

ROGÉRIO SAAD VAZ

**DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO, ISOLAMENTO E
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii*
(NICOLE & MANCEAUX, 1909) EM MULHERES GESTANTES
ATENDIDAS PELO SERVIÇO PÚBLICO NA CIDADE DE
CURITIBA.**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Área de Concentração em Saúde Humana e Animal, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Processos Biotecnológicos.

Orientadora: Profa. Dra. Vanete Thomaz Soccol

Co-orientador: Prof. Dr. Denis José Nascimento

CURITIBA

2006

Vaz, R.S.

DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* (NICOLE & MANCEAUX, 1909) EM MULHERES GESTANTES ATENDIDAS PELO SERVIÇO PÚBLICO NA CIDADE DE CURITIBA. Rogério Saad Vaz. Curitiba-PR, 2006.

211 f.

Tese: Doutorado – Universidade Federal do Paraná. Setor Tecnológico. Pós-graduação em Processos Biotecnológicos.

Título em Inglês: SERODIAGNOSTIC, ISOLATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Toxoplasma gondii* IN PREGNANT WOMEN ATTENDED BY PUBLIC HEALTH SERVICES IN THE CITY OF CURITIBA.

Palavras chave: 1. *Toxoplasma gondii*. 2. Gestantes. 3. Amniocentese
4. Diagnóstico Clínico. 5. Reação em Cadeia da Polimerase.

Key words: 1. *Toxoplasma gondii*. 2. Pregnant women. 3. Amniocentesis.
4. Clinical Diagnostic. 5. Polymerase Chain Reaction.

ROGÉRIO SAAD VAZ

DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* (NICOLE & MANCEAUX, 1909) EM MULHERES GESTANTES ATENDIDAS PELO SERVIÇO PÚBLICO NA CIDADE DE CURITIBA.

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências no Curso de Pós-graduação em Processos Biotecnológicos, Área de Concentração em Saúde Humana e Animal da Universidade Federal do Paraná, pela comissão examinadora:

Presidente da Banca: Prof. Dr. _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Prof. Dr. _____

Prof. Dr. _____

Prof. Dr. _____

Curitiba, ____ de _____ de 2006

DEDICATÓRIA

À minha esposa Rossana e a minha filha Ulli, e também a minha filha “gata-persa” Lali que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos da minha vida, e que me deram incondicionalmente suporte emocional, e atenção necessários nas etapas mais difíceis desta tese.

Gratia tecum

À minha querida mãe Ilka, que sempre esteve ao meu lado, de quem sinto muitíssimo orgulho de ser filho.

Gratia tecum

À minha sogra Isabel, que também sempre me apoiou e orou comigo todas as vezes em que senti necessidade.

Gratia tecum

Fontibus ex modicis concrescit maximus amnis.

Werner

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Denis José Nascimento, muito obrigado por ter aberto as portas do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pela paciência, atenção, incentivo e orientação durante o desenvolvimento da parte clínica deste estudo.

Gratias tibi ago

Ao Dr. Hamilton Julio e toda a equipe médica e funcionários do setor de Ecografia da Maternidade do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, que sempre me acolheram com o maior carinho e muito colaboraram durante o atendimento as gestantes e nos procedimentos de amniocentese.

Gratias tibi ago

À toda equipe do Laboratório Municipal de Curitiba, em especial a Dra. Elaine Sumikawa e a Dra. Tomoko Ito, sem as quais não seria possível a realização dos procedimentos imunoenzimáticos, nem da obtenção dos dados necessários a esta tese de doutorado.

Gratias tibi ago

Agradeço também a todos os profissionais da Secretaria Municipal de Saúde da Prefeitura de Curitiba e do Projeto Mãe Curitibana, os quais possibilitaram a realização deste estudo e que me permitiram ter o privilégio de contribuir de forma direta e indireta com a saúde da população curitibana.

Gratias tibi ago

À Prof. Dra. Vanete Thomaz Soccol, os meus agradecimentos por seu exemplo de dedicação à pesquisa e docência e pela valiosa e precisa orientação científica que tive a honra de receber em todas as etapas de execução deste trabalho.

Gratias tibi ago

Agradeço a toda a equipe de funcionários e professores e pesquisadores do Laboratório de Parasitologia Molecular da Universidade Federal do Paraná, que sempre colaboraram para a viabilização deste estudo e a finalização desta tese de doutorado, em especial às Profas. Dras. Edilene Alcântara de Castro e Rosângela Paulino.

Gratias tibi ago

Agradeço a todos os meus colegas doutorandos, por todos os momentos, fossem “*light*” ou “*heavy metal*”.....

Gratias tibi ago

Agradeço a todos os Professores e a Coordenação do Programa de Doutorado em Processos Biotecnológicos da UFPR pelo aprendizado e acima de tudo, pela compreensão e amizade durante o desenvolvimento desta tese.

Gratias tibi ago

Aos amigos do Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti, pela infinita paciência e pelo carinho durante as “*benditas*” passagens *in vivo* e *in vitro*, em especial às Médicas Veterinárias, Dra. Rosária Richartz, Dra. Mara Joineaux e Dra. Cidinha.

Gratias tibi ago

Agradeço também à Profa. Dra. Rosângela Locatelli Dittrich, pela colaboração nos difíceis e “intermináveis” procedimentos de cultivo celular de *Neospora caninum*.

Gratias tibi ago

Ao Prof.Dr. Hervé Pelloux, da Universidade de Grenoble – França, pelo apoio técnico e científico, necessários a esta tese de doutorado

Gratias tibi ago

À Profa.Dra. Florence Robert-Gangneux, do Laboratoire de Parasitologie, Centre Hospitalier Universitaire Cochin-Port Royal, Paris , França, pelas preciosas informações sobre a toxoplasmose, sobre os genótipos prevalentes e os métodos diagnósticos mais utilizados na França.

Gratias tibi ago

Agradeço a todas as gestantes que participaram deste estudo, a quem expresseo o meu maior apreço e respeito.

Gratias tibi ago

E finalmente, agradeço a Deus e a seus santos anjos, pela certeza que nos momentos de maior dificuldade me guiaram por caminhos seguros para esta tese e para a vida.

Gr̄atia Dei cum omnibus vobis

Hominis ... mens discendo alitur et cogitando

Cícero

Effugere non potes nessitates; potes vincere

Sêneca

Sapiens dominarbitur astris

Veritas Lux Mea

Lux Vincere Tenebras

Dominus Illuminatio Mea

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1 - A - Fotomicrografia Eletrônica de Taquizoíto de *Toxoplasma gondii*. B: Fotomicrografia de taquizoítos de *Toxoplasma gondii*, em coloração May Grünwald - Giemsa, obtidos de lavado peritoneal de camundongo inoculado com cepa RH de *T. gondii*. (Aumento de 1.000x)..... 14
- Figura 2 – Fotomicrografia de Bradizoítos de *Toxoplasma gondii* no interior de um cisto em corte histológico de cérebro de camundongo. Aumento 400X..... 15
- Figura 3 - Oocisto imaturos (A) e esporulados (B) de *Toxoplasma gondii*. Fotomicrografia – aumento 100X (A) e 400 X (B)..... 16
- Figura 4 - Ciclo Biológico do *Toxoplasma gondii*. 19

