciais.....	52
5.3. Reprodutibilidade.....	53
5.4. Influência da diluição do soro.....	56
5.5. Aprimoramento do caotrópico.....	59
5.5.1. Aprimoramento da reação de avidéz pelo uso de U8..	59
5.5.2. Mudança do agente caotrópico.....	63
5.6. Avidéz com antígeno recombinante.....	67
5.7. Sorologia e avidéz.....	71
5.7.1. IgG – ELISA.....	71
5.7.2. IgG – IFI.....	71
5.7.3. IgM – IFI.....	72
6. DISCUSSÃO.....	74
7. CONCLUSÕES.....	85
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
ANEXOS.....	103

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS:

AIDS/SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

CDC – Centers for Disease Control

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DO - densidades ópticas

ELISA – Ensaio Imunoenzimático (do original em inglês: Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

H₂O₂ – Água Oxigenada

HCFMUSP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HCl – Ácido Clorídrico

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana (do original em inglês: Human Immunodeficiency Virus)

IFI – Imunofluorescência Indireta

IgA – Imunoglobulina A

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

µg – Microgramas

µl – Microlitros

M – Molar

mg – Miligramas

MHC – do inglês: Major histocompatibility complex

ml – Milímetros

NaCl – Cloreto de Sódio

NaOH – Hidróxido de Sódio

NH₄SCN - Tiocianato de Amônio

nm – Nanômetros

°C – Graus Celcius

OPD – Orto-fenilenodiamina

PBS – Salina Tamponada com fosfato

PBST – Salina Tamponada com fosfato contendo Tween 20

PBSTL – Salina Tamponada com fosfato contendo Tween 20 e Leite desnatado

PCR – Reação em Cadeia Polimerase (do original em inglês: Polymerase Chain Reaction)

pH – Potencial hidrogeniônico

rDNA – Ácido desoxirribonucleico ribosomal

Rop2 – Proteína de Roptria 2

Rpm – Rotações por minuto

1. INTRODUÇÃO

A Toxoplasmose é uma zoonose de alta prevalência no Brasil, causada por um protozoário intracelular obrigatório denominado *Toxoplasma gondii*. Esse parasita pode infectar tanto o homem quanto animais domésticos e selvagens (Dubey & Thulliez, 1993), sendo que os felinos são os únicos hospedeiros definitivos (Frenkel *et al*, 1970, Amato Neto *et al*, 1995).

A infecção humana, geralmente, ocorre através da ingestão de alimentos ou água contaminados com oocistos, excretados em fezes de gatos, ou cistos, em carnes cruas ou mal cozidas (Sanchez *et al*, 1994), mas raramente provoca doença clínica aguda (Amato Neto *et al*, 1995). Entretanto, se a infecção é adquirida durante a gestação, pode ocorrer a transmissão transplacentária. Essa transmissão ocorre quando os taquizoítos atingem a placenta infectando o feto, que, por não ter as mesmas defesas disponíveis da mãe para o combate do agente, acaba apresentando doença grave e disseminada, com comprometimento do sistema nervoso central e do olho (Remington *et al*, 1995). As características clássicas dos quadros mais graves desta infecção é denominada de tétrade de Sabin (Sabin, 1941), contudo, a infecção congênita não tem manifestação intrauterina imediata. Entretanto, mesmo casos assintomáticos podem desenvolver seqüelas graves ao longo da vida do indivíduo (Frenkel, 1991). Uma vez diagnosticada, a doença é tratável por antifolatos ou antibióticos, com redução de seqüelas (Derouin, 2001), o que torna essencial o diagnóstico correto da infecção fetal.

Devido à dificuldade de isolamento do agente e baixa frequência nas lesões, a confirmação da infecção materna é baseada no perfil sorológico com

determinação da resposta humoral, através da pesquisa de anticorpos específicos e suas classes (Camargo *et al*, 1991).

O diagnóstico da toxoplasmose aguda deveria ser baseado na soroconversão materna, mas é feito rotineiramente durante o pré-natal em uma única amostra, selecionando mães IgM positivas para *T.gondii* como um índice de infecção aguda. Do ponto de vista sanitário, tal procedimento se justifica, mas com o aprimoramento da sensibilidade das técnicas utilizadas na detecção de IgM, o número de pacientes com esta classe de anticorpo passou a incluir uma alta proporção de mães com infecção não recente, e como consequência houve a introdução custosa e desnecessária da Espiramicina em muitas pacientes, pois esta alta sensibilidade a IgM pode permanecer positiva por um período de até alguns anos após a infecção aguda (Pons *et al*, 1997).

As perspectivas no diagnóstico mudaram com o advento dos testes de Avidéz de anticorpos IgG (Lehtonen *et al*, 1982), na resposta imune, existe seleção progressiva de clones de células B específicos, cuja afinidade pelo antígeno é alta, em substituição aos clones inicialmente ativados e de afinidade menor, o que resulta em aumento da proporção de anticorpos de maior afinidade com a evolução da infecção (Boes, 2000). A determinação é baseada, geralmente, no tratamento dos anticorpos ligados ao antígeno, em um suporte sólido, com um agente caotrópico que é capaz de retirar os anticorpos de menor afinidade. Os anticorpos de alta avidéz permanecem ligados ao antígeno após o tratamento da amostra, e a proporção entre os anticorpos de baixa e alta avidéz é um indicador do período de infecção da amostra estudada (Hedman *et al*, 1993).

Este teste tem se mostrado muito útil para estudos epidemiológicos, inclusive para estudos vacinais (Souza *et al*, 1997), mas os métodos utilizados em sua determinação são muito variáveis e dependem de cada laboratório que o executa, além do fato da padronização ser complexa.

Em nosso meio, a rede pública não dispõe de teste de avidéz, e apesar de bom indicador de infecção recente em estudos epidemiológicos (Souza *et al*, 1997), esta técnica necessita de uma boa padronização para permitir uma definição individual em gestantes suspeitas que deveriam sofrer procedimentos invasivos ou terapia agressiva. Esta definição individual é muito complexa, pois as condições de determinação dependem de inúmeros fatores como pH, temperatura ambiental, diluição do soro e preparações de antígenos, além dos sistemas de revelação do anticorpo. Geralmente, não encontramos na literatura estudos que trabalhem com a definição prospectiva multicêntrica deste teste, reportado como auxiliar e associado retrospectivamente a determinação da época da infecção (Bertozi *et al*, 1999; Camargo *et al*, 1991). Estes problemas de determinação individual estão relacionados ao uso de agentes caotrópicos variados e condições experimentais individuais a cada local, associados à experiência prévia do executor. A padronização da técnica é complexa, e apesar de existirem kits comerciais disponíveis, resultados conflitantes são muito freqüentes (Holliman, 1995; Barbieri *et al*, 2001). Uma das possibilidades de retirada desta variabilidade do teste seria o uso de procedimentos bioquímicos que caracterizassem precisamente a reação de avidéz, como a determinação da concentração do caotrópico que retirasse 50% dos anticorpos, o que não é possível com o agente caotrópico usualmente utilizado, a uréia, que é incapaz, pelo seu baixo poder

caotrópico, de retirar todos os anticorpos de alta avides. Agentes caotrópicos alternativos, como o Tiocianato de Amônio, tem este poder e poderiam ser utilizados para esta determinação. Além disso, a determinação em curvas de diluição do soro retiraria esta variável permitindo uma melhor medida pelo deslocamento da curva induzida pelo agente caotrópico, como descrito por alguns autores (Ferreira & Katzin, 1995; Wuorimaa *et al*, 2001). Em adição, o uso de antígenos recombinantes poderia diminuir a variabilidade desses ensaios por ter menor número de epítomos envolvidos.

O objetivo desse trabalho foi a determinação da avides de anticorpos IgG em gestantes encaminhadas para o Serviço de Obstetrícia do HCFMUSP, portando um exame laboratorial com IgM anti-*T.gondii* positivo, através da padronização da avides de anticorpos IgG utilizando diferentes agentes caotrópicos e diluições seriadas de soros, bem como a sua comparação com os métodos convencionais e os comerciais, tentando definir qual teste poderia ter maior poder discriminatório na determinação de infecção recente e risco real de transmissão congênita em cada gestante individualmente.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Histórico

O *Toxoplasma gondii* foi descoberto em 1908, simultaneamente por Splendore no Brasil, e por Nicolle & Manceaux no Instituto Pasteur na Tunísia. A primeira descrição de doença humana causada pelo *T.gondii* ocorreu em 1923 quando o parasita foi isolado de cistos oculares (Janku, 1923), já a doença congênita só foi descrita em 1937 (Wolf & Cowen, 1937). Entretanto, a frequência da infecção humana só foi conhecida a partir de 1948 com a introdução do clássico teste do corante de Sabin-Feldman que contribuiu tanto para a realização de inquéritos epidemiológicos quanto para o diagnóstico sorológico da toxoplasmose (Amato Neto *et al*, 1995).

2.2. Biologia do agente

O *T.gondii* é um protozoário pertencente ao Filo Apicomplexa, Classe Sporozoea, Subclasse Coccidia, Ordem Eucoccidiida, Subordem Eimeriida, Família Sarcocystidae, Subfamília Toxoplasmatinae, Gênero Toxoplasma, Espécie *gondii*. O *T.gondii* apresenta um complexo ciclo vital com diversos hospedeiros, como pode ser visto na figura 1. Além disso, o parasita apresenta três estágios infectantes e de diferente morfologia: os taquizoítos, os bradizoítos e os oocistos (Dubey *et al*, 1998).

Figura 1 – Ciclo vital do *T.gondii*, com as várias fontes de infecção para o homem.

Os taquizoítos são conhecidos por sua forma livre e proliferativa, e multiplicam-se rapidamente em células nucleadas dos hospedeiros intermediários e definitivos durante a fase aguda da infecção. Outra particularidade dessa forma é que ela pode ser encontrada na maioria das células e tecidos do hospedeiro e facilmente em líquidos biológicos, facilitando assim, a sua manutenção tanto em diversas culturas celulares como em passagens sucessivas em animais (Park *et al*, 1993). Quando observados em microscopia eletrônica, visualiza-se um complexo apical anterior constituído por um anel conóide de fibras espiraladas, roptrias e micronemas (figura 2) que estão envolvidos no processo de penetração celular do parasita. Observa-se também, ao centro, o núcleo, as mitocôndrias, o aparelho de Golgi e os microtúbulos (Dubey *et al*, 1998).

Figura 2 – Desenho esquemático do *T.gondii* com suas diversas organelas

Os bradizoítos, formas assexuadas e com metabolismo lento, estão localizados dentro do cisto tecidual especialmente durante a fase crônica da infecção, chegando a permanecer por longo tempo nos tecidos. Essa forma costuma estar presente com maior frequência no cérebro, na retina e nos músculos esqueléticos e cardíacos, órgãos ricos em células estáveis. Por sua grande persistência, os cistos teciduais variam de tamanho que vão de 10 e 100 μm aproximadamente, sendo que os jovens podem ser pequenos e conter

somente dois bradizoítos em seu interior, enquanto os mais velhos podem conter milhares deles. O tamanho dos cistos também pode variar de acordo com a sua localização, sendo os encontrados no cérebro, geralmente, menores do que os encontrados no músculo esquelético. Acredita-se também, que fatores relacionados ao desenvolvimento da imunidade induzem a formação de cistos tissulares (Dubey *et al*, 1998), como temperatura mais elevada e óxido nítrico (Lyons *et al*, 2002).

O oocisto é a forma infectante proveniente da reprodução sexuada do parasita no interior das células do epitélio intestinal dos felídeos. Após processamento gástrico, os oocistos se rompem no intestino liberando os esporozoítos que penetram e dividem-se rapidamente nas células intestinais, gerando taquizoítos que invadem outras células do hospedeiro, atingindo os demais órgãos. Em felinos ocorre um ciclo enteroepitelial complexo com formas de proliferação rápida, mas também, formação de gamontes que por sua divisão sexuada, resultam na formação de oocistos, com subsequente liberação nas fezes do hospedeiro definitivo (Frenkel & Wallace, 1979). Os oocistos são estruturas muito resistentes chegando a sobreviver meses ou até um ano em condições ambientais severas ou resistir a agentes químicos, como o Hipoclorito de Sódio (Dubey, 1991, Wong & Remington, 1993).

Poucas cepas do *T.gondii* foram descritas, sendo que a mais virulenta já descrita é a cepa RH que foi isolada por Sabin em 1941 do cérebro de uma criança falecida aos 6 anos de idade (Levine *et al*, 1980; Neves, 1985; Diniz *et al*, 1991; Amato Neto *et al*, 1995).

2.3. Antígenos específicos

Estudos qualitativos e quantitativos de imunolocalização têm mostrado que antígenos imunodominantes são localizados na superfície da membrana do *T.gondii* (SAG 1 e SAG 2) ou compartimentalizado no interior de organelas específicas, como as roptrias (ROP 1 e ROP 2) (Martin *et al*, 1998) e de grânulos densos (GRA 1, GRA 2, GRA 4, GRA 6 e GRA 7) (Aubert *et al*, 2000).

SAG 1 e SAG 2 são antígenos de superfície da membrana com um importante papel nos mecanismos imune e patogênico do parasita (Aubert *et al*, 2000). O SAG 1, mais precisamente, representa de 3 a 5% das proteínas totais do parasita e é considerado de extrema importância no processo de invasão do *T.gondii*, além de ter um papel importante nos mecanismos imune e patogênico (Seng *et al*, 1999) e estar presente somente em taquizoítos; enquanto que o SAG 2 é expressa tanto em taquizoítos quanto em bradizoítos (Lyons *et al*, 2002). Já o ROP 2 têm sido usado em diagnóstico, pois é relatado como indicador de resposta humoral na fase inicial da infecção (Martin *et al*, 1998). Vários outros antígenos têm sua função ainda pouco definida, já a estrutura genômica do agente é bem conhecida (Boothroyd *et al*, 1997).

2.4. Prevalência e Transmissão

O *Toxoplasma gondii* apresenta alta infecciosidade e baixa patogenicidade em hospedeiros humanos, se considerarmos a abrangência cosmopolita da infecção em relação à baixa ocorrência de casos clínicos graves.

Basicamente, a infecção humana ocorre através da ingestão de cistos ou oocistos em água ou alimentos contaminados (Sanchez *et al*, 1994), entretanto,

têm sido relatadas transmissões por transplante de órgãos, transfusão de sangue e derivados, entre outras (Amato Neto *et al*, 1995). Mas, embora existam várias formas de infecção humana, a maior parte ocorre por via oral como foi demonstrado em um estudo realizado pelo Serviço de Pesquisas Econômicas do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos que atribuiu pelo menos metade dos casos de toxoplasmose à ingestão de cistos em carnes contaminadas mal cozidas e o restante por oocistos em água e alimentos (Jones *et al*, 2001). No Brasil, estima-se que aproximadamente 60% da população adulta tenha entrado em contato com o parasita (Guimarães *et al*, 1993) e mundialmente, estima-se que meio bilhão de pessoas tenham anticorpos contra o *T.gondii* (Sharma, 1990), no entanto, o *T.gondii* raramente causa distúrbios nos indivíduos imunocompetentes, geralmente leves e temporários (Kasper *et al*, 1998).

2.5. Formas Clínicas

2.5.1. Toxoplasmose em indivíduos imunocompetentes

Quando o *T.gondii* acomete um indivíduo imunocompetente, a infecção é geralmente assintomática tendo um curso benigno e auto limitado. Segundo relatos, somente 10 a 20% dos indivíduos infectados pelo *T.gondii* apresentam sintomas da doença (Frenkel, 1988; Beaman, 1995), caracterizando a alta infectividade e baixa patogenicidade do agente. A manifestação clínica mais freqüente nesses indivíduos é a linfadenomegalia, geralmente cervical, sem quaisquer outros sinais ou sintomas. Em alguns casos mais graves, a linfadenomegalia pode vir acompanhada de hepatoesplenomegalia. Com exceção do acometimento ocular, a evolução clínica da toxoplasmose aguda é favorável,

embora os seus sintomas possam permanecer por meses e até anos (Frenkel, 1991). Apesar da infecção crônica mostrar-se geralmente assintomática, alguns estudos recentes têm demonstrado que ela pode causar alterações de comportamento, como demonstrado em ratos (Webster *et al*, 1994) e em humanos (Flegr *et al*, 2000).

2.5.2. Toxoplasmose Ocular

A corio-retinite é uma das principais formas clínicas nos indivíduos acometidos pela toxoplasmose e é decorrente do tropismo que o *T.gondii* tem pela retina (Roberts & McLeod, 1999). Dois tipos de lesões podem ser observados, a primeira, é a retinite aguda com intensa inflamação de início súbito que desaparece após um curto período. Esta patologia é decorrente da liberação de antígenos durante o processo de invasão celular que leva à destruição da retina, além da presença de hipersensibilidade e inflamação aguda local. A segunda é a retinite crônica, que é progressiva e pode levar até à perda da visão, devido à cicatrização e reativação das lesões. As conseqüências mais comuns da toxoplasmose ocular aumentam com o número e severidade das crises e incluem organização vítrea com opacificação permanente, glaucoma, deslocamento de retina, catarata, hiperemia conjuntiva, dor e fotofobia (Diniz *et al*, 1991; Amato Neto *et al*, 1995; Remington *et al*, 1995). Os problemas supracitados, inevitavelmente, vêm a culminar no impacto social da toxoplasmose ocular que pode levar o indivíduo à perda acentuada da visão em cerca de 40% dos casos, com clínica evidente e de acometimento principalmente de indivíduos nos trinta

primeiros anos de vida, justamente, o período em que se inicia a atividade profissional dos mesmos (Amato Neto *et al*, 1995).

2.5.3. Toxoplasmose em indivíduos imunodeprimidos

Com o advento da epidemia do HIV no início dos anos 80, a toxoplasmose emergiu como uma das infecções oportunistas mais comuns em pacientes com AIDS (Ambroise-Thomas, 2000). Tanto nesses pacientes, quanto em transplantados, a toxoplasmose tem sido bastante comum. Como os cistos do *T.gondii* persistem no organismo por um período prolongado, qualquer imunossupressão significativa pode ser seguida por uma recrudescência da toxoplasmose. Em um estudo em pacientes com AIDS/SIDA, as infecções oportunistas foram responsáveis pelo maior número de casos, dentre as quais a mais prevalente foi a toxoplasmose cerebral, presente em 21% dos casos (Wainstein, 1992). Em pacientes com AIDS/SIDA a doença geralmente ocorre pela reativação de cistos latentes em órgãos considerados estáveis, causando uma encefalite pseudotumoral provocada pelo *T.gondii*. A encefalite tem sinais clínicos variáveis, podendo progredir para hemiparesia e para coma, dado o tropismo do *T.gondii* por células cerebrais e também por células vasculares (Wainstein, 1992; Kasper *et al*, 1998). Além disso, o risco de doença aguda disseminada em pacientes HIV positivos com sorologia negativa para toxoplasmose é significativa e de difícil diagnóstico. Nos Estados Unidos, estima-se que 3 a 10% dos pacientes com AIDS desenvolvem a encefalite por *Toxoplasma*, e na Europa e na África a estimativa vai de 25 a 50% (Luft *et al*, 1993), sendo em nosso meio, em torno de 25% (Passos *et al*, 2000).

Em transplantados, a toxoplasmose é freqüente devido a imunossupressão intensa a que os receptores de transplantes estão submetidos. A infecção decorre tanto pela reativação de cistos pré-existentes no receptor, como pela infecção aguda causada pelos cistos de órgãos de doadores infectados (Thomas & Pelloux, 1993; Boterrel *et al*, 2002). Especialmente em transplante de medula óssea, a doença merece um estudo cuidadoso, pelas complexas alterações imunes a que o doador é submetido (Machado *et al*, 2002). Outro problema são os pacientes de neoplasia em quimioterapia agressiva, principalmente da linha hematológica, onde a descrição da toxoplasmose como doença oportunística antecede a pandemia do HIV (Weiss, 1995).