CAPÍTULO II

- Figura 1 - Percentual de pacientes do sexo masculino (29%, n = 153.944) e do sexo feminino (71%, n= 376.175) atendidos pelo programa de saúde do município de Curitiba durante o período de 01/04/03 a 31/07/04 (n= 530.119)..... 71
- Figura 2 – Percentual de mulheres em idade reprodutiva (15 a 49 anos) com teste imunológico de gestação reagente (TIG+) que realizaram, ou não, o exame de sorologia para Toxoplasmose, durante o período de 01/04/2003 a 31/07/2004..... 72
- Figura 3 – Percentual de mulheres em idade reprodutiva que se apresentaram reativas, para IgM e IgG anti-*Toxoplasma*, durante o período de 01/04/03 a 31/07/04..... 74
- Figuras 4 – Percentual de gestantes avaliadas pela pesquisa de imunoglobulinas IgM (A) e IgG (B) nas diferentes Administrações Regionais da Cidade de Curitiba – PR..... 75
- Figura 5 - Percentual de mulheres em idade reprodutiva ($25,5 \pm 7,0$) submetidas ao teste de avididade (IgG-Av, n= 166) e resultados distribuídos em: avididade fraca 28,3%(n= 47), avididade forte 58,4% (n= 97), e avididade intermediária 13,3% (n= 22), durante o período de 01/04/2003 a 31/07/2004..... 76

CAPÍTULO III

- Figura 1 - Concentração média de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* (por mL), da 1^a a 55^a passagem intraperitoneal (IP) em camundongos Swiss Webster infectados com amostras de líquido amniótico (LA) de gestantes com indicação sorológica de toxoplasmose..... 118
- Figura 2 - A e B. Taquizoítos de *Toxoplasma gondii* isolados de exsudato peritoneal de camundongos do tipo Swiss Webster infectados com amostras de líquido amniótico de gestantes. Formas: extracelulares e intracelulares 120

Figura 3 - A e B. Taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> extra e intracelulares de exsudato peritoneal (aumento: 400 e 1000 X) de camundongo inoculado com camada leucocitária de gestante em fase aguda.....	121
Figura 4 - A. Taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> em suspensão de cérebro (extensão) de camundongo infectado com suspensão leucocitária isolada de sangue de gestante em fase aguda de infecção.(microscopia óptica – 1000X. B – Cisto de <i>Toxoplasma gondii</i> encontrado em camundongo inoculado com camada leucocitária de sangue de gestante em fase aguda de infecção (Pesquisa em corte histológico, aumento de 1000X).....	122
Figura 5 A e B – Taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> em cultivo de células Vero em período de isolamento. Amostra de líquido amniótico com parasitos livres e no interior de células de descamação fetal (A: aumento 400X em microscópio de campo invertido e B: microscópio óptico em aumento de 1000 X).....	124
Figura 6- Monocamada de células Vero infectada com cepa de <i>Toxoplasma gondii</i> isolada de líquido amniótico de gestante com indicação clínica e laboratorial para Toxoplasmose (fase recente de Infecção). Período de Manutenção (concentração > 1X10 ⁶ parasitos/mL). Aumento 400X.....	125
Figura 7 – Fotomicrografia de taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> (microscópio de campo invertido 400X) no período de multiplicação dos parasitos em cultivo de células Vero com uma concentração média final de 6,15 X10 ⁷ parasitos/mL (10 Meses pós-inóculo inicial de amostra de líquido amniótico).....	126
Figura 8 - Comportamento dos isolados de amostras clínicas e de cepas referência (RH- <i>T. gondii</i> e NC-1- <i>N. caninum</i> , estabelecidas em cultivo celular e suas respectivas diluições.....	127
Figura 9 A - Formas extracelulares de taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> isolados de sangue e fluído de placenta, de gestante no pós parto. B - Formas intracelulares de taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> isolados de sangue e fluído de placenta, de gestante no pós parto. Imagens digitalizadas (microscopia óptica, aumento - 1000X).....	128
Figura 10 - A. Imagem de amostra de sangue de cordão umbilical, obtido logo após o parto (da gestante EPS). Presença de taquizoítos livres e intracelulares (suspensão em meio de eagle). B. Imagem de amostra de sangue de cordão umbilical, logo após o parto (da gestante KCB). Presença de taquizoítos livres e intracelulares (aumento de 400 e 1000X).....	129
Figura 11 – Taquizoítos observados em extensão de suspensão de tecido cerebral de camundongos infectados, destinados a pesquisa de cistos cerebrais (aumento – 1000 X).....	130
Figura 12 - Pseudo-cistos de <i>Toxoplasma gondii</i> (10µm) observados em cortes de tecido cerebral de camundongos infectados, e destinados a pesquisa de cistos cerebrais (aumento - 1000 X).....	131
Figura 13 A - Fotomicrografia de corte histológico de placenta da gestante (ERJ) em coloração hematoxilina e eosina (HE) em aumento de 1000X. Alguns pontos enegrecidos (necróticos) na área de cordão umbilical e vasos hiperêmicos, e perda de massa de tecido conjuntivo. B - Fotomicrografia de corte histológico de placenta da gestante (DAFS) em coloração hematoxilina e eosina (HE) em aumento de 1000X. Alguns pontos enegrecidos (necróticos) e áreas hiperêmicas.....	132

CAPÍTULO IV

Figura 1: Amplificação do DNA extraído pelo método clássico (presença de rastros no gel), com os primers JW58 e 59 (gene <i>B1</i>). Perfil de banda Positiva: 301 bp.....	164
Figura 2: Bandas visíveis e definidas (ausência de rastro no gel) após amplificação pela PCR (JW58 e JW59). Amostras extraídas pelo método <i>Salting Out</i> . Perfil eletroforético: 301 bp.....	165
Figura 3: Amplificação do DNA (extraído por <i>Salting Out</i>), com os primers JW58 e 59 (gene <i>B1</i>). Perfil eletroforético: 301 bp.....	166
Figuras 4: Produtos da reação em cadeia da polimerase da porção terminal 5' do <i>locus</i> SAG2 (A) e e 3' do mesmo <i>locus</i> (B) Perfil eletroforético para a porção 5' do <i>locus</i> SAG2: 241pb e digestão pela <i>Sau3AI</i> . Perfil eletroforético para a porção 3' do <i>locus</i> SAG2: 221pb e digestão pela <i>HhaI</i>	169
Figura 5: Produtos da reação em cadeia da polimerase da porção terminal 5' do <i>locus</i> SAG2 (A) e e 3' do mesmo <i>locus</i> (B). Perfil eletroforético para a porção 5' do <i>locus</i> SAG2: 241pb e digestão pela <i>Sau3AI</i> . Perfil eletroforético para a porção 3' do <i>locus</i> SAG2: 221pb e digestão pela <i>HhaI</i>	170

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I

Tabela 1 - Mecanismo de Ação das Drogas do Protocolo contra Toxoplasmose Congênita.....	27
Tabela 2 – A e B – Prevalência de toxoplasmose em gestantes, em diversos países. B – Prevalência de toxoplasmose em gestantes em diferentes regiões do Brasil com dados soroepidemiológicos por pesquisa de IgG	29 / 30
Tabela 3- Parâmetros Sorológicos para Diagnóstico da Toxoplasmose Congênita.....	37

CAPITULO II

Tabela 1 - Métodos Imunoenzimáticos utilizados para diagnóstico de Toxoplasmose durante o período da pesquisa sorológica (01/04/2003 – 31/07/2004) e respectivos valores de sensibilidade e especificidade informados pelos <i>Kits</i> comerciais.....	67
Tabela 2 – A: Teste <i>K</i> – Análise de Concordância. B: Análise de Concordância e Variabilidade Interensaios.....	69 / 70
Tabela 3 - Número de gestantes participantes do Programa Mãe Curitibana (n = 20.389), que realizaram pesquisa para as imunoglobulinas IgM ou IgG e pesquisa para ambas simultaneamente (IgM e IgG) e percentual associado aos resultados.....	73
Tabela 4 - Perfil imune-humoral relacionado ao exame de Aidez (Avf / AVF) das gestantes (n= 13, 7,83%) que concordaram em participar da pesquisa relacionada a infecção toxoplásmica ao longo dos trimestres gestacionais.....	77
Tabela 5 - Média de Idade gestacional das gestantes por faixa etária em consulta prévia a amniocentese, por idade média (anos).....	78
Tabela 6 - Observações Clínicas registradas durante o procedimento de amniocentese acompanhado de ecografia e volume de líquido amniótico coletado para isolamento <i>in vivo</i> , <i>in vitro</i> e realização da reação em cadeia da polimerase (PCR) e do polimorfismo de fragmentos de DNA por restrição enzimática (RFLP-PCR).....	79
Tabela 7 - Dados Obstétricos das 13 gestantes com sorologia indicativa de toxoplasmose congênita, ao parto.....	81

CAPITULO III

Tabela 1 - Presença de Taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> (+) em amostra de líquido amniótico ricas em células de descamação fetal (LA) em suspensão direta e suspensão de sedimento pós-centrifugação (aumento - 200, 400 e 1000X).....	117
Tabela 2 - Concentração de taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> durante as 55 passagens intraperitoneais em camundongos submetidos a infecção com amostras de líquido amniótico de gestantes (n= 13) com indicação sorológica de toxoplasmose..	119
Tabela 3 - Isolamento, manutenção e crescimento de taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> em cultivo de células Vero, obtidos de amostras de líquido amniótico (n= 13) e camada leucocitária (n= 1) de gestantes com indicação sorológica de toxoplasmose (diluição utilizada – 1:2).....	123
Tabela 4 - Concentração de taquizoítos das cepas referência RH (<i>T. gondii</i>) e NC-1 (<i>N. caninum</i>) em cultivo de células Vero em meio de <i>Eagle</i> (MEM).....	124
Tabela 5 - Características de cultivos celulares a partir de cepas de <i>Toxoplasma gondii</i> isolados de líquido amniótico, sangue periférico anticoagulado de pacientes gestantes, e de cepa referência RH de <i>Toxoplasma gondii</i> e de NC-1 de <i>Neospora caninum</i>	126
Tabela 6 - Avaliação macroscópica e histopatológica de placentas de gestantes com diagnóstico clínico e laboratorial de toxoplasmose.....	133

CAPITULO IV

Tabela 1: Quantificação de DNA de <i>Toxoplasma gondii</i> extraído pelos métodos – Clássico (Fenol/Clorofórmio/Etanol) e <i>Salting Out</i> (NaCl 6M), concentração e perfil eletroforético no gel.....	161
Tabela 2: Parâmetros relacionados à extração de DNA pelos métodos: Clássico e <i>Salting Out</i> e padrão de bandas observadas por eletroforese em gel de agarose.....	161
Tabela 3: Tempo de execução para cada etapa de cada método de extração de DNA até a quantificação por eletroforese em gel de agarose.....	162
Tabela 4: Amplificação pela reação em cadeia da polimerase (<i>primers</i> JW58 e JW 59) de amostras de DNA extraídas por método clássico de extração e expressão de bandas amplificadas.....	163
Tabela 5 - Amplificação pela reação em cadeia da polimerase (com <i>primers</i> JW58 e 59) de amostras de DNA de taquizoítos de <i>T. gondii</i> em líquido amniótico, extraídas pelo método <i>Salting Out</i> e expressão de bandas amplificadas no gel.....	165

Tabela 6 - Amplificação das porções terminais 5´e 3´do gene SAG2 pela técnica de “ <i>restriction fragment length polymorphisms</i> ” (RFLP-PCR), com de DNA de <i>T.gondii</i> obtido em amostras de líquido amniótico extraídas pelo método clássico.....	166
Tabela 7 - Análise espectrofométrica de concentração e grau de pureza das amostras de DNA (<i>T. gondii</i>) obtidas de líquido amniótico de gestantes, e extraídas pelos métodos Clássico e <i>Salting Out</i>	167
Tabela 8 - Genotipagem pela técnica de “ <i>restriction fragment length polymorphisms</i> ” (RFLP-PCR) e restrição enzimática em 13 amostras de DNA (<i>T. gondii</i>) obtidas de líquido amniótico e de camada leucocitária (sg) de gestantes, e extraídos pelo método <i>Salting Out</i> e expressão de bandas no gel.....	168

SUMÁRIO

Ficha da Biblioteca	ii
Banca Examinadora	iii
Agradecimentos	iv
Lista de Figuras	viii
Lista de Tabelas	xi
Lista de Abreviaturas e Símbolos	xvii
Resumo Geral	1
General Abstract	2
Prefácio	3
Objetivos	6
CAPÍTULO I – <i>Toxoplasma gondii</i>, toxoplasmose e métodos de diagnóstico laboratorial: uma revisão	8
Resumo.....	9
Abstract.....	10
Aspectos históricos da toxoplasmose.....	11
Classificação.....	12
Morfologia.....	13
Hospedeiros.....	16
Ciclo de vida.....	17
Contaminação humana.....	19
Patogenia.....	20
Tratamento das pacientes gestantes.....	24
Epidemiologia.....	28
Métodos diagnósticos da toxoplasmose: parasitológicos, sorológicos e moleculares.....	31
Referências bibliográficas.....	42

CAPÍTULO II – Soroprevalência de anticorpos <i>anti-Toxoplasma gondii</i> em mulheres gestantes atendidas pelo serviço público da cidade de Curitiba.....	57
Resumo.....	58
Abstract.....	59
Introdução.....	60
Material e métodos.....	65
Resultados.....	69
Discussão.....	82
Referências bibliográficas.....	93
CAPÍTULO III – Análise parasitológica de líquido amniótico e histopatológica de placenta de gestantes com indicação clínica e sorológica de toxoplasmose aguda.....	102
Resumo.....	103
Abstract.....	104
Introdução.....	105
Material e Métodos.....	107
Resultados.....	116
Discussão.....	134
Referências Bibliográficas.....	141
CAPÍTULO IV – Caracterização molecular de cepas isoladas de <i>Toxoplasma gondii</i> de gestantes com indicação clínica e laboratorial de toxoplasmose congênita.....	144
Resumo.....	145
Abstract.....	146
Introdução.....	147
Material e Métodos.....	150
Resultados.....	160
Discussão.....	171
Referências Bibliográficas.....	180