2.5.4. Toxoplasmose congênita

A Toxoplasmose congênita ocorre quando a mãe se infecta durante a gestação e o feto entra em contato com os taquizoítos, que são as formas responsáveis pela infecção congênita, via placenta (Jones *et al*, 2001). A freqüência da transmissão congênita é progressivamente maior com a evolução da idade gestacional à época da infecção aguda materna, mas esta maior freqüência é acompanhada geralmente por doenças fetais benignas ou assintomáticas, com seqüelas neurológicas ou oculares na vida extra-uterina (Remington *et al*, 1995). O tempo entre a infecção aguda materna e a infecção fetal depende de diversos fatores como virulência da cepa do *T.gondii* e estágio de desenvolvimento da placenta. Desta forma, a infecção intra-uterina pode ser muito grave, culminando até em abortamento, natimortos, doença neonatal grave ou

prematuridade, além de manifestações tardias, na dependência da virulência do agente (Bader *et al*, 1997) e da época da infecção do conceito.

Algumas crianças, infectadas no primeiro trimestre da gestação, podem apresentar quadros clínicos graves no nascimento, como hidrocefalia ou microcefalia, corio-retinite, calcificações intracranianas e retardamento mental que consistem na tétrede de Sabin (Dubey, 1991; Sabin, 1941). Este quadro representa a associação da lesão causada pelo agente e a reparação tecidual fetal que levam à obstrução dos sistemas de transporte do líquido céfalo raquidiano e grande destruição dos tecidos nervosos como o cérebro e a retina. As crianças infectadas, mas assintomáticas ao nascimento, podem desenvolver corio-retinite durante a adolescência ou na fase adulta, quando lesões oculares e distúrbios de desenvolvimento neurológico e psicomotor podem acontecer (Frenkel, 1990; Foulon *et al*, 1999). Nos Estados Unidos, por exemplo, a infecção por toxoplasmose congênita tem acometido cerca de 3.000 recém-nascidos por ano (Roberts & Frenkel, 1990), e na região metropolitana de São Paulo, Brasil, chega a 1 para cada 1000 recém-nascidos, estimando-se que devam nascer cerca de 230 a 300 crianças infectadas por ano (Guimarães *et al*, 1993).

2.6. Tratamento

Há aproximadamente 30 anos, esquemas terapêuticos têm sido usados no tratamento da toxoplasmose aguda (Derouin, 2001). O número de recém-nascidos infectados de mães tratadas com Espiramicina foi reduzido significativamente em relação aos de não tratadas (Stray-Pedersen & Jenun, 1992), mas isso não elimina o risco de transmissão para o feto (Bader *et al*, 1997). Um estudo mostrou

a eficácia da associação de outras drogas como a Sulfadiazina e Pirimetamina para minimizar o efeito da infecção no recém-nascido (Hollfeld *et al*, 1989). Segundo um estudo retrospectivo, o tratamento realizado durante a gravidez pode reduzir sintomas clínicos em crianças infectadas (Foulon *et al*, 1999). Apesar de não haver, ainda, um esquema de excelência para o tratamento pré e pós natal da toxoplasmose congênita, a terapia pré-natal parece de fato minimizar os efeitos da infecção, tornando-se uma alternativa prática e real para as gestantes (Stray-Pedersen & Jenun, 1992).

Apesar do tratamento conseguir controlar as formas de rápida proliferação, não existe nenhuma droga capaz de eliminar os cistos teciduais latentes em humanos e animais, que se mantêm viáveis por longo período, podendo reativar a infecção (Beaman *et al*, 1992). No caso de infecção fetal, preconiza-se terapia específica para o feto, através da associação da Pirimetamina à Sulfadiazina, acompanhado de Ácido Folínico, alternado com a Espiramicina, que segundo alguns estudos, geralmente não atravessa a placenta (Daffos *et al*, 1988; Jones *et al*, 2001). A Pirimetamina é uma substância antagonista do Ácido Fólico, e em situações normais não é recomendada para gestantes, pois pode produzir depressão gradual e reversível na medula fetal com leucopenia, anemia e plaquetopenia (Diniz *et al*, 1991). Já os pacientes imunocompetentes habitualmente são tratados quando com sintomatologia extensa e prolongada ou com comprometimento ocular ou visceral significativo (Amato Neto *et al*, 1995).

2.7. Prevenção

Ainda não foram desenvolvidas vacinas seguras e com eficácia contra a toxoplasmose humana que previnam a infecção congênita ou a reativação de cistos (Gottstein, 1995), consequentemente, a melhor maneira de se evitar os efeitos da doença é através da sua prevenção (Holliman, 1995). No aspecto da prevenção, são muito importantes as orientações higiênico-dietéticas sobre como evitar a toxoplasmose (Wilson *et al*, 1980), principalmente nos cuidados com gatos, no cozimento adequado de carnes, na ingestão de queijo fresco e leite pasteurizado (Hiramoto *et al*, 2001), no tratamento da água e na lavagem de frutas e verduras. Essas orientações devem ser intensificadas em relação às gestantes que apresentarem sorologia negativa para toxoplasmose na primeira triagem da gravidez que deve ocorrer, impreterivelmente, no primeiro trimestre (Remington *et al*, 1995).

Na implantação de um programa de prevenção, principalmente em gestantes, é preciso ter um cuidado redobrado com a interpretação do achado de uma sorologia positiva para IgM que têm se tornado um problema, podendo-se transformar uma paciente sadia em uma paciente com risco de transmissão do agente ao feto (Hall, 1992). Isso ocorre, pois foram descritos casos em que a IgM positiva não representava infecção recente, já que pode persistir na circulação por um período de até 18 meses (Jones *et al*, 2001). Por esta razão, a detecção de IgM específica tem baixa eficiência quando se leva em consideração o diagnóstico temporal da toxoplasmose (Jenun *et al*, 1997).

Como já demonstrado, a eficiência do tratamento é associada à sua toxicidade, o que pressupõe um diagnóstico adequado e de certeza, evitando assim, fetos afetados ou interrupção injustificada da gestação (Jones *et al*, 2001).

2.8. Diagnóstico

O diagnóstico da toxoplasmose é fácil, sendo realizado através de provas sorológicas com pesquisa de anticorpos IgM e IgG, mas a definição da época da infecção é difícil. No entanto, a prevalência de altos títulos de anticorpos IgG e a persistência de anticorpos IgM específicos entre indivíduos normais, têm complicado a interpretação dos testes quando há suspeita de toxoplasmose aguda (Bertozzi *et al*, 1999).

2.8.1. Demonstração do agente

2.8.1.1. Isolamento do agente

Os métodos parasitológicos de isolamento e manutenção do agente podem ser aplicados em amostras de material biológico materno ou do feto, como sangue fetal ou líquido amniótico. Estes métodos baseiam-se no crescimento e isolamento do patógeno em cultura celular ou em animais susceptíveis como camundongos, o que implica em acompanhamento por um longo período, com sensibilidade relativamente baixa. Por esse motivo, esses métodos não são utilizados em rotina laboratorial (Desmonts & Remington, 1980). Além disso, é importante ressaltar que o isolamento do agente a partir de tecidos pode refletir somente a presença de cistos, não definindo necessariamente a infecção aguda.

2.8.1.2. PCR

A PCR baseia-se na amplificação das seqüências específicas de DNA, um teste muito sensível (Holliman, 1994), pois pode detectar o parasita mesmo que ele esteja em número muito reduzido ou até mesmo lisado. A demonstração de taquizoítos ou cistos teciduais é feita, geralmente, através de diagnóstico histológico em cortes de tecidos, utilizando-se técnicas de imuno-histoquímica com uso de anticorpos específicos para o agente. A PCR, baseia-se na detecção de DNA do *T.gondii* em fluidos corporais ou fragmentos de tecidos (Howe *et al*, 1997). Os ensaios mais investigados têm sido os que utilizam iniciadores para o gene rDNA, SAG (Mondragon *et al*, 1998; Aubert *et al*, 2000), e o gene B1 (Hohlfeld *et al*, 1994), com sensibilidade variável.

2.8.2. Diagnóstico sorológico

2.8.2.1. Resposta imune ao *T.gondii*

O *T.gondii*, provavelmente, usa a resposta imune do hospedeiro para sinalizar transformação para cistos teciduais (Dubey *et al*, 1998). Ao invadir as células ativamente, através das estruturas do complexo apical, o parasita libera a membrana externa, utilizando seus sistemas de penetração na criação de um vacúolo híbrido na célula hospedeira que bloqueia assim, o contato dos sistemas celulares de controle do hospedeiro, como lisossomos e peroxissomos (Black & Boothroyd, 2000).

O intenso estímulo humoral, causado pela grande quantidade de antígenos liberados na penetração, gera altos níveis de anticorpos específicos, inicialmente das classes M ou G, mas de baixa avidéz que são substituídos por anticorpos IgG

de alta afinidade com a evolução da infecção. A resposta imune celular também é rapidamente estabelecida, com intensa produção de $\text{INF}\gamma$ que age tanto na ativação das células imunes como CD-8, ou diretamente por alterações metabólicas nas células infectadas, quando há produção de radicais livres de oxigênio e nitrogênio (Kasper & Khan, 1998). Toda essa resposta imune induz a elevação da temperatura corpórea, um sinal para a transformação em cistos (Dubey *et al*, 1998). A intensa ativação específica ocorre em todos os setores da resposta imune, não havendo alteração imune linfóide nessa infecção, mas o alvo principal, o parasita dentro da célula infectada, geralmente, não está acessível a esta resposta desde que permaneça na forma cística, de crescimento lento.

2.8.2.2. Anticorpos

A redescoberta da toxoplasmose deu-se a partir da introdução do teste do corante de Sabin-Feldman em 1948, que na realidade é uma reação de lise mediada pelo complemento diretamente sob formas de taquizoítos. A clássica reação de Sabin-Feldman é sensível e específica, só que traz algumas desvantagens: é trabalhosa e demorada requerendo taquizoítos vivos como antígeno, o que aumenta o risco do operador e o custo do teste (Camargo, 1996), e não permite a distinção entre anticorpos IgG e IgM. Além desse teste, o diagnóstico da toxoplasmose pode ser feito através da reação de Imunofluorescência Indireta (IFI), reações de aglutinação e Hemaglutinação Indireta, reação de Fixação do Complemento, reação Imunoenzimática (ELISA),

além da imuno-marcação em proteínas isoladas em membranas ou Western Blotting, discutidos a seguir.

A reação de Imunofluorescência Indireta têm a eficiência comparável à reação de Sabin-Feldman com a vantagem de apresentar maior rapidez de execução, reprodutibilidade e preservação dos reagentes (Sanchez, 1996). Desta forma, a IFI é amplamente utilizada em laboratórios de rotina e pesquisa, embora dependa de observador treinado, o que encarece o teste. A reação de Hemaglutinação Indireta (HI) baseia-se na utilização de hemácias taninizadas, usualmente não aglutinantes com o soro humano, como as de ave, revestidas por antígenos do parasita que ao reagirem com anticorpos específicos apresentam uma aglutinação visível que pode ser quantificada pela diluição seriada do soro. Contudo, a HI depende muito do tipo de reagente utilizado e das condições experimentais, incluindo-se a leitura subjetiva da reação, o mesmo valendo para partículas de látex revestidas com antígenos (Sanchez, 1996). A reação de Fixação do Complemento é um método que caiu em desuso por ser muito trabalhoso e necessitar de um grande número de reagentes de difícil padronização, já que depende do consumo de complemento exógeno em sistemas padronizados (Sanchez, 1996).

Os ensaios imunoenzimáticos (ELISA), utilizam antígenos solúveis do parasita que se ligam às superfícies adsorventes de placas, permitindo a adesão dos anticorpos específicos a um substrato sólido. Após lavagens, estes anticorpos podem reagir com anticorpos secundários específicos ligados a uma enzima que permite, pela reação enzimática a produtos coloridos, quantificar os anticorpos aderidos, o que têm se mostrado muito específico (Pelloux *et al*, 1998). Pela sua

praticidade, este método permite variações, como por exemplo, a captura de classes específicas de imunoglobulinas ou uso de substratos fluorescentes de alta sensibilidade (Venkatesan & Wakelin, 1993). Apesar dos ELISAs e congêneres serem os testes mais sensíveis e permitirem automação, sua alta sensibilidade prejudica a determinação temporal da época da infecção. Usualmente, utilizando-se os testes menos sensíveis como a IFI, pode-se determinar a evolução da resposta humoral da toxoplasmose. A maior sensibilidade dos ELISAs confunde este padrão classicamente definido e impede a interpretação de amostras isoladas.

A sorologia fetal ou do neonato é complicada pela presença de IgG materna transplacentária, além dos riscos da coleta, geralmente, por cordocentese (Desmonts *et al*, 1985). Sabe-se que a presença de IgM específica no sangue do infante com duas semanas ou mais de vida extra-uterina define a infecção congênita, mas a presença de IgG materna em seu sangue demora de 6 a 8 meses para o completo clareamento (Remington *et al*, 1995). Já na pesquisa pré-natal, além de ser mais segura, a análise do líquido amniótico tem sido mais sensível do que a do sangue do cordão, na determinação pela PCR da infecção pelo *T.gondii* (Foulon *et al*, 1999).

2.9. Avidéz dos anticorpos IgG

A afinidade de um anticorpo pelo seu antígeno depende de várias forças de interação podendo ser determinada quimicamente. Essa afinidade depende do ambiente químico onde a reação ocorre, sendo que a adição de substâncias pode afetar as interações químicas estáveis do anticorpo ou com o antígeno (Hedman

et al, 1993). Em um sistema policlonal e com extratos totais, a definição dessa afinidade é complexa, pois em um soro temos muitos anticorpos de diferentes afinidades e proporções contra um antígeno simples ou complexo. Nessa mistura de anticorpos, pode-se apenas estimar a soma das afinidades individuais e da proporção de cada anticorpo, somatória que foi denominada de avides (Inouye *et al*, 1984).

A medida da afinidade de anticorpos IgG contra um grupo de antígenos apresenta uma evolução característica com uma maior afinidade na dependência da maturação da resposta imune (Einsen & Siskind, 1964). Com o desenvolvimento dos testes imunoenzimáticos, a avides pôde ser ensaiada rapidamente pela eluição dos anticorpos de baixa avides com agentes caotrópicos como a guanidina, embora relatos anteriores de adição de caotrópicos à reação já haviam sido propostos (Lehtonen *et al*, 1982).

Imunologicamente, a constante seleção de clones de células B é a responsável pelo aumento progressivo de anticorpos de alta avides. Brevemente, as células que produzem anticorpos de baixa afinidade vão sendo selecionadas negativamente por apoptose no folículo, envolvendo o gene Bcl-2. Os linfócitos B de alta afinidade acumulam-se no centro germinativo onde serão selecionados para serem células de memória (Tarlinton & Smith, 2000). Assim, durante uma infecção, a avides de anticorpos reflete o tempo de maturação da resposta imune humoral à seu agente, resguardadas as diferentes meia-vidas das células e das imunoglobulinas.

A medida da avides de anticorpos IgG está consolidada em infecções virais como o Sarampo e a Rubéola (Nedeljkovic *et al*, 2001) e, em estudos vacinais de

outras infecções virais (Souza *et al*, 1997). No caso da Rubéola, que é um pequeno RNA vírus, existem poucos antígenos quando comparados à grande complexidade antigênica de um parasita, como o *T.gondii*. Uma possível simplificação deste multiplicador seria o uso de antígenos puros que fossem reagentes na fase aguda da infecção e que pudessem ser considerados marcadores dessa fase (Marcolino *et al*, 2000). Foram propostos os antígenos puros do *T.gondii*, como o ROP 2 e SAG 1 (Martin *et al*, 1998), mas a oferta dos antígenos, na doença humana, é variável com freqüentes falsos negativos que dificultam a interpretação dos testes (Marcolino *et al*, 2000).

Apesar do teste de avidéz estar despontando como um bom auxiliar no diagnóstico da infecção recente, existem problemas metodológicos que implicam em sua melhor padronização, um desses problemas é o uso do agente caotrópico, tendo já sido preconizados o uso da Uréia (Camargo *et al*, 1991), DEA (Dietilamina) (Thomas & Morgan-Capner, 1991) e NH_4SCN (Tiocianato de Amônio) (Pullen *et al*, 1986), cada um em concentrações variáveis. Outro fator importante é se o método de escolha é o de diluição, em que o agente caotrópico é o diluente do soro, ou se o método é o de eluição, em que o agente caotrópico é utilizado na lavagem da placa após a incubação do soro. O princípio da eluição com NH_4SCN foi inicialmente usado para o diagnóstico da infecção aguda em suspeita de Rubéola congênita (Pullen *et al*, 1986), mostrando valores mais elevados que os encontrados no sistema de diluição (Hedman *et al*, 1993). Esta mensuração mais simples realmente resulta em concentrações do caotrópico mais elevadas do que as encontradas em sistemas de diluições, mas o fato é atribuível à interação do anticorpo com o epítopo, que no sistema de diluição oferece ao

caotrópico todos os sítios de ligação ao antígeno, enquanto que na eluição, os sítios externos são os primeiros a serem afetados (Bata *et al*, 1964). Os ensaios de eluição têm se mostrado muito específicos para o diagnóstico da fase aguda da Rubéola, apresentando uma baixa avidéz nos primeiros dois meses a partir dos sintomas da infecção, e são executados sempre após testes convencionais para detecção de IgG e IgM, bem como, para desvendar IgM prolongada ou falso-positiva, principalmente em gestantes (Hedman & Rosseau, 1989).

O agente caotrópico mais usual é a uréia, que é utilizada na maioria dos ensaios em modelo de eluição. O poder caotrópico da uréia é inferior ao do Tiocianato de Amônio e do Tiocianato de Sódio em bases químicas e em pH neutro (Stankus e Leslie, 1976; Almeida *et al*, 1979), enquanto a Dietilamina e outros agentes tem seu poder caotrópico associado ao pH (Hedman *et al*, 1993). A multiplicidade de escolha dos agentes caotrópicos dos vários estudos é o principal problema de comparação dos ensaios de avidéz e sua padronização (Suzuki *et al*, 2001).

As infecções congênitas sempre foram associadas a um grupo de microorganismos devido à dificuldade diagnóstica da doença materna e quadros sindrômicos que resultavam no nascimento de fetos afetados, mas viáveis. Elas são denominadas de TORCH (Toxoplasma, Rubéola, Citomegalovirose e Herpesviridae), às vezes com associação também com sífilis congênita (TORCHES) (Remington *et al*, 1995).

Obviamente, os estudos de avidéz em Rubéola congênita abriu espaço para o uso desse teste em patologias semelhantes, dentre elas a toxoplasmose (Hedman *et al*, 1993; Camargo *et al*, 1991). Hoje, já existem testes comerciais e a

padronização dos mesmos é feita por conjunto de soros polares de baixa e de alta avides, sendo que freqüentemente existe discordância entre os ensaios (Barbieri *et al*, 2001). É interessante notar que atualmente, a maioria dos relatos se faz em estudos multicêntricos (Sensini *et al*, 1996; Roberts *et al*, 2001; Barbieri *et al*, 2001), principalmente na Europa, sendo que nos Estados Unidos o teste de avides para *T.gondii* deve ser realizado em um Centro de Referência como o CDC. A resolubilidade dos testes de avides na definição da doença aguda é auxiliar e complexa. É mais aceito que o poder seletivo do teste de avides é representado pela sua capacidade de definir infecção recente em soros com baixa avides, mas não sua capacidade de definir infecção tardia pelo achado de alta avides (Paul, 1999 ; Ashburn *et al*, 1998 ; Cozon *et al*, 1998). Assim, em um caso de anticorpos IgG de baixa avides, é bastante provável que o soro provenha de uma gestante com infecção recente, mas o achado de avides intermediária ou alta, por vezes ocorrendo em infecções recentes, não afasta o risco de infecção fetal.