Conclusões	185
Perspectivas	187
Anexos	188

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

β	Beta (2- β Mercaptoetanol)
Ω .	Ohms
μ L	Microlitros
μ m	Micrômetros
4-MUP	4-Metil-umbeliferil-fosfato
A	Absorbância
A/T/C/G	Adenina, Timina, Citosina, Guanina
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AP	Aglutinação de partículas
ATCC	American Type Culture Collection
Av	Avidez
Avf	Avidez fraca
AvF	Avidez forte
bp	Pares de base
BSA	Soro albumina bovina (<i>Bovine Serum Albumine</i>)
CDME	Centro de Diagnósticos Marcos Enrietti
CEE	Comunidade Econômica Européia
CEP-HC	Comissão de Ensino e Pesquisa do Hospital de Clínicas
CES-SMS	Comissão de Estudos e de Ética em pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde de Curitiba
CLIA	Ensaio quimioluminescente
DI	Informação sobre Drogas (<i>Drug Information</i>)
DMSO	Dimetil sulfoxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleosídeos trifosfatados (dATP, dTTP, dTGTP, dCTP, dUTP)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELIFA / ELFA	Imunoensaio fluorescente (<i>Enzyme Linked Immuno Fluorescent Assay</i>)
ELISA	Ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)
EU	União Européia (<i>European Union</i>)
FMVZ-USP	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP
g	Gramas
g/L	Gramas por Litro
GP	Grau de pureza
HA	Hemaglutinação
HAG	Hemaglutinação passiva
HBsAg	Antígeno de superfície do vírus da Hepatite B
HC	Hospital de Clínicas
HCV	Vírus da Hepatite C
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HNSG	Hospital Nossa Senhora das Graças
IFI	Imunofluorescência Indireta
Ig	Imunoglobulina (Ig: A, E, G, M)
ISAGA	Imunoensaio de aglutinação (<i>Immunosorbent Agglutination Assay</i>)
K	Índice Kappa
Kb	Kilo base

LMC	Laboratório Municipal de Curitiba
LPM	Laboratório de Parasitologia Molecular
MEIA	Ensaio imunoenzimático de micropartículas (<i>Microparticle Enzyme Immuno Assay</i>)
mg/mL	Miligramas por mililitros
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MNSF	Maternidade Nossa Senhora de Fátima
<i>n</i>	Número total
NAT/TMA	Transcrição Mediada por Amplificação (<i>Nucleic Acid Transcription</i>)
nm	Nanômetros
OMS	Organização Mundial da Saúde
<i>p</i>	Nível- <i>p</i> (significância estatística)
PABA	Ácido <i>p</i> -amniobenzóico
PBS	Salina tamponada com fosfatos
PC	Parto Cesáreo
PCR	Reação em cadeia pela polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
POP	Procedimento Operacional Padrão
PV	Parto Vaginal
RAPD	DNA polimórfico amplificado de forma randômica
rDNA	Ácido desoxirribonucléico ribossomal
RFLP	Polimorfismo de fragmentos de DNA por restrição enzimática (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
RFV	Valor de Fluorescência Relativa (<i>Relative Fluorescent Value</i>)
RLU	Unidades relativas de luz (<i>Relative Light Units</i>)
RNA	Ácido ribonucléico
SAG	Antígeno de superfície (<i>Surface Antigen</i>)
SDS	Sódio-duodecil-sulfato
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Solução de TRIS-HCl e EDTA
TRIS	Tris(hidroximetil) aminometano
TRIS-HCl	Tris(hidroximetil) aminometano hidrocloreico
tRNA	RNA de transferência
U.V.	Ultra violeta
U/mL	Unidades por mililitro
UA	Unidades Aleatórias
UFPR	Universidade Federal do Paraná
UI	Unidades Internacionais
UNG	Uracil- <i>N</i> -glicosilase
US	Unidade de Saúde
USP	Farmacopéia Estadunidense (<i>United States Pharmacopeia</i>)
U.S.P.	Universidade de São Paulo
λ	Marcador de Massa Molecular <i>lambda</i>
μ g/mL	Microgramas por mililitro
μ M	Micromolar
σ	Desvio Padrão

Laboratório de Parasitologia Molecular-UFPR	LPM-Centro Politécnico-UFPR / Programa de Doutorado em Biotecnologia e Bioprocessos
Departamento: Patologia Básica	Procedimento Operacional (POP) – Instrução de Trabalho
Setor: Parasitologia	Título: Coleta e Armazenamento de Líquido Amniótico
Versão: 1.0	Indexação: Parasito 000/01 Página: 4 de 6

4.2

Equipe do setor de Tocoginecologia – Hospital de Clínicas (TCG/HC) recebe a paciente gestante, cadastra dados pessoais e histórico sorológico e clínico, em seguida procede com orientações específicas e informa sobre data e horário da amniocentese .

4.3

Equipe de TCG/HC comunica o Laboratório de Parasitologia Molecular – UFPR (LPM) sobre o procedimento e informa sobre data , horário e dados específicos da paciente (histórico clínico).

4.4

Equipe do LPM-UFPR registra as informações em prontuário técnico e prossegue com o preparo de Kit – coleta/armazenamento de líquido amniótico e POP (procedimento operacional padrão) específico e envia para a equipe do setor de TCG/HC.

4.5

Equipe do TCG/HC recebe o Kit de coleta/ armazenamento de líquido amniótico e POP técnico fornecidos pelo LPM-UFPR e fornece para a equipe do LPM-UFPR formulário com dados pessoais/laboratoriais/clínicos da paciente .

4.6

Paciente retorna ao setor de TCG/HC em data e horários conforme agendado.

4.7

Equipes de TCG/Ultrassom do HC prosseguem com a amniocentese e coleta e armazenamento do líquido amniótico conforme POP técnico do LPM-UFPR.

4.8

Equipe de TCG/HC comunica a equipe do LPM-UFPR sobre o material coletado .

Laboratório de Parasitologia Molecular-UFPR	LPM-Centro Politécnico-UFPR / Programa de Doutorado em Biotecnologia e Bioprocessos
Departamento: Patologia Básica	Procedimento Operacional (POP) – Instrução de Trabalho
Setor: Parasitologia	Título: Coleta e Armazenamento de Líquido Amniótico
Versão: 1.0	Indexação: Parasito 000/01 Página: 5 de 6

4.9

Equipe do LPMN/UFPR prossegue com a busca do material checando as condições de armazenamento (volume mínimo/temperatura/condições de estocagem) e retorna para o LPM.

4.10

Equipe do LPM prepara o material para outros procedimentos técnicos específicos: Inocular material em camundongos, Cultivo Celular Extração de DNA, PCR .

4.11

Equipe do LPM/UFPR comunica equipe de TCG/HC sobre os resultados laboratoriais da paciente.

4.12

Resultados são utilizados para cálculos estatísticos e avaliação de tese.

5.0 – Notificação Especial:

A paciente deverá ser informada sobre o experimento e posterior coleta de amostras de placenta e sangue no momento do parto e receber uma folha contendo nome(s) e telefone(s) da(s) equipe(s) envolvida(s) , para contato em período prévio ao parto. O ”documento de consentimento” para obtenção das amostras deverá ser preenchido e arquivado com a assinatura da paciente / representante legal (vide – em anexos: Consentimento). A equipe de Tocoginecologia / Ecografia deverão comunicar a equipe do LPM-UFPR sobre quaisquer outros exames ao longo da gestação que tenham significado clínico relevante.

6.0 – Significado Clínico: A amniocentese é necessária para a obtenção de amostras de líquido amniótico para fins de isolamento do parasita *“Toxoplasma gondii”* através de técnicas laboratoriais tais como: inoculação em camundongos , cultivo celular , extração de DNA e PCR.

Laboratório de Parasitologia Molecular-UFPR	LPM-Centro Politécnico-UFPR / Programa de Doutorado em Biotecnologia e Bioprocessos
Departamento: Patologia Básica	Procedimento Operacional (POP) – Instrução de Trabalho
Setor: Parasitologia	Título: Coleta e Armazenamento de Líquido Amniótico
Versão: 1.0	Indexação: Parasito 000/01 Página: 6 de 6

7.0 – Modelo de resultado: (amostra de LA submetida a PCR)

Resultado Positivo indica a presença do DNA do T.gondii na amostra pesquisada

Resultado Negativo indica a ausência do DNA do Tgondii na amostra pesquisada

8.0 – Interferentes:

Amostras Excessivamente Hemolisadas

Amostras Estocadas fora do prazo de validade e condições de refrigeração inadequadas

Resultados Falso-Negativos: resíduos de reagentes durante procedimento de extração de DNA.

Resultados Falso-Positivos: contaminação por aerossóis (amplicons).

9.0 – Biossegurança:

Utilizar proteção individual: óculos acrílicos de proteção, avental de mangas longas e luvas de procedimentos após o manuseio das amostras, retirar as luvas e lavar as mãos com água e sabão. Desprezar material descartável em recipiente adequado (lixo hospitalar/descartex)

10.0 – Arquivamento: Livro de Registro /Prontuário para posterior transferência de dados em sistema informatizado (LPM-UFPR – Estatística)

11.0 – Confidencialidade: Dados pertinentes as pacientes serão mantidos em sigilo, conforme normas de conduta ética (vide CEP-HC).

12.0 – Anexos: (Incluir “Documento de Consentimento”)

Laboratório de Parasitologia Molecular-UFPR	LPM-Centro Politécnico-UFPR / Programa de Doutorado em Biotecnologia e Bioprocessos
Departamento: Patologia Básica	Procedimento Operacional (POP) – Instrução de Trabalho
Setor: Parasitologia	Título: Coleta e Armazenamento de Líquido Amniótico
Versão: 1.0	Indexação: Parasito 000/01 Página: 4 de 6

4.2

Equipe do setor de Tocoginecologia – Hospital de Clínicas (TCG/HC) recebe a paciente gestante, cadastra dados pessoais e histórico sorológico e clínico, em seguida procede com orientações específicas e informa sobre data e horário da amniocentese .

4.3

Equipe de TCG/HC comunica o Laboratório de Parasitologia Molecular – UFPR (LPM) sobre o procedimento e informa sobre data , horário e dados específicos da paciente (histórico clínico).

4.4

Equipe do LPM-UFPR registra as informações em prontuário técnico e prossegue com o preparo de Kit – coleta/armazenamento de líquido amniótico e POP (procedimento operacional padrão) específico e envia para a equipe do setor de TCG/HC.

4.5

Equipe do TCG/HC recebe o Kit de coleta/ armazenamento de líquido amniótico e POP técnico fornecidos pelo LPM-UFPR e fornece para a equipe do LPM-UFPR formulário com dados pessoais/laboratoriais/clínicos da paciente .

4.6

Paciente retorna ao setor de TCG/HC em data e horários conforme agendado.

4.7

Equipes de TCG/Ultrassom do HC prosseguem com a amniocentese e coleta e armazenamento do líquido amniótico conforme POP técnico do LPM-UFPR.

4.8

Equipe de TCG/HC comunica a equipe do LPM-UFPR sobre o material coletado .

Laboratório de Parasitologia Molecular-UFPR	LPM-Centro Politécnico-UFPR / Programa de Doutorado em Biotecnologia e Bioprocessos
Departamento: Patologia Básica	Procedimento Operacional (POP) – Instrução de Trabalho
Setor: Parasitologia	Título: Coleta e Armazenamento de Líquido Amniótico
Versão: 1.0	Indexação: Parasito 000/01 Página: 5 de 6

4.9

Equipe do LPMN/UFPR prossegue com a busca do material checando as condições de armazenamento (volume mínimo/temperatura/condições de estocagem) e retorna para o LPM.

4.10

Equipe do LPM prepara o material para outros procedimentos técnicos específicos: Inocular material em camundongos, Cultivo Celular Extração de DNA, PCR .

4.11

Equipe do LPM/UFPR comunica equipe de TCG/HC sobre os resultados laboratoriais da paciente.

4.12

Resultados são utilizados para cálculos estatísticos e avaliação de tese.

5.0 – Notificação Especial:

A paciente deverá ser informada sobre o experimento e posterior coleta de amostras de placenta e sangue no momento do parto e receber uma folha contendo nome(s) e telefone(s) da(s) equipe(s) envolvida(s) , para contato em período prévio ao parto. O ”documento de consentimento” para obtenção das amostras deverá ser preenchido e arquivado com a assinatura da paciente / representante legal (vide – em anexos: Consentimento). A equipe de Tocoginecologia / Ecografia deverão comunicar a equipe do LPM-UFPR sobre quaisquer outros exames ao longo da gestação que tenham significado clínico relevante.

6.0 – Significado Clínico: A amniocentese é necessária para a obtenção de amostras de líquido amniótico para fins de isolamento do parasita *“Toxoplasma gondii”* através de técnicas laboratoriais tais como: inoculação em camundongos , cultivo celular , extração de DNA e PCR.

Laboratório de Parasitologia Molecular-UFPR	LPM-Centro Politécnico-UFPR / Programa de Doutorado em Biotecnologia e Bioprocessos
Departamento: Patologia Básica	Procedimento Operacional (POP) – Instrução de Trabalho
Setor: Parasitologia	Título: Coleta e Armazenamento de Líquido Amniótico
Versão: 1.0	Indexação: Parasito 000/01 Página: 6 de 6

7.0 – Modelo de resultado: (amostra de LA submetida a PCR)

Resultado Positivo indica a presença do DNA do T.gondii na amostra pesquisada

Resultado Negativo indica a ausência do DNA do Tgondii na amostra pesquisada

8.0 – Interferentes:

Amostras Excessivamente Hemolisadas

Amostras Estocadas fora do prazo de validade e condições de refrigeração inadequadas

Resultados Falso-Negativos: resíduos de reagentes durante procedimento de extração de DNA.

Resultados Falso-Positivos: contaminação por aerossóis (amplicons).

9.0 – Biossegurança:

Utilizar proteção individual: óculos acrílicos de proteção, avental de mangas longas e luvas de procedimentos após o manuseio das amostras, retirar as luvas e lavar as mãos com água e sabão. Desprezar material descartável em recipiente adequado (lixo hospitalar/descartex)

10.0 – Arquivamento: Livro de Registro /Prontuário para posterior transferência de dados em sistema informatizado (LPM-UFPR – Estatística)

11.0 – Confidencialidade: Dados pertinentes as pacientes serão mantidos em sigilo, conforme normas de conduta ética (vide CEP-HC).