Vários relatos têm mostrado que a avides dos anticorpos IgG é um bom índice da época da infecção, definindo-a como tendo ocorrido até entre um período de 6 a 8 meses da coleta, tempo em que os anticorpos de baixa avides ainda não foram substituídos pelos de alta avides (Jones *et al*, 2001). Após este período, a infecção é caracterizada pela produção de anticorpos de alta avides, que são mantidos ao longo da vida do indivíduo (Souza *et al*, 1997). A determinação da avides de anticorpos em gestantes suspeitas de infecção aguda mostrou que este teste é melhor que a mera detecção de IgM na previsão da infecção recente, já que essa classe de anticorpo pode persistir por um tempo maior na circulação, como já mencionado anteriormente, denotando uma falsa

visão de infecção recém adquirida. Contudo, não se pode ignorar os problemas inerentes à metodologia que implicam em sua melhor padronização (Suzuki *et al*, 2001; Villavedra *et al*, 2001), visto que não há uma padronização internacional sobre o tipo e concentração de agente caotrópico, nem da abordagem matemática ou bioquímica para sua determinação. Assim, existem vários relatos de resultados conflitantes em diferentes ensaios comerciais com variabilidade na dependência do tipo de antígeno utilizado na placa, diluição do soro e tipo de sistema de revelação empregado. Além disso, não há disponibilidade de soros com avides conhecida para intercâmbio entre os vários laboratórios.

Têm sido propostas várias maneiras para o cálculo da avides de anticorpos em ensaios de eluição. Uma delas, baseia-se no desvio da curva de titulação de anticorpos obtida após lavagem com uma única concentração do caotrópico (Inouye *et al*, 1984), expressando o valor obtido na diluição teórica que apresentasse uma absorbância de 1.0. Em estudos epidemiológicos, o modelo mais utilizado consiste em uma única diluição do soro que é tratado com uma única concentração de caotrópico (Machado *et al*, 2002), tendo sido utilizado também em antígenos mais simples como o da rubéola. Outros grupos preferem utilizar a concentração de caotrópico que retire 50% dos anticorpos. A não linearidade das reações imunoenzimáticas complica todas essas abordagens, pelo fato de que várias medidas exponenciais interferem no valor da absorbância encontrada, tendo sido proposta uma linearização da estimativa em curvas de titulação para solucionar o problema (Korhonen *et al*, 1999).

Todas essas bases de cálculos apenas resultam em diminuição cumulativa dos erros matemáticos, e encarecimento do processo pelo uso de muitas

dosagens para uma mesma determinação, freqüentemente sem aprimoramento da resolubilidade da reação.

A inclusão de pacientes no grupo sob suspeita de toxoplasmose congênita é dependente das condições de saúde pública de cada região. A alta prevalência da toxoplasmose em uma região faz com que grande parcela das gestantes atinja a idade fértil já tendo tido contato com o agente e, conseqüentemente seja capaz de proteger o feto desta infecção (Remington *et al*, 1995). Em países de baixa prevalência, o risco de infecção fetal é mais baixo, o que torna a pesquisa pré-natal indiscriminada pouco eficiente. Nos países com incidência intermediária ou padrões epidemiológicos mais complexos, a toxoplasmose congênita ocorre com maior freqüência devido a um maior número de gestantes sem contato prévio com o agente o que leva à uma incidência significativa da doença. Infelizmente, no caso do Brasil, e especialmente de São Paulo, a prevalência e a incidência do *Toxoplasma gondii* situam-se no limite entre o grupo intermediário e o grupo de alta incidência, embora estejamos entre os países de maior incidência mundial e, provavelmente com risco menor de toxoplasmose congênita (Guimarães *et al*, 1993).

Qualquer que seja a incidência local, o problema do diagnóstico da infecção materna só pode ser comprovado absolutamente pela detecção de soroconversão, o que pressupõe duas medidas sorológicas, já que este é o único método factível em grandes populações. Infelizmente, em nosso meio, os serviços públicos de pré-natal, geralmente, recebem as pacientes em idade gestacional avançada (>3 meses), quando da primeira coleta sorológica, a qual apresentou resultado positivo para IgM anti-*T.gondii* (Giraldo *et al*, 2002). No entanto, estes resultados

são baseados em reações de baixa sensibilidade, com interferência de altos títulos de IgG em IFI que resultam na negatificação do teste, embora ainda persistam níveis baixos de IgM no soro não detectáveis pelo método. Dessa forma, a introdução de novos métodos mais sensíveis, com reagentes comerciais, possibilitam uma melhor discriminação do teste e, conseqüentemente, da população considerada em risco de infecção congênita.

Dado a alta incidência da toxoplasmose em nosso meio, é provável que a população de pacientes testada apenas por meio de dosagem de IgM, resulte em um número significativo de gestantes no programa com infecção recente mas anterior à concepção e, portanto, sem risco de transmissão congênita (Pires, 1999). Ao obstetra atendente resta apenas introduzir a terapia mais benigna e encaminhar a paciente para centros terciários com maior poder diagnóstico.

No Hospital da Clínicas da FMUSP, um tradicional Hospital terciário, o atendimento de gestantes é feito somente em caso de risco materno ou fetal. Para esse serviço são encaminhadas pacientes sob suspeita de patologias da gestação, incluindo infecções fetais, de toda a rede pública da cidade de São Paulo. Um dos critérios para encaminhamento é a presença de IgM específica anti-*T.gondii*, detectada por qualquer método laboratorial executado na rede conveniada, associado à introdução de terapia com Espiramicina no conhecimento do resultado do teste. Esse tipo de triagem é cara pela introdução da terapia além de causar sérios problemas psicológicos na gestante devido ao risco fetal.

Assim, a introdução dos testes de avidéz nesta população, poderia resultar na diminuição do custo e maior tranquilidade à gestante, assim como acompanhamento pós-natal otimizado dos conceitos. Além disso, o estudo de

várias técnicas de determinação da avidéz de anticorpos IgG, em uma população menos polarizada, permitiria verificar a eficiência relativa desta determinação e sua capacidade para definição individual da época da infecção.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Comparar as reações para a pesquisa de avidéz de anticorpos IgG para *T.gondii* em gestantes com risco de infecção pela presença de títulos significativos de IgM anti-*T.gondii*, que procurarem a Clínica de Obstetrícia do HCFMUSP, com suspeita diagnóstica de toxoplasmose congênita, pela presença de sorologia positiva para IgM anti- *T.gondii*, feita externamente ao serviço.

3.2. Específicos

1. Comparar as reações de avidéz comercial com as reações executadas no serviço, utilizando Uréia 6M como agente caotrópico.
2. Comparar as reações de avidéz com Uréia 6M com outras concentrações deste caotrópico no sistema.
3. Comparar as reações de avidéz com Uréia 6M com reações feitas com o uso de NH_4SCN como caotrópico.
4. Comparar as reações de avidéz com Uréia 6M com determinação bioquímica da concentração de NH_4SCN que retira 50% dos anticorpos.
5. Comparar as reações de avidéz 6M feitas com uma única determinação do soro, com a determinação do desvio de uma curva de diluição do soro induzido pela Uréia 6M.
6. Comparar a avidéz determinada com Uréia 6M em extrato total de *T.gondii* com a reação de avidéz utilizando como antígeno a proteína recombinante Rop 2, produzida em sistema bacteriano, usando como agentes caotrópicos a Uréia e o NH_4SCN .
7. Comparar os vários métodos entre si, a partir da sorologia materna confirmada no laboratório, tanto para IgM como para IgA.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais:

Todos os sais e demais reagentes utilizados foram de qualidade pré-análise, sendo a água utilizada purificada em sistema Milli Q, apresentando resistividade de 18 mega Ω . Reagentes específicos terão sua fonte citada ao longo do texto.

4.1.1. Parasitas

Os parasitas utilizados para a preparação dos antígenos foram taquizoítos de *T.gondii*, cepa RH (Sabin e Feldman, 1948), que são mantidos criopreservados em N₂ no Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, e ampliados por meio de passagens sucessivas em camundongos Swiss (não isogênicos) com o peso variando entre 20 e 22 gramas e com idade variando entre 30 e 60 dias, por meio de lavagem do peritônio com solução salina ou salina tamponada com fosfato – NaCl 0,15M/tampão fosfato de sódio 0,01M pH 7,2 (PBS), contendo gentamicina (40 μ g/ml) e subsequente inóculo intraperitonal (i.p) de 0,2 ml de exsudado em novos animais.

4.1.2. Animais Experimentais

Camundongos machos não isogênicos Swiss, todos com peso entre 20 e 22g, foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina/USP, mantidos no Biotério do Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo em gaiolas de plástico com maravalhas de pinho autoclavadas, recebendo ração comercial Nuvital e água *ad libitum*. Previamente

ao inóculo, animais amostrais foram avaliados quanto à sua sorologia a antígenos de *T.gondii* pelo método de IFI, sendo utilizados lotes cujas amostras apresentaram resposta negativa. Todos os procedimentos com animais seguiram as normas descritas em “Principles of Laboratory Animal Care ”(NHI Publication nº 86-23, revised 1985) e nos “Princípios de Ética na Experimentação Animal” (COBEA), tendo tido aprovação das comissões de Ética do Hospital da Clínicas (nº 365/2000), do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo e do Instituto de Ciências Biomédicas (nº 115/2001).

4.1.3. Obtenção de amostras sorológicas

As amostras de sangue materno foram colhidas no serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, de pacientes com período gestacional entre 17 e 30 semanas, encaminhados ao Grupo de Infecção Fetal por indicação externa, trazendo sorologia positiva para IgM anti-*T.gondii* no encaminhamento médico. Nenhuma informação adicional sobre este exame, exceto a referência médica, estava disponível para estudo. As sorologias foram executadas pelo Sistema Único de Saúde ou hospitais conveniados, sem referência sobre o ensaio utilizado, sendo apenas referidas como positivas pelo solicitante do encaminhamento, responsável pela introdução de Espiramicina para prevenção da toxoplasmose congênita. As gestantes eram informadas sendo documentado o consentimento informado da gestante (consentimento no anexo I). A informação para o consentimento foi feita pelo obstetra atendente, baseada em um formulário, contendo pontos de checagem para os itens importantes, onde eventuais riscos ou procedimentos são

descritos, já que havia a possibilidade de punção para coleta de líquido amniótico. Não houve suspensão do tratamento de Espiramicina em nenhum momento do seguimento até o parto. O critério de inclusão da gestante no protocolo foi o mesmo utilizado pela Disciplina de Obstetrícia da FMUSP e aprovado pela Comissão de Ética do HCFMUSP, o qual se baseia na confirmação da presença de IgM no soro materno pela técnica de IFI, realizada após teste positivo em qualquer outro método diagnóstico.

Das gestantes que concordaram na participação, era colhida nova amostra de soro, geralmente entre 20-40 dias da coleta executada anteriormente para encaminhamento. Todas as amostras para a finalidade prevista nesse protocolo foram devidamente armazenadas, e eventualmente poderão ser utilizadas em projetos com finalidade semelhantes, conforme definido no consentimento.

O prosseguimento do atendimento era feito na conduta da Clínica Obstétrica, de acordo com o protocolo instituído, sendo de responsabilidade do grupo de infecção fetal. As gestantes eram submetidas regularmente a ultrassonografia morfológica, sorologia seqüencial e, por indicação ultrassonográfica era feita punção de líquido amniótico, que foi ensaiado para isolamento de *T.gondii* em camundongos e células em cultura, PCR e outros. Os bebês nascidos das mães suspeitas estão em acompanhamento tanto voluntário como por busca ativa.

4.2. Métodos:

4.2.1. Recepção e estocagem das amostras

As amostras de sangue chegavam no Laboratório de Protozoologia em tubos próprios, e eram centrifugadas imediatamente a uma rotação de 2000 rpm

por 15 minutos; em seguida o soro era armazenado até o ensaio em tubos de congelamento identificados com dados da paciente e local de origem.

4.2.2. Obtenção do antígeno de *T.gondii* (Mineo, 1982)

A obtenção do antígeno foi feita a partir de exudatos peritoneais contendo taquizoítos de *T.gondii*, obtidas através de inoculação prévia em camundongos e processado como descrito, com pequenas modificações (Mineo, 1982). Brevemente, o exudato peritoneal de animais infectados era livre de células do hospedeiro por centrifugação diferencial, lavado com PBS e o pellet suspenso em PBS e contado em Câmara de Neubauer. Após nova centrifugação, ao pellet era adicionada água destilada, para permitir uma concentração de 10^8 parasitas/ml. A suspensão de parasitas foi submetida à ruptura sônica (Sonic Dismembrator, Quigley-Rochester Inc., USA), a 40 ciclos por 5 a 10 períodos de 30 segundos, em banho de gelo, até que ocorresse lise completa dos parasitas, sob observação em microscopia de contraste de fase. Em seguida acrescentou-se igual volume de solução de NaCl 0,3 M para isotonizar a suspensão, e centrifugou-se a 10.000g por 30 minutos a 4°C, em centrífuga refrigerada Eppendorf 5403, sendo que o sobrenadante foi usado como antígeno salino solúvel total. A dosagem de proteínas foi feita pelo método de Bradford (Bradford, 1976), usando gama-globulina humana como padrão. Este sobrenadante foi distribuído em alíquotas de 0,5 ml, armazenadas a -70°C.

4.2.3. Ensaio imunoenzimático padrão para determinação de IgG e IgA anti *T.gondii* (Venkatesan & Wakelin, 1993).

As placas de 96 poços de poliestireno (CORNING®) foram sensibilizadas com extrato antigênico de *T.gondii*, como descrito acima, (10 µg/ml), diluído em PBS, ou tampão NH₄SCN, 5M pH 7.0 ou Uréia 8M pH 7.0, na dependência das reações subsequentes, e incubadas durante 20 horas à temperatura de 4°C em câmara úmida. A seguir, a placa foi lavada 4 vezes, por 5 minutos com PBS contendo 0,02% de Tween 20 (PBST), também utilizada nos demais passos onde o sistema é lavado, a menos que especificado. Os eventuais sítios livres de adsorção foram bloqueados com uma solução de leite desnatado a 3% em PBSTL durante 1 (uma) hora em estufa à 37°C. Após a incubação, as placas foram lavadas e aplicadas as amostras de soro diluídas em PBSTL e em seguida incubadas à 37°C por uma hora. Após lavagem, foi adicionado o conjugado anti-IgG ou anti-IgA humana marcada com peroxidase (Sigma®), e novamente incubadas como descrito anteriormente. Em seguida, foram feitas mais 4 lavagens e a reação foi revelada com a adição de solução Citrato de Sódio 0,05M pH 5,8, contendo OPD 0,4mg/ml e H₂O₂ 0,03% e permaneceu por 30 minutos em câmara escura à temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de HCl 4N, seguida da leitura das densidades ópticas (D.O.) em leitor de microplacas automático, em comprimento de onda de 492 nm (Labsystem Multiskan MS).

4.2.4. Teste de Imunofluorescência Indireta para determinação de IgG e IgM anti *T.gondii* (Camargo, 1974)

O ensaio iniciou-se com o preparo dos taquizoítos de *T.gondii* para fixação nas lâminas, os mesmos foram colhidos da cavidade peritoneal de camundongos

infectados com a cepa RH. Em seguida, deu-se a centrifugação do material por 15 minutos, a 3.000 rpm e 4° C. Logo após, o sedimento foi lavado com 10 ml de meio Eagle contendo 1% de Albumina Bovina e centrifugado. O pellet era suspenso na concentração de 10^7 taquizoítos/ml na mesma solução e lentamente adicionado, durante 45 minutos, a 37° C sob agitação constante de 1 volume de Formaldeído a 4% (MERCK®), em meio Eagle contendo 0,1% de albumina bovina. A solução era centrifugada e lavada por mais duas vezes com PBS em microcentrífuga, 6.000 rpm por 5 minutos, e finalmente re-suspensa em PBS na concentração de 10^7 parasitas/ml. Em seguida, a solução formolizada foi aplicada (10 µl por orifício) e imediatamente aspirada em lâminas de vidro especial para IFI (PERFECTA®), secas a temperatura ambiente com jato de ar frio e armazenadas para uso à 4° C. No momento do ensaio, as lâminas armazenadas receberam 10 µl de soros de pacientes diluídos serialmente (1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024), por poço, com incubação durante 30 minutos a 37°C em câmara úmida, para que se formasse o complexo antígeno - anticorpo. Após três lavagens de 5 minutos com PBS 0,01M pH 7.2, as lâminas foram incubadas por 30 minutos a 37° C com 10 µl de conjugado de fluoresceína anti- imunoglobulina humana (IgG ou IgM) diluída em solução Azul de Evans 0,01% em PBS. Em seguida, as lâminas foram lavadas novamente com PBS. Após a secagem das lâminas, as mesmas foram montadas com glicerina tamponada com carbonato-bicarbonato 0,5M pH 8.5 sob lamínulas, e lidas por dois observadores treinados em microscópio de epifluorescência, com sistema de filtros para fluoresceína, lâmpada de mercúrio de 100V e objetiva com aumento 40.

Em todos os testes foram incluídas diluições dos soros padrão positivo e negativo. O título do soro foi considerado aquele de máxima diluição ainda capaz de fornecer alguma reatividade superficial do parasita. Não foram consideradas fluorescências nucleares na análise da reação, somente a reatividade superficial bem delimitada ou apical do parasita.

4.2.5. Determinação das reações de avides de IgG

4.2.5.1. Avides na diluição 1/100 do soro na recepção (AVD)

Este teste foi feito baseado no descrito na literatura e foi considerada a avides clássica utilizada na definição de padrões de avides (Jenun *et al*, 1997). Foi seguido o mesmo procedimento do ELISA acima descrito, com modificações apenas na solução de sensibilização da placa, utilizando Uréia 8M como solvente do antígeno. Em uma duplicata de cada amostra era feita uma lavagem adicional com solução de Uréia 6M, durante 10 minutos, logo após a lavagem das amostras (soro das pacientes) com PBSTL e antes da aplicação do conjugado de revelação. Os poços controles eram mantidos imersos em PBSTL durante a incubação dos poços com uréia. Após a aplicação do conjugado e lavagem, era procedida a revelação, e a absorbância em todos os poços era determinada. A porcentagem de avides foi estimada entre a absorbância medida no poço lavado com uréia e a obtida no poço controle (100%), excluídos os valores basais da reação do conjugado com o antígeno. Somente foram ensaiados soros positivos ao ELISA prévio para IgG. Qualitativamente, foram considerados de baixa avides os soros que apresentaram uma avides menor que 50% e de alta avides os soros que

apresentaram avidéz maior que 75%, sendo os demais considerados de reação intermediária.

4.2.5.2. Avidéz comercial por EIA (Enzyme-immunoassay) Sistema Vidas para detecção de IgG e Avidéz de anticorpos IgG

O ensaio foi executado no laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento da Biolab-Merieux em São Paulo, por gentil oferta do Prof. Dr. Antonio Walter Ferreira, sendo possível sua realização em 15 amostras, selecionadas aleatoriamente. Todo o procedimento foi supervisionado e seguiu-se estritamente as instruções do fabricante. Brevemente, as amostras foram colocadas na cúpula correspondente na barrete, a mesma contém compartimentos com os reativos prontos para uso (tampão de lavagem, conjugado e substrato). O cone previamente sensibilizado com o antígeno era deslocado para cada compartimento; sendo que a amostra, o tampão de lavagem, o conjugado específico de fosfatase alcalina e o substrato eram aspirados e refluídos, formando assim, o complexo antígeno - anticorpo dentro do cone. O substrato desse Kit é o 4 Metil Umbeliferil Fosfato. O produto final da reação sofreu uma excitação de 370 nm, emitindo uma fluorescência a 450 nm cuja intensidade é captada por um sensor, e seu resultado (Valor Relativo de Fluorescência) foi calculado e convertido pelo computador em um resultado final do teste. O teste fornece apenas resultados qualitativos, definidos como baixa avidéz, alta avidéz e avidéz intermediária.

4.2.5.3 – Modificações da reação de avides utilizando Uréia como agente caotrópico

Os soros foram testados em duas modificações da reação de avides com antígeno salino de *T.gondii*, utilizando o ensaio padronizado anteriormente com as seguintes modificações. Na primeira modificação, utilizamos apenas a alteração da concentração de Uréia, que passou para 8M, mantendo intactas as condições de pH, tempos de incubação e lavagem e cálculo da avides. Esta medida foi chamada de AVU8. Em outra modificação do método, utilizamos uma diluição seriada de cada soro, nas diluições 1/100, 1/1000, 1/10000 e 1/100000, seguida de lavagem com Uréia 6M como anteriormente descrito. Nesse ensaio foi possível determinar dois critérios de avides. O primeiro critério utilizado foi a determinação da avides em uma diluição do soro onde a Absorbância da reação de ELISA estava contida entre os limites de 0.4 e 2.5, no poço sem Uréia, sendo denominada AVB, sendo avaliados qualitativamente da mesma forma que a avides clássica, acima descrita.

A segunda medida foi estimada graficamente a partir da medida física do desvio da curva de diluições seriadas do soro promovida pela lavagem com a Uréia, como descrito na literatura (Korhonen *et al*, 1999). Os dados foram colocados em um gráfico Log-Log entre a Absorbância do ELISA e o Log da diluição na base 10, dentro de um pacote estatístico Graph Pad Prism 3.0. A seguir, na absorbância 1.0 (Log 0) era determinada a medida física do desvio, em unidade de Log de diluição. Para exemplo, mostramos na Figura 3, duas determinações, em soros de baixa avides e alta avides, mostrando o tipo de desvio obtido.

Estas medidas foram qualitativamente definidas como soros de baixa avidéz aqueles cujo desvio era maior que 1, soros de alta avidéz aqueles com desvios menores que 0.5 e com avidéz intermediária os contidos fora dos intervalos citados, sendo denominada como DESVIO.

Figura 3- Determinação da movimentação da curva de absorbância induzida por diferentes concentrações de soro, antes e após lavagem com uréia 6M, expressa em log de concentração. Legenda: Baixa avidéz: negro, Alta avidéz: vermelho, Símbolos abertos: normal; fechados: + uréia. Linhas pontilhadas em vermelho: retas de regressão. Linha pontilhada em negro ponto de Log A. 0 ou A. 1.0.

4.2.5.4 – Modificações da reação de avidéz de IgG anti *T.gondii* utilizando Tiocianato de Amônio (NH_4SCN) como agente caotrópico.

A utilização da determinação da avidéz de IgG utilizando NH_4SCN foi feita sempre utilizando placas adsorvidas com extrato salino de *T.gondii* dissolvido em

NH₄SCN 5M pH 7,0. As reações foram realizadas basicamente como a descrita acima para a avidéz clássica, diferenciando-se somente no ponto em que a lavagem com caotrópico foi feita com soluções de NH₄SCN. Assim, utilizamos duas soluções de lavagem com este agente caotrópico, a saber 0.5M (AVS), 1M (AV1M). Os procedimentos foram semelhantes, assim como a determinação da avidéz, tanto quantitativa como qualitativa.

Uma das características da utilização do NH₄SCN é a possibilidade de retirada de toda a IgG, inclusive a de alta avidéz, fato que não é possível com a Uréia, cuja diluição máxima (10M) não é capaz de retirar toda a imunoglobulina ligada ao antígeno. Isto permite estimar a concentração de NH₄SCN que é capaz de retirar 50% dos anticorpos, o que é bioquimicamente mais adequado que medidas isoladas em concentrações definidas de caotrópico. Visando padronizar esta medida, utilizamos 07 (sete) amostras de soro de gestantes do Grupo de Infecção Fetal do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do HCFMUSP, que foram submetidas ao ELISA, seguido de lavagem com concentrações crescentes de NH₄SCN, variando entre 0,5M e 6M, comparado a determinação clássica utilizando Uréia 6M. Os vários dados foram analisados em um modelo sigmoidal dose resposta com inclinação variável, que fornece o valor da CE 50% de NH₄SCN. Estes dados de padronização podem ser vistos na figura 4, tanto para a determinação da CE50% como sua relação com avidéz com Uréia 6M clássica, mostrando que existe uma boa relação entre esta medida e a avidéz clássica, permitindo sua qualificação em baixa avidéz com CE50% < 1M, alta avidéz CE50% > 2 e avidéz intermediária para os valores intermediários.

Figura 4. Determinação da CE50% de Tiocianato de Amônio com índice de avidez. A Determinação da CE50% e a curva estimada em cada modelo. B- Correlação entre os valores de CE50% e a avidez clássica determinada com Uréia 6M. Linhas representam a correlação e as linhas pontilhadas o intervalo de confiança da correlação. Os valores de r^2 da curva foram incluídos.

4.2.5.5 – Reações de ELISA e determinação da avidéz, utilizando como antígeno a proteína recombinante Rop 2 (Martin *et al*, 1998)

Uma vez que populações de anticorpos e antígenos estavam envolvidos na reação de avidéz, padronizamos um ensaio onde pelo menos a fração antigênica fosse constituída basicamente de um pequeno grupo de antígenos e epítomos. Para tanto, utilizamos uma proteína recombinante pura de *T.gondii*, antígeno de rópria 2 ou Rop 2, produzido em sistemas bacterianos e gentilmente fornecido purificado pelo Prof. Sergio Angel (Martin *et al*, 1998). Este antígeno foi dissolvido em NH₄SCN 5M pH 7.0 e adsorvido as placas convencionais de ELISA, em duas concentrações; a sua reatividade foi medida contra grupos de soros padrões positivos e negativos, em reações clássica de ELISA, como anteriormente descrito. As curvas médias destas padronizações e as reatividades das várias diluições podem ser vistas na figura 5. Nela podemos observar claramente que uma concentração alta de antígeno adsorvido na placa resultava em elevados níveis de reatividade basal, enquanto que a dose menor apresentava uma menor adesão do conjugado. Assim e de acordo com a disponibilidade do antígeno optamos por utilizar a concentração de 5 µg/ml em NH₄SCN 5M pH 7,0, que permitiria executar não só a determinação da presença de anticorpos específicos contra esta proteína na população estudada, mas também ensaiar a determinação da avidéz neste sistema, utilizando pelo menos duas lavagens com agentes caotrópicos diferentes. Para tanto, placas revestidas com 5 ug de rRop2 foram ensaiados com a diluição 1/100 dos soros constantes de nossa amostragem sendo processadas para a determinação da reação de ELISA, num modelo

clássico como acima descrito, sendo obtido um cut-off de 0.200, utilizando 20 dosagens de soros negativos, baseadas na média acrescida de 02 desvios padrões, cujo limiar incluía todas as medidas negativas utilizadas no ensaio. Além disso, foi procedida a determinação da avidéz com dois tipos de agentes caotrópicos, a saber Uréia 6M e NH_4SCN 0.5M, executadas de maneira semelhante a determinação clássica da avidéz acima descrita. Os valores qualitativos e quantitativos foram calculados da mesma forma que a avidéz clássica acima descrita.

Figura 5. Reação de ELISA utilizando rRop 2 com o antígeno para *T.gondii*. A. Placa adsorvida com 5 µg/ml de antígeno B- Placa adsorvida com 2 µg/ml de antígeno. Linha preta soro positivo, linha azul soro negativo. A área hachurada de cada gráfico representa o cut-off de negatividade de cada reação, baseada na média acrescida de dois desvios padrões de 10 soros negativos na diluição 1/100 ensaiados para cada antígeno.

4.2.6 – Comparações entre reações sorológicas das amostras para as várias imunoglobulinas testadas e a determinação da avidéz em todos os métodos realizados.

Para esta comparação utilizamos um software estatístico Statistica 5.0, utilizando a comparação qualitativa entre a reatividade das amostras, ou seja, a

positividade ou negatividade para cada uma das imunoglobulinas e o tipo de avidéz encontrada em cada determinação (baixa, intermediária ou alta), utilizando os testes não paramétricos de Chi-quadrado, utilizando uma correlação não paramétrica de Spearman entre os eventos.

Para a comparação quantitativa dos títulos e cada índice isolado de avidéz, utilizamos a correlação paramétrica de Pearson e seus seguimentos ou a comparação de ANOVA ou a comparação de Kruskal Wallis não paramétrica entre a media dos títulos para os soros de cada grupo de avidéz determinada em cada técnica.

Para a determinação da correlação entre medidas de avidéz fornecidas pelos vários métodos utilizamos a correlação paramétrica de Pearson e seus seguimentos.

5. RESULTADOS

5.1. População de estudo

No decorrer do nosso trabalho, foram disponíveis para os testes 160 amostras de soros de gestantes, colhidas entre Abril de 1999 e Outubro de 2001. Estas gestantes eram encaminhadas através de uma guia redigida por médico da rede pública de Saúde, justificado pela positividade do teste sorológico de IgM anti-*Toxoplasma gondii*. Ocasionalmente informações adicionais, como título ou valor do exame eram apresentados, mas na maioria das vezes o encaminhamento não trazia informações adicionais sobre a qualidade do teste ou o tipo de ensaio empregado na detecção. Na admissão ao hospital, era colhida nova amostra de soro, a paciente era informada sobre o protocolo de pesquisa, e em caso de seu consentimento, esta coleta era utilizada em todos os ensaios do projeto. A idade média das gestantes foi de 24,31 anos (DP 6,452) variando entre 15 e 42 anos. As pacientes eram reavaliadas após 15 dias, já com os resultados confirmatórios da sorologia, cujos dados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Distribuição de freqüências de positividade nas reações de detecção de IgG anti-*T.gondii*, ELISA e IFI, comparadas quanto a positividade para IgM

	IFI IgM		
	Negativa	Positiva	Totais
IgG ELISA e IFI negativas	13	3	16
%	8.13%	1.88%	10.00%
IgG ELISA negativa e IFI positiva	0	0	0
%	0.00%	0.00%	0.00%
IgG ELISA negativas	13	3	16
%	8.13%	1.88%	10.00%
IgG ELISA positiva e IFI negativa	1	1	2
%	0,63%	0.63%	1.25%
IgG ELISA e IFI positivas	107	35	142
%	66.88%	21.88%	88.75%
IgG ELISA positivas	108	36	144
%	67.50%	22.50%	90.00%
Total	121	39	160
%	75.63%	24.38%	

Como pode ser observado, 16 gestantes apresentavam resultados negativos para IgG anti *T.gondii* em ambos os testes, sendo excluídas do estudo por ausência de confirmação da infecção pelo *T.gondii*. Houve um pequeno número de verdadeiros falsos positivos para IgM neste grupo (03 pacientes) que também foram excluídas dado o tempo de latência entre as duas coletas, que certamente resultaria em positividade da reação de IgG (Giraldo *et al*, 2002).

Assim, nossa amostra para comparação entre métodos de determinação da avidéz constava de 144 amostras de gestantes, com IgG em IFI ou ELISA positivas. Neste grupo a grande maioria das pacientes apresentava reação

negativa para IgM em IFI (75,63%), sendo que apenas 36 pacientes mantiveram os resultados de positividade obtidos externamente.

Na admissão, para orientação parcial do grupo obstétrico, era determinado o índice de avidéz em uma reação clássica, utilizando antígeno salino de *T.gondii*, soro diluído 1/200 e lavagem com Uréia 6M, como descrito em métodos. A determinação qualitativa deste índice permitiu a determinação da freqüência em grupos selecionados para as duas classes de imunoglobulinas detectadas pela IFI, que pode ser vista na tabela 2.

Tabela 2. Frequência da Avidéz clássica em relação à IFI

IgG IFI	IgM IFI	Avidéz clássica			
		Baixa avidéz<50%	Intermediária	Alta Avidéz >75%	Totais
Neg	Neg	0	1	0	1
%		0.00%	.69%	0.00%	.69%
Neg	Pos	0	0	1	1
%		0.00%	0.00%	.69%	.69%
Neg		0	1	1	2
%		0.00%	.69%	.69%	1.39%
Pos	Neg	0	21	86	107
%		0.00%	14.58%	59.72%	74.31%
Pos	Pos	2	9	24	35
%		1.39%	6.25%	16.67%	24.31%
Pos		2	30	110	142
%		1.39%	20.83%	76.39%	98.61%
Total		2	31	111	144
%		1.39%	21.53%	77.08%	

Pode-se observar que a grande maioria das gestantes (97,6%), apresentavam índice de avidez maior que 50%, indicando um tempo mais longo de infecção.

Independente deste resultado, o grupo clínico executou rotineiramente ultrassonografia morfológica fetal em intervalos regulares em todas as gestantes, para acompanhamento da saúde fetal, especialmente voltado para alterações do sistema nervoso central, presença de hepatoesplenomegalia, ascite e sinais clássicos de comprometimento fetal. Em alguns casos, onde as alterações fetais poderiam estar presentes, era feita uma coleta de líquido amniótico (12 pacientes) sob indicação obstétrica. O líquido foi encaminhado para pesquisa de ácidos nucléicos do agente por PCR (Mondragon *et al*, 1998) e isolamento do agente em cultivo de tecido (Howe *et al*, 1997). Nenhuma amostra resultou em isolamento do agente e os resultados obtidos na reação de PCR podem ser vistos na tabela 3, onde se nota uma alta frequência de resultados positivos, independentes do índice de avidez materno.

Tabela 3. Distribuição da positividade da reação de PCR para *T.gondii*, em coletas por suspeita ultrassonográfica

	Reação de PCR para <i>T.gondii</i>		
	Positiva	Negativa	Total
Baixa avidez<50%	1	1	2
%	8.33%	8.33%	16.67%
Intermediária	3	0	3
%	25.00%	0.00%	25.00%
Alta avidez>75%	5	2	7
%	41.67%	16.67%	58.33%
Total	9	3	12
%	75.00%	25.00%	

A positividade da reação de PCR instituiu uma mudança de conduta nas gestantes, até então mantidas com Espiramicina, sendo introduzido terapia agressiva com Sulfa e Pirimetamina, até o parto. Após o parto, todos os nascidos não apresentavam seqüelas ou sinais de infecção pelo *T.gondii* na avaliação física e laboratorial normal, quando o parto era feito no Serviço de Obstetrícia do HCFMUSP, o que não foi freqüente. Houve busca ativa para seguimento dos nascidos com avaliação física, sorologia e oftalmoscopia, não sendo confirmada a infecção fetal em nenhuma criança até o momento. Não houve relação entre a positividade na reação de PCR e outros dados clínicos ou laboratoriais.

5.2. Convalidação com testes comerciais

Para convalidação das reações de avidéz executadas, foram processadas gentilmente pelo Biolab Merrieux, 15 amostras aleatórias dos soros para avaliação da escolha do teste de avidéz in-house que seria utilizado como padrão. Para tanto as amostras foram comparadas por correlação entre as avaliações semiquantitativas dos vários ensaios resultando na tabela 4.

Tabela 4 – Correlação entre as avaliações dos vários ensaios de avidéz

	Correlação com Avidéz comercial N= numero de amostras testadas Significância da correlação
Avidéz determinada com Uréia 6M (1a. medida) na diluição 1/200	0.6747
	N=15
	P=.006
Avidéz determinada com NH ₄ SCN 0.5M, na diluição 1/100	.3454
	N=15
	P=.207
Avidéz determinada pelo desvio da curva de ELISA induzido pela Uréia 6M	.3805
	N=14
	P=.180
Avidéz determinada pela determinação da concentração 50% de NH ₄ SCN	.1346
	N=14
	P=.646
Avidéz determinada com Uréia 6M (2a. medida) na diluição 1/200	.5707
	N=15
	p=.026
Avidéz determinada na diluição com A ELISA entre 0.4 e 2.5, com Uréia 6M	.2400
	N=15
	p=.389

Como pode ser observado na tabela, os testes que apresentaram melhor correlação com o ensaio comercial foram as reações usuais de ELISA, utilizando Uréia 6M na diluição 1/200 do soro. Para melhor clareza dos resultados, apresentamos a distribuição de freqüências de cada ensaio nas figuras 6 e 7.

Figura 6 – Distribuição de índices de avidex obtidas na reação comercial e na reação definida como padrão, a ser utilizada nas análises subseqüentes

Figura 7 – Comparação entre a Avidex convencional utilizando a Uréia 6M e o Sistema VIDAS.

5.3 - Reprodutibilidade

A reprodutibilidade da reação usual de avides, com Uréia 6M e diluição única do soro, em condições usuais e interexperimental pode ser vista nas figuras 8, 9 e 10.

Figura 8. Reprodutibilidade da reação de Avides de IgG utilizando diluição 1/200, lavagem com Uréia 6M e antígeno total de *T.gondii*. Comparação entre os índices de avides da primeira e segunda medida. As retas apresentam a presença de correlação entre as medidas.

Figura 9. Distribuição da determinação da avides na diluição 1/1000 do soro, com lavagem com Uréia 6M e antígeno total de *T.gondii*. Comparação entre a avides determinada na diluição 1/1000 e a determinada na primeira medida do soro, na diluição 1/200. Retas representam a correlação entre medidas.

Figura 10. Distribuição da determinação da avidéz na diluição 1/10000 do soro, com lavagem com Uréia 6M e antígeno total de *T.gondii*. Comparação entre a avidéz determinada na diluição 1/1000 e a determinada na primeira medida do soro, na diluição 1/100. Retas representam a correlação entre medidas.

5.4 – Influência da diluição do soro

A análise qualitativa da determinação da avidéz de IgG anti antígeno *T.gondii* total, com ELISA e lavagem com uréia 6M, nas várias diluições dos soros pode ser vista na tabela 5.

Tabela 5 – Teste de Avidéz com várias diluições dos soros

Avidéz na 2ª. medida (1/200)				
1ª. medida	Baixa<50%	Intermediária	Alta > 75%	Total
Baixa< 50%	1	1	0	2
Intermediária	0	2	21	23
Alta > 75%	1	10	64	75
Total	2	13	85	100

Pearson Chi-square=27.91555 p=.00001

Spearman Rank R=0.0493218 p=.62604

Avidéz na diluição 1/1000				
1ª. medida	Baixa<50%	Intermediária	Alta>75%	Total
Baixa<50%	1	0	1	2
Intermediária	1	14	8	23
Alta>75%	2	32	41	75
Total	4	46	50	100

Pearson Chi-square=14.51885 p=.00582

Spearman Rank R= 0.1762681 p=.07938

Avidéz na diluição 1/10000				
1ª. medida	Baixa<50%	Intermediária	Alta>75%	Total
Baixa<50%	1	0	1	2
Intermediária	3	17	3	23
Alta>75%	6	46	23	75
Total	10	63	27	100

Pearson Chi-square 7.865486 p=.09666

Spearman Rank R=0.1653584 p=.10015

Numa avaliação metodológica simples, fizemos a relação entre a medida da avidéz e a absorbância do ELISA, para medir o impacto que esta teria sobre a medida da avidéz. Utilizamos todas as medidas com lavagem com uréia 6M e antígeno total de *T.gondii*. Esta análise mostrou que uma absorbância alta impacta no índice de avidéz com uma cooperação de pelo menos 20% ($P<0.001$), como

pode ser vista na figura 11, o que sugere fortemente que a medida da avidéz deve ser feita em uma faixa adequada da reação de ELISA. Retirando-se os valores de Absorbância menores que 0.4 e os valores maiores que 2.5, notamos que desaparece esta correlação (figura 12), quando não há mais impacto significativo da Absorbância em relação a determinação da avidéz, sem correlações entre eventos ($r^2=0.02$, $p>0.1$).