12.0 – Anexos: (Incluir “Documento de Consentimento”)

RESUMO GERAL

O objetivo geral deste estudo foi comparar metodologias diversas de diagnóstico da toxoplasmose em gestantes residentes em Curitiba. O trabalho foi desenvolvido em três etapas. Na **primeira** foram realizados exames imunoenzimáticos (ELISA) para definição da soroprevalência de anticorpos (IgM, IgG) anti-*Toxoplasma gondii* em gestantes do programa “Mãe Curitibana” visando conhecer o perfil sorológico destas gestantes. Na **segunda** foi feito isolamento *in vivo* e *in vitro* de *Toxoplasma gondii* e análise histopatológica a partir de amostras biológicas (líquido amniótico, sangue e placenta) obtidas das gestantes cujo perfil imunológico foi compatível com infecção recente. Na **terceira etapa** foram avaliadas as técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) como método diagnóstico e a de polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (RFLP) para determinar o(s) genótipo(s) do parasito. No estudo sorológico de 16.479 pacientes, em que foi possível avaliar as duas imunoglobulinas (IgG e IgM) 8740 apresentaram IgG+ e IgM-; 7203 apresentaram IgG- e IgM-; 24 apresentaram IgG- e IgM+ e 512 gestantes com sorologia positiva para ambas. Treze gestantes com sorologia positiva (IgM+) foram submetidas a amniocentese para isolamento do protozoário. Parasitos provenientes de líquido amniótico e de sangue foram isolados *in vivo* (inoculação intraperitoneal em camundongos) e *in vitro* (cultivo celular). A PCR, padronizada no presente trabalho foi eficiente para demonstrar a presença do DNA de *Toxoplasma gondii* nas 13 amostras de líquido amniótico examinadas. A caracterização molecular do protozoário, por RFLP, indicou que todas as cepas isoladas pertenciam ao genótipo do tipo-I, o que condiz com dados de literatura. Implementações de técnicas de diagnóstico a serem adotadas para o monitoramento da toxoplasmose gestacional são discutidas no presente trabalho.

GENERAL ABSTRACT

The overall aim of this study was to compare diverse diagnostic methodologies to toxoplasmosis in pregnant women from the city of Curitiba. This study was developed in three parts. In the **first part**, immunoenzymatic (ELISA) tests were carried out to determine anti-*Toxoplasma gondii* antibodies (IgM, IgG) seroprevalence in pregnant women participating at the “Mãe Curitibana” program. In the **second part**, isolation procedures to *Toxoplasma gondii* (*in vivo* and *in vitro*) and also histopathological analysis were done in biological samples (amniotic fluid, blood and placenta) from pregnant women undergoing recent infection immunological profile. In the **third part**, other techniques were evaluated like the polymerase chain reaction (PCR) as a diagnostic method and the restriction fragment length polymorphisms (RFLP) to determine the genotype(s) of the isolated parasite(s). During the serological study of 16,479 patients, IgG and IgM were simultaneously evaluated, and 8,740 patients presented serological results as IgG+ e IgM-; 7203 were IgG- e IgM-; 24 were IgG- e IgM+ and 512 patients were seroreactive to both immunoglobulines. Thirteen pregnant women showing IgM seroreactivity were submitted to amniocentesis to isolate the protozoarian. Parasites obtained from the amniotic fluid and blood were isolated *in vivo* (intraperitoneal inoculation in mice) and *in vitro* (cell culture). The optimized PCR protocol used in this study was efficient to demonstrate the presence of *Toxoplasma gondii* DNA in all 13 examined amniotic fluid samples. The molecular characterization by RFLP, indicated that all isolated strains belonged to genotype-I, confirming data from literature. Diagnostic technical implementations adopted to gestational toxoplasmosis monitoring will be discussed through this present research work.

PREFÁCIO

A toxoplasmose é uma antropozoonose, com distribuição cosmopolita, é causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii* (Nicole & Manceaux, 1909) parasito intracelular obrigatório pertencente à classe dos esporozoários (Dubey & Beattie, 1998).

A primo-infecção da toxoplasmose geralmente é assintomática ou oligosintomática nos indivíduos imunocompetentes. Porém, em 15 a 20% dos casos pode-se observar adenopatia, febre moderada e astenia (Ody, 1993). Esta primo-infecção suscita rapidamente uma resposta imunitária humoral e celular, permitindo controlar a infecção aguda. Formas graves da toxoplasmose podem ser observadas em três situações: infecção intra-uterina (congênita); e em primo-infecção ou reagudização em indivíduos imunocomprometidos (Contreras *et al.*, 1996).

No caso da toxoplasmose congênita (TC), a gravidade das lesões depende da data da contaminação materna (Desmonts & Couvrer, 1986; Hohlfield *et al.*, 1994; Pratlong *et al.*, 1996). Havendo contaminação no primeiro trimestre da gestação, o risco de contaminação fetal é baixo, mas as lesões são maiores, levando à morte do feto ou à formação de focos necróticos, responsáveis por seqüelas importantes (Petersen *et al.*, 2001)

No segundo trimestre de gestação a contaminação é mais freqüente, mas as lesões são menos graves, contudo pode ocorrer aborto espontâneo em 25%

dos casos ou doença severa. No terceiro trimestre geralmente ocorre doença subclínica (Remington *et al.*, 2001).

Em função da variedade fisiopatológica e clínica da infecção toxoplásmica, as modalidades de diagnóstico são diferenciadas, podendo estar relacionadas a uma reativação em indivíduos imunodeprimidos, a uma infecção neonatal ou a uma infecção primária. A infecção aguda em gestantes pode estar associada a lesões fetais que pode variar de formas subclínicas, morte intrauterina ou danos no sistema nervoso central (SNC) como calcificações cerebrais, hidrocefalia, microcefalia e coriorretinite (Petersen *et al.*, 2001; Remington *et al.*, 2001, Boyer *et al.*, 2005).

O recém-nato freqüentemente pode apresentar baixo peso, hepato e esplenomegalia, quadros de anemia, presença de plaquetopenia e danos oculares resultantes de processos inflamatórios da retina. Crianças aparentemente normais ao nascer podem subseqüentemente desenvolver injúrias associadas à toxoplasmose (Pelloux *et al.*, 2002).

O diagnóstico precoce de toxoplasmose congênita ocorre através de avaliações clínicas, sorologia de triagem seguido de amniocentese, obtenção de líquido amniótico para avaliar a presença de parasitos, isolamento *in vivo* e *in vitro* parecem ser os procedimentos associados mais seguros para acompanhar a evolução clínica da infecção e minimizar possíveis seqüelas debilitantes ao feto. Não há um consenso sobre a significância clínica da triagem sorológica (Eskild *et al.*, 1996), muito menos da indicação e uso de métodos moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) como ferramentas diagnósticas. Publicações sobre o uso de sorologia e da PCR e suas variantes como apoio

diagnóstico para casos de toxoplasmose congênita dão indícios de sua importância, quando resultados de avaliações clínicas e por outras metodologias convencionais forem “não conclusivas” (Filisetti *et al.*, 2003; Chabbert *et al.*, 2004).