Figura 11 - Correlação entre a Absorbância do ELISA e a determinação da avidéz, mostrando um impacto significativo dos valores maiores que 2.5 e menores que 0.4 na reação.

Figura 12 - Ausência de relação entre a Absorbância do ELISA e a determinação da avidéz, quando limitadas as condições de reação.

A partir deste fato, foi possível determinar uma avidéz com diluição definida, onde a reação máxima estivesse ocorrendo entre as absorbâncias 0.4 e 2.5, que, quando comparada aos valores determinados na 1ª medida, mostraram que numericamente não há correlação entre estas medidas, aumentado a proporção de soros de baixa avidéz, como pode ser visto na figura 13.

Figura 13 – Ausência de correlação entre a avidéz determinada na diluição 1/200 e a avidéz em diluição controlada

Apesar deste resultado, na classificação qualitativa existe correlação entre os valores, embora houvesse uma migração significativa de soros para valores menores de avidéz, como pode ser visto na tabela 6.

Tabela 6 – Comparação entre a avidéz limitada e a com uréia 6M

	Avidéz limitada			
1ª. medida	Baixa<50%	Intermediária	Alta>75%	Total
Baixa<50%	1	0	1	2
Intermediária	4	18	1	23
Alta>75%	5	49	21	75
Total	10	67	23	100

5.5 - Aprimoramento do caotrópico

5.5.1. Aprimoramento da reação de avides pelo uso de Uréia 8M

Para aprimoramento do agente caotrópico, inicialmente aumentamos a concentração do agente caotrópico usual, a uréia, que passou a ser usada na lavagem intermediária na concentração de 8M. Este procedimento resultou em um aumento da distribuição dos valores qualitativos, culminando tanto em falso positivos para baixa avides, como pode ser observado na tabela 7, sem relação significativa com a avides determinada com uréia 6M ou ensaio comercial como já anteriormente descrito.

Tabela 7- Distribuição da análise qualitativa da reação de avides determinada com lavagem com Uréia 8M na diluição 1/100 do soro

	Avides determinada com Uréia 8 M			
Avides com uréia 6 M	Baixa avides(<50)	Intermediária	Alta avides > 75%	Total
Baixa avides(<50)	0	1	1	2
%	0.00%	.83%	.83%	1.65%
Intermediária	1	15	9	25
%	.83%	12.40%	7.44%	20.66%
Alta avides > 75%	5	52	37	94
%	4.13%	42.98%	30.58%	77.69%
Total	6	68	47	121
Total %	4.96%	56.20%	38.84%	100.00 %

Pearson Chi-square =0.3836623 p=0.98379

Spearman Rank R = 0.0075016 p=.93492

Ainda trabalhando com Uréia como agente caotrópico, uma nova possibilidade seria a diluição do soro para que a determinação da reação de avides fosse processada em várias diluições. Isso permitiu a elaboração de retas Log-Log, onde o desvio desta reta poderia ser medido, como descrito em métodos. Para tanto usamos um critério qualitativo de um desvio maior que 1

unidade Logarítmica (Variação de 10x) representando baixa avidéz, um desvio menor que 0.5 representado alta avidéz e os pontos intermediários, avidéz intermediária. Este ensaio foi feito na nossa amostra e sua distribuição qualitativa comparada com a avidéz com Uréia 6M pode ser vista na tabela 8.

Tabela 8 – Comparação entre o índice de avidéz obtido pelo desvio da curva de diluição do soro e a avidéz determinada com Uréia 6M na diluição 1/200.

	Análise qualitativa do desvio da curva (Log diluição)			Total
	Baixa avidéz (>1.0)	Intermediária	Alta avidéz(<0.5)	
Avidéz com uréia 6 M				
Baixa avidéz (<50%)	1	0	1	2
Intermediária	1	5	16	22
Alta avidéz(>75%)	1	8	60	69
Total	3	13	77	93

Pearson Chi-square = 16.79664 p=0.00212, Spearman Rank R =0.2025679 p=0.05150

Como pode ser observado, houve uma excelente relação entre a Avidéz 6M e esta medida qualitativa de avidéz. A distribuição dos valores quantitativos obtidos neste ensaios é vista na figura 14, onde pode ser observada sua distribuição, sendo visto que embora a análise qualitativa mantenha relação entre os eventos, esta não é paramétrica ou linear.

Figura 14 - Medida manual do desvio da curva de reação de ELISA IgG com antígeno total de *T.gondii*, comparada com a avidéz determinada na diluição 1/200 com Uréia 6M.

Continuando esta análise, procedemos a comparação entre este índice de avidéz determinado em várias diluições do soro e a avidéz determinada em região limitada da reação de ELISA, sendo que a distribuição qualitativa dos eventos é vista na tabela 9. Nesta comparação é claramente mostrada a relação qualitativa entre estes eventos.

Tabela 9 - Comparação entre eficiência qualitativa na determinação da avidéz entre a avidéz limitada a A da reação de ELISA e a medida do desvio da curva induzido pela lavagem com Uréia 6M em log da diluição.

	Desvio da curva de diluição do soro Na A 1.0 do IgG ELISA			
Avidéz limitada	Baixa avidéz (>1.0)	Intermediária	Alta avidéz (<0.5)	Total
Baixa avidéz (<50%)	3	6	1	10
Intermediária	0	7	56	63
Alta avidéz(>75%)	0	0	20	20
Total	3	13	77	93

Pearson Chi-square = 50.61578 $p < 0.00001$ Spearman Rank R 0.5356644 $p < 0.0001$

Para aprimorarmos esta medida, comparamos os valores quantitativos entre estes eventos, o que pode ser visto na figura 15, mostrando uma estreita relação entre estes eventos.

Figura 15 - Correlação entre a medida do desvio da curva induzido pela uréia na A = 1.0 e a avidéz determinada na diluição do soro com A entre 0.5 e 2.5, pela Uréia 6 M. Correlação $r^2 = 0.55$ $p < 0.001$.

5.5.2. Mudança do agente caotrópico

A troca do agente caotrópico para Tiocianato de Amônio implica em determinação da concentração ideal para a lavagem, sendo que inicialmente testamos a concentração de 0.5M, cuja distribuição qualitativa pode ser vista na tabela 10 e figura 16.

Tabela 10. Distribuição da avaliação qualitativa entre a avidéz determinada com Uréia 6M e a avidéz determinada com NH_4SCN 0.5M

Avidéz com uréia 6M	Avidéz por lavagem com NH_4SCN 0.5M			Row
	Baixa avidéz <50%	Intermediária	Alta avidéz >75%	Total
Baixa avidéz <50%	0	2	0	2
Intermediária	1	4	21	26
Alta avidéz >75%	0	13	81	94
Total	1	19	102	122

Pearson Chi-square = 14.80112 p=0.00514, M-L Chi-square = 10.78730
p=0.02908

Spearman Rank R = 0.1498706 p=0.09942

Figura 16 - Distribuição dos valores de avidéz com Uréia 6M e com NH_4SCN 0.5M.

Embora com relação com a avidéz com Uréia 6M, os valores de avidéz com NH_4SCN 0.5M tenderam a ser maiores que os obtidos com a lavagem clássica de Uréia 6M. ($r^2 = 0.35$, intersecção de Y 60.5% $p < 0.001$).

A seguir procedemos aos mesmos ensaios aumentando a concentração molar de NH_4SCN para 1M, na solução de lavagem, cuja distribuição de valores qualitativos pode ser vista na tabela 11.

Tabela 11 - Distribuição de valores qualitativos de avidéz determinados com SCN 1M

Avidéz com uréia 6M	Avidéz com lavagem com NH_4SCN 1M			Total
	Baixa avidéz <50%	Intermediária	Alta avidéz >75%	
Baixa avidéz <50%	0	1	1	2
Intermediária	4	16	4	24
Alta avidéz >75%	4	57	33	94
Total	8	74	38	120

Pearson Chi-square = 6.979510 $p = 0.13700$; M-L Chi-square = 6.481427 $p = 0.16599$
Spearman Rank R = 0.1794849 $p = 0.04982$

Como pode ser observado, o simples aumento da concentração não implica em aprimoramento da reação, já que não houve significância de correlação entre eventos e de sua distribuição. É interessante notar que houve relação entre a determinação entre o uso de Uréia 8M e do NH_4SCN 1M, ($p < 0.00001$ Spearman Rank R = 0.5533503 $p < 0.00001$) mostrando que o aumento da concentração do caotrópico independe do agente utilizado, mas a medida perde sua eficiência de definição de perfis. Concentrações de NH_4SCN maiores que 1M foram testadas, mas sem eficiência diagnóstica.

Embora a troca do agente caotrópico em lavagens isoladas não tenha resultado em melhora significativa da determinação da avidéz, o caotrópico mais potente retira completamente os anticorpos, o que permite a determinação da

concentração molar de NH_4SCN que retira 50% dos anticorpos. Este procedimento foi feito como padronizado e descrito em métodos e sua análise qualitativa foi comparada com a avidéz obtida com Uréia 6M, o que pode ser visto na tabela 12.

Tabela 12. Comparação da análise qualitativa entre os ensaios de determinação da concentração 50% de NH_4SCN e da avidéz determinada com uréia 6M

Avidéz com uréia 6 M	Concentração molar de NH_4SCN que retira 50% dos anticorpos			Total
	Baixa avidéz(<1M)	Intermediária	Alta avidéz(>1.5M)	
Baixa avidéz (<50%)	0	0	2	2
Intermediária	4	8	13	25
Alta avidéz(>75%)	4	21	69	94
Total	8	29	84	121

Pearson Chi-square = 7.087841 p=0.13135, Spearman Rank R =0.1686665 p=0.06441

Como pode ser observado esta medida não apresentou relação qualitativa com a determinação da avidéz com Uréia 6M. Quantitativamente, os valores desta medida foram comparados com os valores quantitativos individuais obtidos na avidéz com Uréia 6M, o que pode ser visto na figura 17, onde vemos uma correlação não linear para estas duas medidas.

Figura 17 - Comparação entre a determinação bioquímica da concentração de NH_4SCN que libera 50% dos anticorpos IgG na reação de ELISA e a avidéz determinada pela uréia 6M, na diluição 1/200. (Correlação presente $r=0.21$, $p<0.05$)

Procedemos a comparação entre esta medida complexa de avidéz e a avidéz determinada na diluição limitada do ELISA, cuja comparação qualitativa pode ser vista na tabela 13.

Tabela 13 – Comparação entre a avidéz limitada e a que retira 50% dos anticorpos

	Concentração de NH_4SCN que retira 50% da concentração			Total
	Baixa avidéz(<1.0 M)	Intermediária	Alta avidéz(>1.5M)	
Baixa avidéz (<50%)	1	3	5	9
Intermediária	2	17	45	64
Alta avidéz(>75%)	4	2	16	22
Total	7	22	66	95

Pearson Chi-square = 8.119828 $p=0.08731$ Spearman Rank R =0.0432957 NS

Figura 18. Comparação entre a determinação da concentração de NH_4SCN que retira 50% do ELISA e a avidéz determinada em diluição limitada (A 0.5-2.5). Apesar da reta de regressão, não há correlação entre eventos

5.6. Avidéz com antígeno recombinante

Para estes ensaios as placas foram recobertas com antígeno recombinante rRop 2 de *T.gondii* e ensaiado para ELISA IgG nas mesmas condições do extrato salino total de *T.gondii*, como padronizado em métodos. A avaliação qualitativa da positividade das reações de ELISA pode ser vista nas tabelas abaixo (Tabelas 14 e 15) e na figura 19.

Tabela 14 - Avaliação qualitativa da presença de anticorpos anti rRop 2 e anti *T.gondii* na soroteca testada

	Antígeno r Rop 2		
Antígeno total	Negativo	Positivo	Total
Negativo	13	2	15
% da coluna	43.33%	1.55%	
% da linha	86.67%	13.33%	
% total	8.18%	1.26%	9.43%
Positivo	17	127	144
% da coluna	56.67%	98.45%	
% da linha	11.81%	88.19%	
% total	10.69%	79.87%	90.57%
Total	30	129	159
% total	18.87%	81.13%	100.00%

Pearson Chi-square =49.73389 p=0.0000 M-L Chi-square =37.67440 p=0.00000

Spearman Rank R =0.5592779 p=.00000

Figura 19 - Distribuição dos valores de ELISA IgG utilizando diferentes antígenos na placa.

Tabela 15 - Avidéz determinada com uréia 6M utilizando o ensaio com rRop2

	Avidéz com r Rop 2 e Uréia 6M			
Avidéz com antígeno total e Uréia 6M	Baixa avidéz <50%	Intermediári a	Alta avidéz >75%	Total
Baixa avidéz <50%	0	1	1	2
% da coluna	0.00%	9.09%	.88%	
% da linha	0.00%	50.00%	50.00%	
% total	0.00%	.80%	.80%	1.60%
Intermediária	0	2	21	23
% da coluna	0.00%	18.18%	18.58%	
% da linha	0.00%	8.70%	91.30%	
% total	0.00%	1.60%	16.80%	18.40%
Alta avidéz >75%	1	8	91	100
% da coluna	100.00%	72.73%	80.53%	
% da linha	1.00%	8.00%	91.00%	
% total	.80%	6.40%	72.80%	80.00%
Total	1	11	113	125
% total	.80%	8.80%	90.40%	100.00 %

Figura 20. Comparação das determinações totais de avidéz (incluindo negativos) para as reações utilizando rRop 2 e antígeno total de *T.gondii*, em lavagem com Uréia 6M. Não há correlação significante entre os eventos

Na avaliação da avidéz utilizando rRop 2 e antígeno total, utilizando NH_4SCN 0.5M como agente caotrópico obtivemos os resultados que podem ser vistos na figura 21.

Figura 21 - Comparação entre a avidéz com antígeno total de *T.gondii* e com rRop 2, em agente caotrópico NH_4SCN 0.5 M.

5.7. Sorologia e avidéz

5.7.1. IgG - ELISA

Na comparação entre os grupos determinados em cada tipo de reação de avidéz e a intensidade da reação de anticorpos IgG do ELISA, usando como substrato antígeno total de *T.gondii*, verificamos apenas que havia diferença entre a média de reatividade entre os grupos quando estes eram separados pela avidéz determinada na diluição 1/200 com lavagens com uréia 6M, como pode ser visto na Tabela 16.

Tabela 16 - Avidéz determinada com uréia 6M e antígeno total de *T.gondii*

	A ELISA IgG		
	Media	N	Desvio Padrão
BAIXA	.506500	2	.045962
INTERMEDIÁRIA	1.621194	31	.840092
ALTA	2.212432	111	.825556

ANOVA $p < 0.001$

Nos demais ensaios de avidéz não houve diferença entre os grupos, a saber, Avidéz com Uréia 6M na diluição limitada entre 0.4 e 2.5, Avidéz com Uréia 8M, Avidéz determinada com NH_4SCN tanto em lavagens individuais quanto em concentrações fixas, pelo desvio da curva de diluição.

5.7.2. IgG - IFI

Na comparação da titulação da IFI para IgG anti *T.gondii* e os grupos determinados nos vários testes de avidéz utilizados obtivemos os seguintes resultados (Tabela 17):

Tabela 17 - Avidéz em antígeno total de *T.gondii*, com Uréia 6M

	TIFIG	TIFIG	TIFIG
	Média	N	Desvio Padrão
BAIXA	96.0000	2	45.2548
INTERMEDIÁRIA	164.3871	31	178.2623
ALTA	217.3091	110	175.1691

KW $p < 0.005$ **5.7.3. IgM - IFI**

Comparamos a média dos títulos para IgM encontrados na IFI segregados de acordo com as reações de avidéz utilizadas. Como pode ser observado na Tabela 18, os grupos de baixa avidéz apresentaram títulos médios de IgM mais elevados do que os que apresentavam avidéz intermediária ou alta. Isso foi observado para a reação de avidéz clássica, avidéz com diluição limitada, avidéz com lavagem com NH_4SCN 0,5M e avidéz determinada com uréia 6M em antígeno recombinante ROP 2 (Tabelas 18, 19, 20 e 21).

Tabela 18 - Avidéz com Uréia 6M e antígeno total de *T.gondii*

	TIFIM	TIFIM	TIFIM
	Média	N	Desvio Padrão
BAIXA	80.00000	2	67.88225
INTERMEDIÁRIA	31.48387	31	44.63472
ALTA	28.54054	111	53.74820

KW $p < 0.05$ **Tabela 19 - Avidéz com Uréia 6M determinada entre Abs 0.4 e 2.5**

	TIFIM	TIFIM	TIFIM
	Média	N	Desvio Padrão
BAIXA	80.80000	10	85.70336
G_2:2	28.05970	67	50.69932
G_3:3	27.47826	23	41.69682

KW $p < 0.10$ Neuman Keulls $P < 0.01$ 1 vs 2 e 3

Tabela 20 - Avidéz com NH₄SCN 0.5M

	TIFIM	TIFIM	TIFIM
	Média	N	Desvio Padrão
BAIXA	128.0000	1	0.00000
INTERMEDIÁRIA	42.1053	19	53.25608
ALTA	29.9608	102	55.95683

KW p<0.10 NK NS

Tabela 21 - Avidéz com antígeno recombinante rRop 2 e uréia 6M

	TIFIM	TIFIM	TIFIM
	Média	N	Desvio Padrão
BAIXA	256.0000	1	0.00000
INTERMEDIÁRIA	17.4545	11	18.17891
ALTA	28.6018	113	48.41258

KW p<0.10

Não houve relação entre a positividade ou intensidade da reação para o ELISA IgA contra *T.gondii*, nem entre as imunoglobulinas testadas, nem quanto a diferenças entre as médias dos grupos segregados por qualquer reação de avidéz.

6. DISCUSSÃO

Diante de nossos dados, optamos por uma discussão em duas fases distintas, sendo que na primeira nos concentraremos na discussão dos métodos de avidéz e na segunda discutiremos o uso deste teste na nossa população de estudo.

Inicialmente, optamos pelo teste mais simples de determinação da avidéz, denominada clássica, que consta de uma reação simples, em uma única diluição e com eluição com Uréia 6 M. Este teste foi o inicialmente preconizado por Camargo (1991) e utilizado por Rossi (1998) em estudos mais recentes. Este revelou-se capaz de distinguir apenas 3 soros de nossa população, mostrando no entanto uma boa correlação, a melhor de nossos testes, com o ensaio de avidéz comercial disponível (Pelloux *et al*, 1998). Este teste apresentava uma boa reprodutividade em ensaios de soros de alta avidéz, embora em soros de baixa avidéz, seu resultado tenha sido menos eficiente, mas o pequeno número de amostras não permitiu comparações maiores. Infelizmente, na literatura, são raros os artigos que apresentam a reprodutividade em estudos de avidéz, mas na literatura foi possível identificar que a variação da avidéz é em torno de 10% em ensaios inter testes, o que é bastante compatível com nossos achados (Thomas *et al*, 1992).

Um dos problemas que é encontrado na literatura é a definição dos níveis que determinam a classificação em baixa ou alta avidéz. Diante de uma variação interteste como a que encontramos e as descritas na literatura, optamos por aceitar as definições de Camargo e colaboradores (1991) como padrão, independente de nossos resultados ou do teste empregado. Estes valores foram em sua maior parte extrapolados de resultados de avidéz obtidos em infecções

virais, geralmente em estudos vacinais, onde o tempo decorrido de infecção era facilmente estabelecido (Souza *et al*, 1997). Na toxoplasmose, inexistiu uma definição precisa da época exata da infecção ou estudos vacinais que permitam a definição adequada de cut-offs e do tipo de resposta em cada população, existentes em modelos virais ou vacinais onde há soroconversão ou vacinação como definidores da época da infecção (Hedman *et al*, 1993; Lazzarotto *et al*, 2000). No caso da toxoplasmose, a maioria dos autores emprega outros índices sorológicos na determinação da época da infecção, algumas raras vezes em estudos sequenciais, o que resulta em imprecisão relativa da época da infecção (Marcolino *et al*, 2000; Rossi, 1998; Bertozzi *et al*, 1999).

No sistema comercial (VIDAS) os nossos resultados de avidéz foram 85,7% concordantes, pois 2 (duas) amostras que apresentavam média avidéz em nosso ensaio mostraram-se de alta avidéz no sistema VIDAS. As três amostras de baixa avidéz foram concordantes no sistema VIDAS, confirmando assim os nossos dados de infecção recente em três pacientes. As diferenças entre as reações podem ser atribuídas ao sistema de revelação de anticorpos utilizando fluorescência, que é mais linear que os sistemas enzimáticos utilizados na reação de ELISA (Pelloux *et al*, 1998).

O efeito da reação enzimática utilizada para a determinação dos títulos de anticorpos e sua amplificação logarítmica levaram vários autores a questionar o uso da avidéz clássica em uma única diluição, propondo de fato o uso de curvas de titulação ou a utilização da determinação da avidéz em uma diluição onde a reação da placa estivesse dentro de uma faixa linear. Nossos dados para este tipo de ensaio mostraram que este tipo de determinação realmente parece mais

eficiente que a avidéz clássica, mas estes dados não mostraram correlação com avidéz comercial nas amostras testadas. A extrapolação matemática da avidéz, utilizando modelos log-log e estimando-se o desvio das curvas ocorridos na A 1.00 foi determinada em nossas amostras e mostrou-se correlacionada com a avidéz clássica, mas novamente sem relação com os testes comerciais, sempre restringidos a população estudada. Esta medida é relativamente cara para ser usada em sistemas de triagem de gestantes pois utiliza muitos poços para sua determinação, embora tenha sido utilizada por muitos autores (Thomas & Morgan-Capner, 1991; Jenun *et al*, 1997). Além disso, a qualificação dos soros em baixa e em alta avidéz precisam de um grande número de amostras, sendo extrapolada pela maioria dos autores baseada em perfis sorológicos, que foi utilizada em nossa amostra (Jenun *et al*, 1997). Em nossa padronização, esta técnica mostrou-se bastante reprodutível e confiável do ponto de vista da reação, pelo que sugerimos que esta abordagem possa ser útil para a determinação da avidéz.

Na busca de uma melhor teste, partimos também para ensaios onde o caotrópico foi modificado. Notamos que a utilização de NH_4SCN , proposto por vários autores (Ferreira & Katzin, 1995; McCloskey *et al*, 1997; Worimaa *et al*, 2001), com um sistema de única eluição dos anticorpos, apresentava inúmeros problemas. A comparação dos resultados obtidos entre a avidéz com uréia 6M e NH_4SCN 0,5M mostraram que este último caotrópico tem nessa concentração um poder caotrópico menor que a Uréia na concentração 6M fornecendo valores maiores na determinação do índice de avidéz. Existem poucos estudos sobre o poder caotrópico comparativo dos vários reagentes (Polanec *et al*, 1994), mas em nosso estudo tomamos o cuidado de estabelecer um pH único 7.0 para cada

solução caotrópica utilizada, já que se sabe que o pH tem um efeito muito grande na indução de denaturação de proteínas, especialmente imunoglobulinas (Hedman & Seppala, 1998). Assim podemos afirmar que a avidéz determinada em NH_4SCN 0.5M em amostra única certamente fornece valores de avidéz maiores que o da Uréia 6M, servindo apenas para a determinação de infecções muito recentes, onde ocorre uma proporção muito elevada de anticorpos de baixa avidéz.

O aumento da concentração de caotrópico revelou resultados semelhantes tanto na concentração de 8M de Uréia como na de 1M de NH_4SCN , com uma diminuição dos valores de índice de avidéz encontrados, que se correlacionam muito bem entre si, mostrando que um poder caotrópico semelhante destas duas soluções. No entanto, os valores de avidéz são menores para as faixas intermediárias e os testes parecem variar dentro de um maior espectro temporal da infecção. Se nosso estudo tivesse uma expectativa de tempos maiores de infecção, estes reagentes ampliariam a base de uso da avidéz para determinação de tempo de infecção e talvez tivessem aplicação em estudos epidemiológicos. Vários autores usam estas concentrações de caotrópicos em seus sistemas (worimaa *et al*, 2001; Ferreira & Katzin, 1995), mas, não raro, usam os mesmos cortes que os preconizados para concentrações menores do mesmo, o que pode levar a resultados mais questionáveis (Thomas & Morgan-Capner, 1988), o que também encontramos em concentrações maiores de NH_4SCN (dados não mostrados).

Diante do questionamento das concentrações de caotrópicos e da grande variabilidade dos ensaios utilizando uma concentração única de caotrópico,

padronizamos uma reação de determinação da concentração de NH_4SCN que retira 50% dos anticorpos, que por ser uma reação em um modelo sigmoidal dose resposta poderia fornecer dados mais adequados para a determinação da avidéz. Esta reação só pode ser feita com NH_4SCN , já que a concentração máxima de Uréia, devido ao seu baixo poder caotrópico, não consegue a retirada de 100% dos anticorpos de alta avidéz em condições de solução aquosa e pH 7.0 (Stankus & Leslie, 1976).

Esta medida já havia sido preconizada por outros autores, utilizando outros antígenos (Hedman & Rousseau, 1989; Jenun *et al*, 1997), e mostrou-se bastante similar em nosso sistema, quando comparada aos ensaios de avidéz clássica e avidéz determinada em Uréia 6M, limitada ou pelo desvio da curva. No entanto, esta medida é mais onerosa pelo uso de uma reação prévia para determinação da diluição ótima do soro, além do uso de pelo menos 16 poços quando da sua determinação, o que a inviabiliza para ensaios populacionais, embora possa ser um teste confirmatório em soros de baixa avidéz.

A maioria dos ensaios de avidéz foi desenvolvida para ensaios de RNA vírus, cujos antígenos são compostos por poucos epítomos e geralmente podiam ser padronizados em grandes amostras vacinais (Paunio *et al*, 2000). Em modelos com antígenos mais complexos, como a toxoplasmose (Marcolino *et al*, 2000) e a esquistossomose (Viana *et al*, 2001), os ensaios de avidéz mostraram seu valor geralmente por definição extrapolada em comparação com reações sorológicas que sugeriam infecção recente, mas com descrições de que avidéz encontrada na realidade representava uma somatória de avidéz individual a cada antígeno, que podem apresentar diferentes níveis de resposta humoral (Marcolino *et al*, 2000).

Para avaliar a influência da complexidade antigênica na reação de avides, tivemos a possibilidade de ensaiar nossas amostras contra antígeno recombinante de *T.gondii*, a Rop 2, uma proteína encontrada na roptria do agente e produzida após associação e liberação da GST. A proteína, livre de seu híbrido bacteriano foi gentilmente fornecida pura pelo Prof. Sergio Angel, e pode ser ensaiada em um ensaio de avides clássica. Nossos resultados com esta reação foram pouco conclusivos, apesar da aparente melhora da reatividade deste antígeno nas fases agudas da infecção (Martin *et al*, 1998). O teste foi relativamente bom quanto a sua concordância com as reações utilizando antígeno total do agente, mas algumas amostras positivas nas reações usando extrato antigênico salino total não mostraram reatividade na reação, enquanto alguns pacientes sabidamente negativos apresentaram reações no limite da positividade. A determinação da avides nas amostras positivas utilizando Uréia 6M e NH_4SCN 0,5M como caotrópicos mostraram que os anticorpos contra esta proteína provavelmente apresentavam uma maturação mais rápida de anticorpos que a mistura total de antígenos, como já havia sido descrito para outros antígenos (Worimaa *et al*, 2001), e também na toxoplasmose (Marcolino *et al*, 2000). Hipoteticamente, antígenos majoritários, como a Rop2, podem ter sua maturação antecipada pela maior disponibilidade do antígeno, acelerando a seleção de células produtoras de anticorpos de alta avides (Aubert *et al*, 2000), o que pode ter ocorrido com este antígeno e foi também descrito para outra proteína majoritária do agente, a SAG1 (Marcolino *et al*, 2000).

Assim, nossos dados mostraram que a determinação da avides na toxoplasmose pode ser feita por vários métodos com resultados similares,

permitindo uma manipulação dos valores de classificação e de concentrações de agentes caotrópicos que permitam ampliar ou restringir seu espectro temporal de determinação da época da infecção. A aparente versatilidade do teste é um fator muito útil em estudos epidemiológicos de uma mesma população em um mesmo teste, mas permite diferentes sistemas de padronização o que tem levado a vários relatos de ensaios comercializados fornecendo resultados para um mesmo conjunto de amostras muito conflitantes entre si (Barbieri *et al*, 2001; Roberts *et al*, 2001), apesar de defesas da reação de avides igualmente entusiasmadas (Liesenfeld *et al*, 2001). Em alguns países, a preocupação com a uniformidade dos testes levou a criação de centros de referência, responsáveis pela execução padronizada dos testes, o que infelizmente ainda não chegou em nosso meio (CDC, 2000).

Toda esta complexidade decorrente da versatilidade do ensaio faz com que a utilização de apenas um ensaio na determinação da avides, de qualquer origem, comercial ou desenvolvido no próprio laboratório, deva ser apresentado sob várias dados pertinentes, sendo que para o futuro, estabelecemos que o resultado de avides de nosso laboratório será apresentado sob a forma de 03 índices em cada amostra individual, a saber, a avides clássica, a avides determinada na diluição limitada e o desvio da curva de titulação, obtidos com a Uréia 6 M pH 7.0 como agente caotrópico.

Nosso estudo vinculou-se a uma população específica, que era encaminhada ao hospital referência com um resultado referido de positividade da reação de IgM para *T.gondii* e em tratamento com Espiramicina. A utilização de nosso ensaio de avides dos anticorpos IgG teve resultados semelhantes aos

descritos na literatura, com fração significativa com avides alta e infecções crônicas não recentes (Suzuki *et al*, 2001). Em nossa abordagem clássica, mostramos que a ampla maioria de nossas amostras apresentou alta avides, independente do agente caotrópico utilizado, sua determinação em teste isolado ou em sistemas de múltiplas determinações e estimativas matemáticas. A utilização conjunta da reação de PCR em líquido amniótico em casos de suspeita ultrassonográfica de comprometimento fetal mostrou uma distribuição aleatória da positividade da reação de PCR e os resultados de avides, sendo que, como todas as mães estavam sob terapia com Espiramicina, onde o número esperado de infecções fetais era muito baixa (Peyron & Wallon, 2001), não tendo sido verificada até o momento em nossa população independente do resultado prévio do PCR e tratamento mais agressivo. Até o momento, não há relatos de crianças infectadas congenitalmente em nossa população, embora não possamos afastar eventuais retinopatias ao longo de sua vida. As falhas e incongruências na reação de PCR são freqüentes na literatura, atribuídas tanto a problemas metodológicos da reação (Vidigal *et al*, 2002), achados de parasitas mortos ou inviáveis, contaminação do líquido amnióticos por cistos latentes maternos ou infecções restritas a placenta (Pires *et al*, 1999). É necessário que seja alcançada um máximo de eficiência discriminante do PCR, que acreditamos ser o método mais promissor no diagnóstico da infecção fetal. Essa eficiência poderia ser alcançada com o aperfeiçoamento da técnica através da quantificação de parasitas na amostra, pois já existem PCRs que quantificam o material amplificado, como já vem sendo utilizado na detecção de carga viral; nessa técnica o produto pode ser diluído serialmente e comparado a um padrão de quantificação sintético e

revelado por um indicador colorimétrico (Mulins, 1990), esses resultados juntamente com o acompanhamento clínico e ultrassonográfico, não deixariam dúvidas a respeito dos resultados e da terapêutica a ser adotada.

Como o padrão sorológico foi geralmente o padrão da definição da infecção aguda na maioria dos trabalhos, executamos a determinação sorológica completa das gestantes em nosso estudo, comparando os resultados com as várias técnicas de avidéz utilizadas. Realmente, nossa população era constituída basicamente de gestantes com resultados falso positivos de IgM além de falsos negativos de IgG. Isto se deve ao aprimoramento da sensibilidade dos testes de IgM, que resultam em interpretação errônea por parte do clínico e introdução de tratamentos desnecessários (Derouin, 2001). Este problema é tão significativo que existem recomendações formais de governos para a desconsideração destes resultados (CDC). Nas gestantes confirmadas para IgM pela IFI, estavam nossas pacientes com baixa avidéz, mas mesmo nesse grupo de estudo a sua participação definida pela baixa avidéz era pequena. Testes auxiliares, como a IgA, reportados como de alta eficiência (Bertozzi *et al*, 1999) mostraram-se ineficazes em nossa população, não tendo relação com a infecção recente. Extremo cuidado deve ser tomado na escolha das populações a serem inseridas na padronização destes testes, pois sorotecas com estadia do toxoplasmosse previamente definidos podem resultar em excelência diagnóstica que não é reproduzida em populações triadas de formas mais aleatória, o que é abundantemente descrito em ensaios multicêntricos ou em casos isolados (Barbieri *et al*, 2001).

Outro problema que não pode ser ignorado em nossa amostra é a latência entre a coleta, o fornecimento do resultado, o retorno ao pré-natal, e o encaminhamento ao nosso serviço. Numa estimativa média do processo, com duas semanas entre cada evento, a gestante foi encaminhada pelo menos 6 semanas após a coleta e com duas de terapia instituída, até a nova coleta. Certamente mesmo em casos de infecção recentes, as amostras coletadas após este período certamente tenderiam a apresentar níveis maiores de índice de avidéz, como relatado em outros modelos (Souza *et al*, 1997). Acreditamos que a maioria dessas infecções já havia sido controlada antes mesmo da concepção.

Diante de uma estimativa de cerca de 280 crianças infectadas sem Espiramicina por ano na região metropolitana de São Paulo (Guimarães *et al*, 1993), e num sistema de triagem extensiva, como é o sistema público de saúde, uma pequena porcentagem de falsos positivos, da ordem de 1 %, pode resultar no tipo de seleção apresentado, já que ocorrem em São Paulo cerca de 100.000 gestações por ano, com cerca de 50.000 testes de pré-natal e conseqüentemente 500 a 1.000 gestantes triadas erroneamente, uma proporção semelhante a encontrada, o que também é compatível com a ausência de infecção pelo tratamento com Espiramicina, que reduz a transmissão fetal para 5% das infecções maternas (Jones *et al*, 2001).

A melhor abordagem seria a definição do estado antenatal da gestante. Uma abordagem interessante seria a obrigatoriedade da determinação sorológica de doenças vacináveis, com tétano, rubéola e outras infecções na época da conclusão do primeiro grau. Em estudos epidemiológicos, nessa faixa etária, mais de 50% das pessoas já tiveram contato com o *T. gondii* (Guimarães *et al*, 1993),

restando um grupo onde a transmissão é mais baixa, pela melhora dos hábitos de higiene e a risco de infecção podendo ser mais facilmente utilizada a soroconversão quando da gestação, diminuindo o custo de terapia indevidas. Além disso a abordagem nesta fase da vida pode fixar conceitos de prevenção da toxoplasmose e diminuir ainda mais os riscos de infecção congênita. Outra abordagem menos promissora seria a utilização de testes baratos e de leitura imediata, permitindo sua execução repetida ao longo do pré-natal em gestantes soronegativas.

As reações de determinação da avidéz precisam ser utilizadas criteriosamente, em estudos multicêntricos e com referenciamento para que a potência deste teste não seja diluída pelos problemas de triagem encontrados em nosso estudo.

7. CONCLUSÕES

As várias técnicas utilizadas demonstraram que a determinação da avidéz é um teste significativo para o diagnóstico recente de infecções pelo *Toxoplasma gondii*, devendo ser incluído na rotina laboratorial das gestantes, mas precisa de uma padronização de seus métodos, ampla e interlaboratorial, para permitir seu uso na seleção de indivíduos específicos, onde mais de uma determinação deve ser utilizada.

Especificamente, em nosso estudo foi possível demonstrar que:

A triagem laboratorial das gestantes para inclusão em um programa de detecção precoce de infecções fetais pelo *T.gondii* deve utilizar a determinação de IgM, mas a positividade isolada deste teste não significa risco fetal devido ao aumento da sensibilidade da reação de IFI.

Na padronização dos ensaios de avidéz, o uso da determinação deste índice em uma única determinação serve apenas de triagem, necessitando de métodos mais precisos para sua utilização em indivíduos isolados.

A determinação da avidéz pode ser aprimorada pelo uso de diferentes agentes caotrópicos e em diferentes concentrações, devendo ser padronizado adequadamente em cada laboratório, com uso de padrões de soros de avidéz conhecida, distribuído por centros de referência.

O teste de triagem utilizado, utilizando avidéz determinada na diluição 1/100 do soro com lavagem com Uréia 6M mostrou boa relação com o comercial e boa reprodutibilidade.

O índice de avidéz determinado em diluição limitada do soro, restritas a absorbância das diluições entre 2.5 e 0.5 apresenta boa relação com o teste de triagem e uma melhor relação com os demais testes utilizados, embora não tenha relação com a avidéz comercial nas amostras testadas. O uso de tiocianato de amônio em concentração 0,5M no tampão de eluição mostrou uma boa relação com o índice de avidéz de 6M e um poder discriminatório semelhante, tendendo a fornecer dados mais elevados de avidéz.

O aumento do agente caotrópico para Uréia 8M ou tiocianato 1M amplia a faixa de determinação da avidéz, fornecendo valores de menor intensidade e para uso em estudos epidemiológicos, já que fornece valores mais amplos da avidéz. A determinação do desvio da curva de titulação do soro determinada em mostrou boa relação qualitativa e quantitativa com a avidéz de triagem e com a avidéz limitada, podendo ser utilizada como teste de confirmação.

A determinação da concentração de tiocianato de amônio que retira 50% dos anticorpos mostrou boa relação com a avidéz de triagem e com a avidéz limitada, podendo ser utilizada alternativamente para a confirmação dos resultados.

A utilização do antígeno recombinante Rop 2 como suporte antigênico para reações imunoenzimáticas e determinação da avidéz, além de presença de falsos negativos, não mostrou maior eficiência nesta determinação, independente do agente caotrópico utilizado.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, J.D., BRADBURNE, F., & WREGHITT, T.G. The Effect of Sodium Thiocyanate on Virus Structure. **Journal of Medical Virology**, **4**: 269-277. 1979.
- AMATO NETO, V., MEDEIROS, E.A.S., LEVI, G.C., DUARTE, M.I.S.D. **Toxoplasmose**. 4 ed. São Paulo: Sarvier, 154 p.1995.
- AMBROISE-THOMAS, P. Emerging parasite zoonoses: the role of host-parasite relationship. **International Journal for Parasitology**, **30**: 1361-1367. 2000.
- ASHBURN, D., JOSS, A.W., PENNINGTON, T.H., HO-YEN, D.O. Do IgA, IgE, and IgG avidity tests have any value in the diagnosis of toxoplasma infection in pregnancy? **J. Clin. Pathol**, **51 (4)**: 312-315. 1998.
- AUBERT, D., MAINE, G.T., VILLENA, I., HUNT, J.C., HOWARD, L., SHEU, M., BROJANAC, S., CHOVAN, L.E., NOWLAN, S.F., PINON, J.M. Recombinant Antigens to detect *Toxoplasma gondii* – specific Immunoglobulin G and Immunoglobulin M in Human sera by Enzyme Immunoassay. **Journal of Clinical Microbiology**, **38 (3)**: 1144-1150. 2000.
- BADER, T.J., MACONES, G.A., ASCH, D.A. Prenatal screening for toxoplasmosis. **Obstetrics & Gynecology**, **90**: 457-464. 1997.
- BARBIERI, A., GISTRI, A., CAPPELLETTI, F. & GIORDANO, I. Diagnostic Value of IgG Avidity in *Toxoplasma* Infection: Comparison of 3 Commercial Kits. **The Journal of Infectious Diseases**, **184**: 944. 2001.