O tratamento das gestantes com terapia protocolar (espiramicina, pirimetamina, sulfadiazina e ácido fólico) pode causar efeitos adversos e inclusive impossibilitar o acompanhamento terapêutico ao longo da gestação pela refratariedade de adesão ao tratamento, além de não garantir a eliminação de parasitemia ou evitar a infecção fetal por via transplacentária (Daffos *et al.*, 1988; Couvreur *et al.*, 1993; Peyron *et al.*, 1999). Contudo, casos de pacientes não tratadas foram reportados como classicamente sintomáticos apresentando seqüelas com grau de gravidade e danos variáveis até a observação do pior quadro – a Tétrade de Sabin (Derouin, 2001).

A maioria dos laboratórios clínicos no Brasil, assim como na maioria dos países desenvolvidos, não realiza todo o conjunto de exames para diagnóstico da toxoplasmose, exceto em laboratórios associados a instituições universitárias ou de pesquisa. Publicações relacionadas ao uso de técnicas de biologia molecular como a PCR, são numerosas (Templeton, 1992; Johnson *et al.*, 1993; Weiss, 1995; Jenum *et al.*, 1998; Vidigal *et al.*, 2002). Contudo, laboratórios de referência da Comunidade Econômica Européia (CEE), só recentemente adotaram protocolos de PCR padronizados, com sistemas de controle de qualidade incluindo controles positivos (cepas referência) e controles internos (de origem de plasmídios) necessários para evitar resultados falso-negativos (FN) e controles por uso de enzimas como a *Uracil-N-Glicosilase* (UNG) para evitar resultados falso-positivos (FP).

Anteriormente ao uso destes controles de qualidade, apenas um número reduzido destes laboratórios conseguiu reproduzir resultados, quando realizado um estudo multicêntrico liderado por pesquisadores da França (Pelloux *et al.*, 1996).

A avaliação da toxoplasmose gestacional é complexa, necessitando de equipes interdisciplinares, visando melhor acompanhamento clínico, diagnóstico laboratorial e terapia. A observação da evolução clínica e laboratorial da gestante desde o período pré-natal, até o pós-natal é primordial para determinar qual(is) método(s) de diagnóstico é mais seguro e deve(m) compor o algoritmo de decisão clínico-laboratorial para o monitoramento destas gestantes.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Definir metodologias diagnósticas para toxoplasmose em gestantes visando obter dados de epidemiologia sorológica e molecular para melhor definir estratégias em projetos de saúde pública visando reduzir a toxoplasmose gestacional e congênita.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a soroprevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em gestantes atendidas pelo serviço público da Cidade de Curitiba e avaliar o perfil sorológico;
- Pesquisar *Toxoplasma gondii* por métodos parasitológicos e histopatológicos em amostras biológicas provenientes de gestantes, com diagnóstico clínico e laboratorial de toxoplasmose, tratadas ou não com drogas recomendadas;
- Otimizar protocolos de extração e amplificação de DNA do *Toxoplasma gondii*;
- Detectar a seqüência do gene *B1* de *T. gondii* em amostras de líquido amniótico de gestantes empregando a técnica de PCR como meio de determinação de infecção fetal;
- Definir o genótipo das cepas isoladas de *T. gondii* por caracterização molecular.

CAPÍTULO I

***Toxoplasma gondii*, TOXOPLASMOSE E MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO LABORATORIAL: UMA REVISÃO**

RESUMO

A toxoplasmose é uma doença cosmopolita causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*. A infecção pode ser adquirida através da ingestão de carne crua ou mal cozida, leite não pasteurizado, transplante de órgãos, transfusão de sangue, pela placenta na transmissão vertical ou contato direto com fezes de gatos infectados ou ainda pela ingestão de oocistos esporulados na água ou alimentos. A doença geralmente é assintomática em indivíduos imunocompetentes, mas em pacientes imunossuprimidos ou fetos, no início da gestação, pode resultar em sintomas e seqüelas severos. O diagnóstico pode ser feito através de métodos sorológicos, exame parasitológico direto, cultivo celular e inoculação em camundongos. Mais recentemente vem sendo empregada a reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variantes para diagnóstico e caracterização molecular de genótipos específicos. Apesar da alta prevalência de indivíduos infectados em todo o mundo (20 - 90%), em alguns países da União Européia, como a França e a Áustria, a incidência média de toxoplasmose fetal foi reduzida de 40% para 7%. Neste capítulo são revisados os aspectos históricos do *Toxoplasma gondii* e da toxoplasmose, ciclo biológico do parasito, epidemiologia e métodos diagnóstico.

Palavras Chave: Toxoplasmose, *Toxoplasma gondii*, imunoensaios, PCR.

ABSTRACT

Toxoplasmosis is a cosmopolitan disease caused by the protozoarian *Toxoplasma gondii*. Infection transmission may occur by the ingestion of raw or undercooked meat, contaminated water or food, unpasteurized milk, organ or tissue transplantation, blood transfusion, contact with contaminated cat feces or across the placenta in vertical transmission. The illness is usually asymptomatic in immunocompetent individuals, but in immunocompromised patients and fetuses during early pregnancy it can lead into severe symptoms and *sequelae*. The diagnosis can be made through several non-automated and most of the cases automated immunoassays, direct parasitological methods, cell culture and mouse inoculation, and more recently by polymerase chain reaction (PCR) and its diagnostic variants and also molecular characterization to define a specific genotype. Despite of the high prevalence of infected individuals throughout the world (20 – 90%), in few European Union countries, like France and Austria, the mean incidence of fetal toxoplasmosis was reduced from 40% to 7%. In such countries serological screening for toxoplasmosis in pregnant women is mandatory. In this chapter are discussed: historical aspects of *Toxoplasma gondii* and toxoplasmosis, as well as biological cycle of the parasite, epidemiology and diagnostic methods.

Key Words: Toxoplasmosis, *Toxoplasma gondii*, immunoassays, PCR

ASPECTOS HISTÓRICOS DA TOXOPLASMOSE:

O *Toxoplasma gondii* foi descrito por Splendore em 1908 no Brasil, parasitando coelhos de laboratório e por Nicole & Manceaux, no mesmo ano, em um roedor da espécie *Ctenodactylus gondii*, no Instituto Pasteur da Tunísia (Neves, 1994; Cimerman, 1999). Inicialmente foi chamado de "*Leishmania gondii*" por sua similaridade com protozoários do gênero *Leishmania sp.* A adequação da nomenclatura ocorreu em 1909 (Nicolle & Manceaux, 1909). A primeira descrição de infecção humana por este parasito foi feita por Jankü, em 1923, com o relato de um caso de uma criança falecida em Praga (Cimerman, 1999). Torres *et al.*, em 1927, descreveram no Rio de Janeiro a presença de microrganismos que identificaram como *Toxoplasma*, em cortes histológicos de cérebro, miocárdio e músculo esquelético de um recém nascido falecido no 29º dia de vida. Wolf & Cohen, em 1937, foram os primeiros autores a descrever a infecção congênita no homem, relatando a ocorrência de toxoplasmose em recém nascido com encefalite, meningite e mielite.