- BATA, J.E., GYENES, L., SEHON, A.H. The effect of urea on antibody-antigen reactions. **Immunochemistry**, **1**: 289-293. 1964.
- BEAMAN, M.H., WONG, S.Y., REMINGTON, J.S. Cytokines, Toxoplasma and intracellular parasitism. **Immunol. Rev.**, **17**: 96-117. 1992.
- BEAMAN, M.H. Toxoplasmosis. In: MANDELL, G.L., BENNETT, J.E., DULIN, R. **Principles and practice of infectious diseases**. 4 ed. New York: Churchill Livingstone, p. 2.455-2.475. 1995.
- BERTOZZI, L.C., SUZUKI, L.A., ROSSI, C.L. Serological diagnosis of toxoplasmosis: usefulness of IgA detection and IgG avidity determination in a patient with a persistent IgM antibody response to *Toxoplasma gondii*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **41 (3)**: 175-177. 1999.
- BLACK, M.W., & BOOTHROYD, J.C. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, **64 (3)**: 607-623. 2000.
- BOES, M. Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. **Molecular Immunology**, **37**: 1141-1149. 2000.
- BOOTHROYD, J.C., BLACK, M., BONNEFOY, S., HEHL, A., KNOLL, L.J., MANGER, I.D., ORTEGA-BARRIA, E., TOMAVO, S. Genetic and biochemical analysis of development in *Toxoplasma gondii*. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, **29; 352 (1359)**:1347-54. 1997.
- BOTTEREL, F., ICHAI, P., FERAY, C., BOUREE, P., SALIBA, F., TUR RASPA, R., SAMUEL, D., & ROMAND, S. Disseminated Toxoplasmosis, Resulting from Infection of Allograft, after Orthotopic Liver Transplantation: Usefulness of Quantitative PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, **40 (5)**: 1648-1650. 2002.

- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, **72**: 248. 1976.
- CAMARGO, M.E. Introdução às técnicas de Imunofluorescência. **Rev. Bras. Patol. Clin.**, **10**: 143-169. 1974.
- CAMARGO, M.E., SILVA, S.M., LESER, P.G., GRANATO, C.H. Avidéz de anticorpos IgG específicos como marcadores de infecção primária recente pelo *Toxoplasma gondii*. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, **33**: 213-218. 1991.
- CAMARGO, M.E. Toxoplasmose. In: FERREIRA, A.W., & AVILA, S.L.M. **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto Imunes**. 1ª Ed. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, p. 165-174. 1996.
- CDC-Centers for Disease Control and Prevention. Preventing congenital toxoplasmosis. **MMWR Morb. Mortal Wkly Rep.**, **49 (RR-2)**: 57-75. 2000.
- COZON, G.J., FERRANDIZ, J., NEBBI, H., WALLON, M., PEYRON, F. Estimation of the avidity of immunoglobulin G for routine diagnosis of chronic *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, **17 (1)**: 32-36. 1998.
- DAFFOS, F., FORESIER, F., CAPELLA-PAVLOVSKY, M., THULLIEZ, P., AUFRANT, C., VALENTI, D., COX, W.L. Prenatal management of 746 pregnancies at risk for congenital toxoplasmosis. **N. Engl. J. Med.**, **318**: 271-275. 1988.
- DEROUIN, F. Anti-toxoplasmosis drugs. **Current Opinion in Investigational Drugs**, **2 (10)**: 1368-1374. 2001.

- DESMONTS, G., REMINGTON, J.S. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. **J Clin. Microbiol.**; **11 (6)**: 562-568. 1980.
- DESMONTS, G., FORESTIER, F., THULLIEZ, P.H., DAFFOS, F., CAPELLA-PAVLOVSKY, M., CHARTIER, M. Prenatal Diagnosis of congenital toxoplasmosis. **Lancet**, **2**: 500-504. 1985.
- DINIZ, E.M.A., CAMARGO, M.E., COSTA VAZ, F.A., Toxoplasmose congênita. In: DINIZ, E.M.A., COSTA VAZ, F.A. **Infecções congênitas e perinatais**. São Paulo. Atheneu, p.31-72, 1991.
- DUBEY, J.P. Toxoplasmosis – an overview. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Helth.**, **22** (suppl), 88-119. 1991.
- DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S., SPEER, C.A. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. **Clinical Microbiology Reviews**, **11 (2)**: 267-299. 1998.
- DUBEY, J.P., THULLIEZ, P. Persistence of tissue cysts in edible tissues of cattle fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Am. J. Vet. Res.**, **54 (2)**: 270-273. 1993.
- EISEN, H.N., & SISKIND, G.W. Variations in affinities of antibodies during the immune response. **Biochemistry**, **3**: 996-1008. 1964.
- FERREIRA, M.U., KATZIN, A.M. The assessment of antibody affinity distribution by thiocyanate elution: a simple dose-response approach. **Journal of Immunological Methods**, **187**: 297-305. 1995.
- FLEGR, J., KODYM, P., TOLAROVA, V. Correlation of duration of latent *Toxoplasma gondii* infection with personality changes in women. **Biol. Psychology**, **53 (1)**: 57-68. 2000.

- FOULON, W., PINON, J.M., STRAY-PEDERSEN, B. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: A multicenter evaluation of different diagnostic parameters. **Am. J. Obstet. Gynaecol.**, **181**: 843-847. 1999.
- FOULON, W., VILLENA, I., STRAY-PEDERSEN, B., et al., Treatment of toxoplasmosis during pregnancy: A multicenter study of impact on fetal transmission and children's sequelae at age 1 year. **Am. J. Obstet. Gynaecol.**, **180**: 410-415. 1999.
- FRENKEL, J.K., DUBEY, J.P., MILLER, N.L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. **Science**, **167**: 893-896. 1970.
- FRENKEL, J.K., & WALLACE, G.D. Transmission of toxoplasmosis by tachyzoites: possibility and probability of a hypothesis. **Med. Hypotheses**, **5 (5)**: 529-532. 1979.
- FRENKEL, J.K. Diagnosis, incidence and prevention of congenital toxoplasmosis. **Am. J. Dis. Child.**, **144**: 957-959. 1990.
- FRENKEL, J.K. Pathophysiology of toxoplasmosis. **Parasitol. Today**, **4 (10)**: 273-278. 1988.
- FRENKEL, J.K. Toxoplasmosis testing during pregnancy. **JAMA**, **265 (2)**: 211. 1991.
- GIRALDO, M., PORTELA, R.W., SNEGE, M., LESER, P.G., CAMARGO, M.E., MINEO, J.R., & GAZZINELLI, R.T. Immunoglobulin M (IgM)-glycoinositolphospholipid enzyme linked immunosorbent assay: an immunoenzymatic assay for discrimination between patients with acute toxoplasmosis and those with persistent parasite-specific IgM antibodies. **Journal of Clinical Microbiology**, **40 (4)**: 1400-1405. 2002.

- GOTTSTEIN, B. *Toxoplasma gondii*: perspectives for a vaccine. **Schweiz. Med. Wochenschr.**, **65 (Suppl)**: 89-95. 1995.
- GUIMARÃES, A.C.S., KAWARABAY, M., BORGES, M.M., TOLEZANO, J.E., ANDRADE JR, H.F. Regional variation in toxoplasmosis seronegativity in the São Paulo metropolitan Region. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, **35 (6)**: 479-483. 1993.
- HALL, S.M. Congenital toxoplasmosis. [Review]. **BMJ**, **305**: 291-297. 1992.
- HEDMAN, K. & SEPPALA, I. Recent rubella virus infection indicated by a low avidity of specific IgG. **J. Clin. Immunol.**, **8 (3)**: 214-221. 1988.
- HEDMAN, K., ROUSSEAU, S.A. Measurement of avidity of specific IgG for verification of recent primary rubella. **J. Med. Virol.**, **27**: 288-292. 1989.
- HEDMAN, K., LAPPALAINEN, M., SODERLUND, M., & HEDMAN, L.. Avidity of IgG in serodiagnosis of infectious diseases. **Reviews in Medical Microbiology**, **4**: 123-129. 1993.
- HIRAMOTO, R.M., MAYRBAURL-BORGES, M., GALISTEO JR, A.J., MEIRELES, L.R., MACRE, M.S., & ANDRADE JUNIOR, H.F. Infectivity of cysts of the ME49 *Toxoplasma gondii* strain in bovine milk and homemade cheese. **Rev. Saúde Pública**, **35 (2)**: 113-118. 2001.
- HOHLFELD, P., DAFFOS, F., COSTA, J.M., THULLIEZ, P., FORESTIER, F., VIDAUD, M. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase chain reaction test on amniotic fluid. **N. England Journal of Medicine**, **33**: 695-699. 1994.
- HOHLFELD, P., DAFFOS, F., THULLIEZ, P., AUFRANT, C., COUVREUR, J., MACALEESE, J., DESCOMBEY, D., FORESTIER, F. Fetal Toxoplasmosis:

- outcome of pregnancy and infant follow-up after in utero treatment. **J. Pediatr.**, **115**: 765-769.1989.
- HOLLIMAN, R.E. Congenital toxoplasmosis: prevention, screening and treatment. **Journal of Hospital Infection**, **30**: 179-190. 1995.
- HOLLIMAN, R.E. Recent developments in the diagnosis of toxoplasmosis. **Serodiagn. Immunother. Infect. Dis.**, **6**: 5-16. 1994.
- HOWE, D.K., HONORÉ, S., DEROUIN, F., SIBLEY, L.D. Determination of Genotypes of *Toxoplasma gondii* Strains Isolated from Patients with Toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, **35 (6)**: 1411-1414. 1997.
- INOUE, S., HASEGAWA, A., MATSUNO, S., & KATOW, S. Changes in antibody avidity after virus infections: detection by immunosorbent assay in which a mild protein-denaturing agent employed. **Journal of Clinical Microbiology**, **20 (3)**: 525-529. 1984.
- JANKU, J. Pathogenesis and pathologic anatomy of coloboma of macula lutea in eye of normal dimensions, and in microphthalmic eye, with parasites in the retina. **Cas. Lek. Cesk.**, **62**: 1021-1027. 1923.
- JENUN, P.A., STRAY-PEDERSEN, B., GUNDERSEN, A.G. Improved diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in early pregnancy by determination of antitoxoplasma immunoglobulin G avidity. **J. Clin. Microbiol.**, **35**: 1972-1977. 1997.
- JONES, J.L., LOPEZ, A., WILSON, M., SCHULKIN, J., GIBBS, R. Congenital Toxoplasmosis: A Review. **Obstetrical and Gynecological Survey**, **56 (5)**: 296-305. 2001.

- KASPER, L.H., BUZONI-GATEL, D. Some opportunistic Parasitic Infections in AIDS: Candidiasis, Pneumocystosis, Criptosporidiosis, Toxoplasmosis. **Parasitology today**, **14 (4)**: 150-156. 1998.
- KASPER, L.H., & KHAN, I.A. Antigen-Specific CD8⁺ T Cells Protect against Lethal Toxoplasmosis in Mice Infected with *Neospora caninum*. **Infection and Immunity**, **66 (4)**: 1554-1560. 1998.
- KORHONEN, M.H., BRUNSTEIN, J., HAARIO, H., KATNIKOV, A., RESCALDANI, R., HEDMAN, K. A New Method with General Diagnostic Utility for the Calculation of Immunoglobulin G Avidity. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, **6 (5)**: 725-728. 1999.
- LAZZAROTTO, T., VARANI, S., SPEZZACATENA, P., GABRIELLI, L., PRADELLI, P., GUERRA, B., & LANDINI, M.P. Maternal IgG avidity and IgM detected by blot as diagnostic tools to identify pregnant women at risk of transmitting cytomegalovirus. **Viral Immunol.**, **13 (1)**: 137-141. 2000.
- LEHTONEN, O.P., & VILJANEN, M.K. A binding function for curve-fitting in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its use in estimating the amounts of total and high affinity antibodies. **Int. Journal Biomed. Comput.**, **13 (6)**: 471-479. 1982.
- LEVINE, N.D., CORLISS, J.O., COX, F.E.G., DEROUX, G., GRAIN, J., HONIGBERG, B.M., LEEDALE, G.F., LOEBLICH, A.R., LOM, J., LYNN, D., MERINFELD, E.G., PAGE, F.C., POLJANSKY, G., SPRAGUE, V., VAVRA, J., WALLACE, F.G. A newly revised classification of the Protozoa. **J. Protozool. Lawrence**, **27**: 37-58. 1980.

- LIESENFELD, O., NGUYEN, T.A., PHARKE, C., & SUZUKI, Y. Importance of gender and sex hormones in regulation of susceptibility of the small intestine to peroral infection with *Toxoplasma gondii* tissue cysts. **J. Parasitol.**, **87 (6)**: 1491-1493. 2001.
- LUFT, B.J., HAFNER, R., KORZUN, A.H., LEPORT, C., ANTONISKIS, D., BOSLER, E.M., BOURLAND, D., UTTAMCHANDANI, R., FUHRER, J., JACOBSON, J., MORLAT, P., VILDE, J.L., REMINGTON, J.S. Toxoplasmic Encephalitis in Patients with the acquired immunodeficiency Syndrome. **The New England Journal of Medicine**, **329**: 995-1000. 1993.
- LYONS, R.E., McLEOD, R., & ROBERTS, C.W. *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. **Trends in Parasitology**, **18 (5)**: 198-201. 2002.
- MACHADO, C.M., GONÇALVES, F.B., PANNUTI, C.S., DULLEY, F.L., & DE SOUZA, V.A.U.F. Measles in bone marrow transplant recipients during an outbreak in São Paulo, Brazil. **Blood**, **99 (1)**: 83-87. 2002.
- MARCOLINO, P.T., SILVA, D.A.O., LESER, P.G., CAMARGO, M.E., & MINEO, J.R. Molecular markers in Acute and Chronic Phases of Human Toxoplasmosis: Determination of Immunoglobulin G Avidity by Western Blotting. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, **7 (3)**: 384-389. 2000.
- MARTIN, V., ARCAVI, M., SANTILLAN, G., AMENDOEIRA, M.R., SOUZA NEVES, E., GRIEMBERG, G., GUARNERA, E., GARBERI, J.C., ANGEL, S.O. Detection of human *Toxoplasma*-Specific immunoglobulins A,M, and G with a recombinant *Toxoplasma gondii* rop2 protein. **Clinical Diagnosis Lab. Immunol.**, **5 (5)**: 627-631. 1998.

- McCLOSKEY, N., TURNER, M.W., & GOLDBLATT, T.D. Correlation between the avidity of mouse-human chimeric IgG subclass monoclonal antibodies measured by solid-phase elution ELISA and biospecific interaction analysis (BIA). **J. Immunol. Methods.**, **205 (1)**: 67-72. 1997.
- MINEO, J.R. **Detecção de antígeno e de anticorpos, com técnicas imunoenzimáticas, para o diagnóstico sorológico da toxoplasmose "aguda"**. Tese de doutorado – Instituto de Ciências Biomédicas/USP. 1982.
- MONDRAGON, R., HOWE, D.K., DUBEY, J.P., SIBLEY, D. Genotypic Analysis of *Toxoplasma gondii* Isolates from pigs. **Journal of Parasitology**, **84 (3)**: 639-641. 1998.
- MULLINS, K.B. The unknown origin of the Polymerase Chain Reaction. **Scientific American**. 1990.
- NEDELJKOVIC, J., JOVANOVIC, T., OKER-BLOM, C. Maturation of IgG avidity to individual rubella virus structural proteins. **J. Clin. Virol.**, **22 (1)**: 47-54. 2001.
- NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 6 ed. Rio de Janeiro. Atheneu, p. 141-153. 1985.
- PARK, B.K., MOON, H.R., YU, J.R., KOOK, J., CHAI, J.Y., & LEE, S.H. Comparative susceptibility of different cell lines for culture of *Toxoplasma gondii* in vitro. **Korean J. Parasitol.**, **31 (3)**: 215-222. 1993.
- PASSOS, L.N., FILHO, O.F.A., & ANDRADE JUNIOR, H.F. Toxoplasma Encephalitis in AIDS patients in São Paulo during 1988 and 1991. A comparative retrospective analysis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, **42 (3)**: 141-145. 2000.

- PAUL, M. Immunoglobulin G avidity in diagnosis of toxoplasmic lymphadenopathy and ocular toxoplasmosis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, **6 (4)**: 514-518. 1999.
- PAUNIO, M., HEDMAN, K., DAVIDKIN, I., VALLE, M., HEINONEN O.P., LEINIKKI, P., SALMI, A., & PELTOLA, H. Secondary measles vaccine failures identified by measurement of IgG avidity: high occurrence among teenagers vaccinated at a young age. **Epidemiol. Infect.**, **124 (2)**: 263-71. 2000.
- PELLOUX, H., BRUN, E., VERNET, G., MARCILLAT, S., JOLIVET, M., GUERGOUR, D., FRICKER-HIDALGO, H., GOULLIER-FLEURET A., AMBROISE-THOMAS, P. Determination of anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulin G avidity: adaptation to the Vidas system (bioMerieux). **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, **32 (2)**: 69-73. 1998.
- PEYRON, F., & WALLON, M. Options for the pharmacotherapy of toxoplasmosis during pregnancy. **Expert. Opin. Pharmacother.**, **2 (8)**: 1269-1274. 2001.
- PIRES, M. **Toxoplasmose e Gravidez: Diagnóstico pré-natal pelo método de PCR e resultados pós-natais.** Tese de mestrado – Faculdade de Medicina/USP. 1999.
- POLANEC, J., SEPPALA, I., ROSSEAU, S., HEDMAN, K. Evaluation of protein-denaturing immunoassays for avidity of immunoglobulin G to rubella virus. **J. Clin. Lab. Anal.**, **8 (1)**: 16-21. 1994.
- PONS, J.C., SIGRAND, C., GRANGEOT, K.L., FRYDMAN, R., THULLIEZ, P. Congenital toxoplasmosis transmission to the fetus of a pregnancy maternal infection. **Presse Med.**, **24 (3)**: 179-182. 1997.

- PULLEN, G.R., FITZGERALD, M.G., HOSKING, C.S. Antibody avidity determination by ELISA using thiocyanate elution. **J. Immunol. Methods.**, **22; 86 (1)**: 83-87. 1986.
- REMYINGTON, J.S., McLEOD, R., DESMONTES, G. Toxoplasmosis. In: REMINGTON, J.S., KLEIN, J.O, eds. **Infectious diseases of the fetus & newborn infant**. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders, 140-267. 1995.
- ROBERTS, A., HEDMAN, K., LUYASU, V., ZUFFEREY, J., BESSIERES, M.H., BLATZ, R.M., CANDOLFI, E., DECOSTER, A., ENDERS, G., GROSS, U., GUY, E., HAYDE, M., HO-YEN, D., JOHNSON, J., LECOLIER, B., NAESSENS, A., PELLOUX, H., THULLIEZ, P., & PETERSEN E. Multicenter evaluation of strategies for serodiagnosis of primary infection with *Toxoplasma gondii*. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, **20 (7)**: 467-474. 2001.
- ROBERTS, F., McLEOD. Pathogenesis of toxoplasmic Retinochoroiditis. **Parasitology Today**, **15 (2)**: 51-57. 1999.
- ROBERTS, T., FRENKEL, J.K. Estimating income losses and other preventable costs caused by congenital toxoplasmosis in people in the United States. **J. Am. Med. Assoc.**, **2**: 249-256. 1990.
- ROSSI, C.L. A simple, rapid enzyme-linked immunosorbent assay for evaluating immunoglobulin G antibody avidity in toxoplasmosis. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, **30 (1)**: 25-30. 1998.
- SABIN, A.B. Toxoplasmic encephalitis in children. **J. Amer. Med. Ass**, **116**: 801-807. 1941.

- SABIN, A.B., FELDMAN, H.A. Dyes a microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (toxoplasma). **Science, Washington, 108:** 660-663. 1948.
- SANCHEZ, M.C.A. Testes sorológicos. In: FERREIRA, A.W., & AVILA, S.L.M. **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto Imunes.** 1^a Ed. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, p. 7-28. 1996.
- SANCHEZ, R.M., GORDO, R.B., AMADOR, E.A., BERRIO, L.A. Prevalência de infección toxoplásmica en gestantes de la provincia la Habana. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 36 (5):** 445-450. 1994.
- SENG, S., NAGASAWA, H., MAKI, Y., YOKOYAMA, M., INOUE, N., XUAN, X., IGARASHI, I., SAITO, A., FUJISAKI, K., MIKAMI, T., SUZUKI, N., & TOIODA, Y. Increased susceptibility to *Toxoplasma gondii* infection in SAG-1 transgenic mice. **International Journal for Parasitology, 29:** 1433-1436. 1999.
- SENSINI, A., PASCOLI, S., MARCHETTI, D., CASTRONARI, R., MARANGI, M., SBARAGLIA, G., CIMMINO, C., FAVERO, A., CASTELLETTO, M., & MOTTOLA, A. IgG avidity in the serodiagnosis of acute *Toxoplasma gondii* infection: a multicenter study. **Clinical Microbiology Infect., 2 (1):** 25-29. 1996.
- SHARMA, S.D. Immunology of toxoplasmosis. In: DAVID, J.W. **Modern parasite biology: cellular, immunological and molecular aspects.** New York: WD Freeman, p. 184-199. 1990.

SOUZA, V.A., PANNUTI, C.S., SUMITA, L.M., ANDRADE JR, H.F. Enzyme-Linked immunosorbent assay-IgG antibody avidity test for single sample serologic evaluation of measles. **J. Med. Virol.**, **52 (3)**: 275-279. 1997.

STANKUS, R.P., & LESLIE, G.A. Affinity-Immunoabsorbent Fractionation of Rat Anti-Streptococcal a Carbohydrate Antibodies of Restricted Heterogeneity. **Journal of Immunological Methods**, **10**: 307-316. 1976.

STRAY-PEDERSEN, B., JENUN, P.A. Economic evaluation of preventive programmes against congenital toxoplasmosis. **Scand. J. Infect. Dis.**, **84**: 86-96. 1992.

SUZUKI, L.A., ROCHA, R.J., ROSSI, C.L. Evaluation of serological markers for the immunodiagnosis of acute acquired toxoplasmosis. **J. Med. Microbiol.**, **50 (1)**: 62-70. 2001.

TARLITON, D.M., & SMITH, K.G.C. Dissecting affinity maturation: a model explaining selection of antibody-forming cells and memory B cells in the germinal centre. **Immunology Today**, **21 (9)**: 436-441. 2000.

THOMAS, H.I.J., & MORGAN-CAPNER, P. Rubella-specific IgG subclass avidity ELISA and its role in the differentiation between primary rubella and rubella reinfection. **Epidem. Inf.**, **101**: 591-598. 1988.

THOMAS, H.I.J., & MORGAN-CAPNER, P. The use of antibody avidity measurements for the diagnosis of rubella. **Rev. Med. Virol.**, **1**: 41-50. 1991.

- THOMAS, H.I.J., MORGAN-CAPNER, P., ENDERS, G., O'SHEA, S., CALDICOTT, D., & BEST, J.M. Persistence of specific IgM and low avidity specific IgG1 following primary rubella. **J. Virol. Methods**, **39 (1-2)**: 149-155. 1992.
- THOMAS, P.A., PELLOUX, H. Toxoplasmosis congenital and in immunocompromised patients: a parallel. **Parasit. Today**, **9 (2)**: 61-63. 1993.
- VENKATESAN, P., WAKELIN, D. Elisas for parasitologists: or lies, damned lies and Elisas. **Parasitology Today**. **9 (6)**: 228-232. 1993.
- VIANA, L.G., RABELLO, A., & KATZ, N. Antibody subclass profile and avidity during acute and chronic human *Schistosoma mansoni* infection. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **95 (5)**: 550-556. 2001.
- VIDIGAL, P.V., SANTOS, D.V., CASTRO, F.C., COUTO, J.C., VITOR R.W., & BRASILEIRO FILHO, G. Prenatal toxoplasmosis diagnosis from amniotic fluid by PCR. **Revista da Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, **35 (1)**: 1-6. 2002.
- VILLAVEDRA, M., BATTISTONI, J.J., ROSSI, S., CAROL, H., NIETO, A. Avidity analysis of the human immune response to a chitin binding protein of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, **31**: 1087-1092. 2001.
- WAINSTEIN, M.V. Achados neuropatológicos na Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA): Revisão de 138 casos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **25 (2)**: 95-99. 1992.
- WEBSTER, J.P., BRUNTON, C.F., MACDONALD, D.W. Effect of *Toxoplasma gondii* upon neophobic behaviour in wild brown rats, *Rattus norvegicus*. **Parasitology**, **109 (1)**: 37-43. 1994.

- WEISS, J.B. DNA probes and PCR diagnosis of parasitic infections. **Clinical Microbiology Reviews**, **8 (1)**: 113-130. 1995.
- WILSON, C.B., REMINGTON, J.S., STAGNO, J.S., REYNOLDS, D.W. Development of adverse sequelae in children born with subclinical congenital *Toxoplasma* infection. **Pediatrics**, **66 (5)**: 767-774. 1980.
- WOLF, A., & COWEN, D. Granulomatous encephalomyelitis due to an encephalytozoon (encephantozic encephalomyelitis). A new protozoan disease of man. **Bull. Neurol. Inst.**, **6**: 306-371. 1937.
- WONG, S.Y., REMINGTON, J.S. Biology of *Toxoplasma gondii*. **AIDS**, **7**: 299-316. 1993.
- WUORIMAA, T., DAGAN, R., VAKEVAINEN, M., BAILLEUX, F., HAIKALA, R., YAICH, M., ESKOLA, J., KAYHTY, H. Avidity and subclasses of IgG after immunization of infants with an 11-valent pneumococcal conjugate vaccine with or without aluminum adjuvant. **J. Infect. Dis.**, **1; 184 (9)**:1211-1215. 2001.

ANEXO I

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº
APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....).

2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO.:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....).

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA .Avaliação da quantificação da Avidéz dos Anticorpos Maternos na Abordagem Laboratorial da Toxoplasmose Congênita

PESQUISADOR: Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Jr e Miriam de Souza Macre

CARGO/FUNÇÃO: Professor Assistente Doutor da Faculdade de Medicina da USP

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL N: CREMESP 24325

UNIDADE DO HCFMUSP: Instituto de Medicina Tropical

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO ☐

RISCO MÍNIMO ☒

RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐

RISCO MAIOR ☐

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 3, anos

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

1. justificativa e os objetivos da pesquisa: A toxoplasmose é considerada a principal doença causada por protozoários. Mesmo com seus baixos índices de mortalidade, é intenso o seu efeito sobre os imunodeprimidos, gestantes no primeiro trimestre de gravidez e na infecção congênita. Ela é transmitida pelo contato com gato, por alimentos mal cozidos, saladas mal lavadas e pela terra, na qual a grávida, na grande maioria das vezes, não sente nada. Essa doença é causada por um “bicho” chamado *Toxoplasma gondii*, que pode passar para o bebê durante a gravidez, causando defeitos graves para ele, como: água na cabeça, cegueira, retardo mental ou mesmo a morte da criança. Baseados nesses dados, acreditamos que esse trabalho possa colaborar com o estudo da toxoplasmose em imunocompetentes, através da realização de pesquisa do agente da toxoplasmose no sangue e no líquido amniótico das gestantes, auxiliando assim, no tratamento precoce da doença.
2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais: O procedimento envolve a introdução de uma fina agulha no abdome da paciente e a aspiração do líquido amniótico, com o monitoramento de ultrassom, com assepsia e risco mínimo para a criança. O material coletado será analisado no laboratório através de pesquisa do agente causador da doença. Será coletado também 10 a 20 ml de sangue da paciente.
3. desconforto e riscos esperados: Existe o risco de abortamento, após o exame, em torno de 1% acima do índice de abortamento espontâneo. Existe também um pequeno risco de falha laboratorial na obtenção de resultados e da necessidade de nova coleta de material quando isto ocorrer.
4. benefícios que poderão ser obtidos: Quanto mais cedo se detectar a toxoplasmose na gravidez, maior a possibilidade de tratamento e identificação da fase em que a infecção se encontra.
5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo: Adoção de uma dieta específica de prevenção da toxoplasmose, como: ingestão de carnes cozidas ou bem passadas, leite pasteurizado e fervido, água filtrada e tratada, bem como evitar a criação do hospedeiro definitivo da toxoplasmose, que é o gato.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1. O paciente terá acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, dirigindo-se ao Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da USP.
2. O paciente ou seu representante legal terá liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
3. Os pesquisadores responsáveis salvaguardam a confidencialidade, sigilo e privacidade dos dados.
4. Haverá a disponibilidade de assistência para o tratamento pré-natal e pós-natal no Serviço de Obstetrícia e Ginecologia do HCFMUSP, e na dependência de disponibilidade tanto do sujeito quanto do serviço, o atendimento obstétrico.
5. Não há previsão de danos à saúde decorrentes da pesquisa, que justifiquem indenização de qualquer tipo..

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Miriam de Souza Macre – Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical da FMUSP

Av. Dr Enéas de Carvalho Aguiar nº 470 – Tel: 3066-7010 , Tel. Res: 6561-1657

Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Jr – Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical da FMUSP – Endereço acima.

Dr. Seizo Miyadahira – Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas – FMUSP

Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar nº 255 - 10º andar – Tel: 3069-6209 e 3069-6445

Dr. Márcio Pires – Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas – FMUSP – Endereço acima.

Dra. Maria Rita Bortolotto – Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas – FMUSP - Endereço acima.

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de .

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

ANEXO II

Com avidéz determinada na diluição com A entre 0.4 e 2.5.

	A ELISA IgG		
	Média	N	Desvio Padrão
BAIXA	2.297700	10	.941841
INTERMEDIÁRIA	1.863299	67	.973501
ALTA	1.899348	23	.810300

ANOVA NS

Com avidéz com Uréia 8M

	AELISAIG	A ELISAIG	AELISAIG
	Média	N	Desvio Padrão
BAIXA	1.951667	6	1.186263
INTERMEDIÁRIA	1.973662	68	.842460
ALTA	1.984143	49	1.007816

Avidéz com NH_4SCN 0.5M

	A ELISA IgG		
	Média	N	Desvio Padrão
BAIXA	.580000	1	0.000000
INTERMEDIÁRIA	1.711789	19	.861353
ALTA	2.025804	102	.903751

ANOVA NS

Avidéz com NH_4SCN 1M

	AELISAIG	AELISAIG	AELISAIG
	Média	N	Desvio Padrão
BAIXA	2.179375	8	.709583
INTERMEDIÁRIA	1.812027	74	.905499
ALTA	2.222300	40	.942742

ANOVA NS

Avidéz com Uréia 6M e antígeno recombinante rRop2

	A ELISAIG	A ELISAIG	A ELISAIG
	Média	N	Desvio Padrão
BAIXA	3.000000	1	0.000000
INTERMEDIÁRIA	2.337545	11	.822263
ALTA	2.063602	113	.882716

ANOVA NS

Avidez com NH_4SCN 0.5M e antígeno recombinante r Rop 2

	AELISAIG	AELISAIG	AELISAIG
	Média	N	Desvio Padrão
BAIXA	1.800000	26	1.024525
INTERMEDIÁRIA	2.049800	75	.847863
ALTA	2.556875	24	.612696

ANOVA NS

Avidez determinada pelo desvio da curva de diluição do soro

	AELISAIG	AELISAIG	AELISAIG
	Média	N	Desvio Padrão
BAIXA	1.331000	3	.883605
INTERMEDIÁRIA	2.387462	13	.898177
ALTA	1.855532	77	.930464

Avidez determinada pela concentração de NH_4SCN 50%

	AELISAIG	AELISAIG	AELISAIG
	Média	N	Desvio Padrão
BAIXA	1.896375	8	.910760
INTERMEDIÁRIA	1.661966	29	.838693
ALTA AVIDEZ	2.090395	86	.931863

ANOVA NS

Com avidéz determinada na diluição limitada

	TIFIG	TIFIG	TIFIG
	Média	N	Desvio Padrão
BAIXA	320.0000	10	381.3240
INTERMEDIÁRIA	193.0746	67	129.9838
ALTA	200.3478	23	197.7838

KW NS

Com avidéz com Uréia 8M

	TIFIG	TIFIG	TIFIG
	Média	N	Desvio Padrão
BAIXA	154.6667	6	86.8531
INTERMEDIÁRIA	187.7015	67	132.6308
ALTA	222.5306	49	222.7864

KW NS

Com avidéz determinada com NH_4SCN 0.5M

	TIFIG	TIFIG	TIFIG
	Média	N	Desvio Padrão
BAIXA	128.0000	1	0.0000
INTERMEDIÁRIA	138.1053	19	70.7970
ALTA	225.0297	101	200.3378

KW $p < 0.1$

Com avidéz determinada com NH_4SCN 1M

	TIFIG	TIFIG	TIFIG
	Média	N	Desvio Padrão
BAIXA	152.0000	8	67.8823
INTERMEDIÁRIA	175.6757	74	129.4062
ALTA	254.7692	39	240.1441

KW $p < 0.1$

Com avidéz com antígeno recombinante rRop 2 e Uréia 6M

	TIFIG	TIFIG	TIFIG
	Média	N	Desvio Padrão
BAIXA	1024.000	1	0.0000
INTERMEDIÁRIA	180.364	11	74.7359
ALTA	194.929	112	160.1477

KW NS

Avidéz com antígeno recombinante rRop 2 e NH_4SCN 0.5M

	TIFIG	TIFIG	TIFIG
	Média	N	Desvio Padrão
BAIXA	237.8462	26	247.2666
INTERMEDIÁRIA	186.4533	75	126.9550
ALTA	203.1304	23	192.6314

KW NS

Avidéz medida pelo desvio da curva de diluição

	TIFIG	TIFIG	TIFIG
	Média	N	Desvio Padrão
BAIXA	117.3333	3	121.1500
INTERMEDIÁRIA	312.6154	13	325.8541
ALTA	195.4286	77	158.5695

KW NS

Avidez determinada pela concentração molar de NH_4SCN 50%

	TIFIG	TIFIG	TIFIG
	Média	N	Desvio Padrão
BAIXA	152.0000	8	67.8823
INTERMEDIÁRIA	176.0000	28	85.9974
ALTA	212.3721	86	198.4890

KW NS

Avidez com uréia 8M

	TIFIM	TIFIM	TIFIM
	Média	N	Desvio Padrão
BAIXA	18.66667	6	22.43806
INTERMEDIÁRIA	37.88235	68	66.09435
ALTA	25.14286	49	37.84178

KW NS

Avidez com NH_4SCN 1M

	TIFIM	TIFIM	TIFIM
	Média	N	Desvio Padrão
BAIXA	56.00000	8	60.17118
INTERMEDIÁRIA	26.91892	74	54.08992
ALTA	33.80000	40	54.27338

KW NS

Avidez com antígeno recombinante rRop II e NH_4SCN 0.5M

	TIFIM	TIFIM	TIFIM
	Média	N	Desvio Padrão
BAIXA	37.84615	26	62.32026
INTERMEDIÁRIA	20.26667	75	31.54633
ALTA	49.00000	24	75.39115

KW NS

Avidez determinada pelo desvio da curva de diluição

	TIFIM	TIFIM	TIFIM
	Média	N	Desvio Padrão
BAIXA	88.00000	3	69.28203
INTERMEDIÁRIA	45.53846	13	77.45172
ALTA	27.84416	77	49.18897

KW NS

Avidez determinada pela concentração 50% de NH_4SCN

	TIFIM	TIFIM	TIFIM
	Média	N	Desvio Padrão
BAIXA	41.00000	8	54.33231
INTERMEDIÁRIA	44.68966	29	72.04815
ALTA	26.69767	86	48.00957

KW NS

Avidez com Uréia 6M e antígeno total de *T.gondii*

	DOIGA	DOIGA	DOIGA
	Média	N	Desvio Padrão
BAIXA	.285500	2	.074246
INTERMEDIÁRIA	.393692	26	.269152
ALTA	.389362	94	.281695

KW NS

Avidez determinada na diluição do soro para A entre 0.4 e 2.5

	DOIGA	DOIGA	DOIGA
	Média	N	Desvio Padrão
BAIXA	.335400	10	.226165
INTERMEDIÁRIA	.405910	67	.324194
ALTA	.431087	23	.224749

KW NS

Avidez com uréia 8M

	DOIGA	DOIGA	DOIGA
	Média	N	Desvio Padrão
BAIXA	.329000	6	.139165
INTERMEDIÁRIA	.351661	62	.261610
ALTA	.426796	49	.301853

KW NS

Avidez com NH_4SCN 0.5M

	DOIGA	DOIGA	DOIGA
	Média	N	Desvio Padrão
BAIXA	.629000	1	0.000000
INTERMEDIÁRIA	.386105	19	.314814
ALTA	.386686	102	.270241

KW NS

Avidez com NH_4SCN 1M

	DOIGA	DOIGA	DOIGA
	Média	N	Desvio Padrão
BAIXA	.466167	6	.433470
INTERMEDIÁRIA	.369829	70	.267063
ALTA	.388775	40	.272539

KW NS

Avidez com antígeno recombinante rRop 2 e Uréia 6M

	DOIGA	DOIGA	DOIGA
	Média	N	Desvio Padrão
BAIXA	.731000	1	0.000000
INTERMEDIÁRIA	.199778	9	.115980
ALTA	.407232	95	.280886

KW $p < 0.05$ Avidez com antígeno recombinante rRop 2 e NH_4SCN 0.5 M

	DOIGA	DOIGA	DOIGA
	Média	N	Desvio Padrão
BAIXA	.433040	25	.336717
INTERMEDIÁRIA	.400938	65	.268727
ALTA	.288600	15	.177876

KW NS

Avidez determinada pelo desvio da curva de diluição com uréia 6M

	DOIGA	DOIGA	DOIGA
	Média	N	Desvio Padrão
BAIXA	.295000	3	.138597
INTERMEDIÁRIA	.381308	13	.281081
ALTA	.402364	77	.299385

KW NS

Avidez determinada pela concentração 50% de NH_4SCN

	DOIGA	DOIGA	DOIGA
	Média	N	Desvio Padrão
BAIXA	.359571	7	.160588
INTERMEDIÁRIA	.411464	28	.301129
ALTA	.373805	82	.276242

KW NS