Pinkerton & Weinman, em 1940, e Pinkerton & Henderson, em 1941, nos Estados Unidos, registraram a ocorrência da toxoplasmose em adultos, com o isolamento do parasito. Mas, somente após o desenvolvimento de um teste sorológico, o clássico teste do corante (*dye test*) de Sabin & Feldman, desenvolvido em 1948, é que foi possível demonstrar a alta prevalência desta doença em todo mundo, o que contribuiu imensamente para o diagnóstico laboratorial da toxoplasmose, possibilitando a realização de inquéritos

epidemiológicos (Neves, 2000). Finalmente, Frenkel *et al.*, 1970 elucidou que os oocistos representam a fase sexuada do agente. Miller *et al.*, 1972, provaram que os únicos mamíferos capazes de suportar o ciclo sexuado intestinal do *T. gondii* e excretar os oocistos são os felinos, tanto domésticos quanto selvagens. Os estudos sobre essa doença são abundantes, sendo que, atualmente, a importância desta protozoose está claramente caracterizada (Villeneuve, 2003).

Após uma densa revisão da literatura médica existente a respeito da toxoplasmose ela poderia ser dividida em quatro etapas no que se refere à evolução dos conhecimentos sobre o assunto: a primeira caracteriza-se pela descoberta do agente etiológico; a segunda pela descrição da infecção no homem; a terceira refere-se à introdução de reações sorológicas para diagnóstico e, enfim, a identificação do hospedeiro definitivo.

CLASSIFICAÇÃO

O *Toxoplasma gondii*, segundo Levine (1977,1980) é um protozoário parasito pertencente ao:

Filo *Protozoa*,

Sub-filo *Apicomplexa*,

Classe *Sporozoa*,

Família *Sarcocystidae*,

Sub-família *Toxoplasmatinae*,

Gênero *Toxoplasma* (Nicolle & Manceaux, 1909).

Espécie *T. gondii* (Nicolle & Manceaux, 1909).

Desde a classificação proposta pela Sociedade de Protozoologistas (Levine *et al.*, 1980), não houve mudanças significativas quanto a compreensão das linhagens filogenéticas de eucariotas. Porém, com o advento da biologia molecular muito se tem estudado a respeito da variabilidade genética supra e infra-grupos. Adl *et al.*, 2005, propõem nova sistemática para os organismos eucariotas. Estes autores sugerem a organização em seis *clusters* filogenéticos principais: (1) Opisthokonta (animais, fungos, coanoflagelados e Mesomycetozoa); (2) Amoebozoa (amoebae, amoebae-flagelados); (3) Excavata (Euglenozoa, flagelados heterotróficos, Diplomonados); (4) Rhizaria (foraminífera); (5) Archaeplastida (plantas e algas) e Chromalveolata (Ciliados, Dinoflagelados e Apicomplexa). O *Toxoplasma gondii* fica no grupo Chromalveolata, sub grupos Alveolata: Apicomplexa: Coccidiasina.

MORFOLOGIA

O nome genérico *Toxoplasma* (*toxon* = arco, *plasma* = forma) é decorrente de sua forma crescente (ou em arco) da fase mais comumente observada. Todavia, o parasito possui diferentes formas que recebem diferentes denominações, dependendo do estágio evolutivo ou do tecido parasitado. Aqui serão descritas as formas mais freqüentemente citadas.

Taquizoítos

O taquizoíto foi a primeira forma de *T. gondii* descrita (Figura 1 A e B). É um organismo em forma de arco com 4 a 8 µm de comprimento por 2 a 4 µm de

largura (Dubey, Lindsay e Speer, 1998). Sua estrutura possui uma extremidade mais afilada, a qual apresenta um complexo apical composto de róptrias, micronemas, conóide e anel polar que é característico do filo Apicomplexa (Figura 1A).

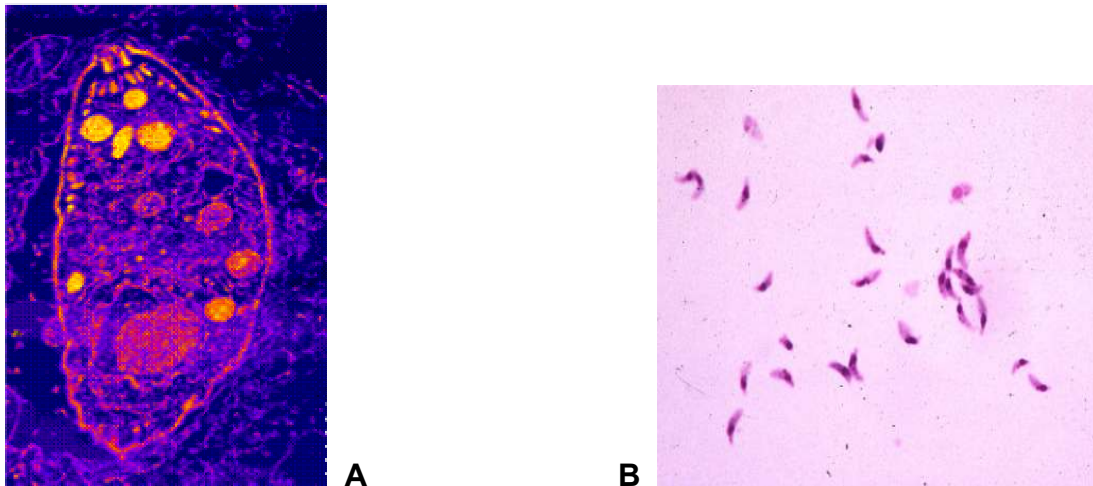


Figura 1: **A:** Taquizoíto – Fotomicrografia eletrônica de taquizoíto de *Toxoplasma gondii*. Referência: (www.columbia.edu/.../slide0061.html). **B:** Fotomicrografia de taquizoítos de *Toxoplasma gondii*, em coloração May Grünwald - Giemsa, obtidos de lavado peritoneal de camundongo inoculado com cepa RH de *T. gondii* (aumento de 1.000x).

A outra extremidade é mais arredondada, geralmente, apresentando o núcleo e organelas. Taquizoítos são formas de multiplicação rápida do parasito causando destruição das células infectadas (sistema fagocitário mononuclear) e disseminação por via hematogênica (Dubey, 1993; Dubey *et al.*, 1998; Sibley, 2003).

Bradizoítos

O bradizoito é um taquizoíto que reduz sua velocidade de multiplicação (forma de multiplicação lenta) e encontra-se no interior do cisto que representam a

forma de resistência do *T. gondii*. É uma fase evolutiva do ciclo iniciada independentemente do controle da infecção pelo sistema imune do hospedeiro. Esses cistos geralmente apresentam de 10 a 100 μm de diâmetro, cada um podendo conter até 1.000 bradizoítos (Huskinson-Mark *et al.*, 1991). Geralmente são encontrados em células nervosas, cardíacas e musculares (Figura 2).

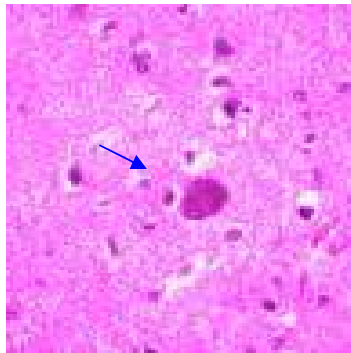


Figura – 2: Fotomicrografia de Bradizoítos de *Toxoplasma gondii* no interior de um cisto em corte histológico de cérebro de camundongo. Aumento de 400X.

Oocistos

O oocisto é arredondado e mede de 10 a 12 μm de diâmetro. É a forma infectante e altamente resistente (Figura 3), e produzido no intestino do gato após a singamia dos gametas e excretado com as fezes. No meio externo após sofrer esporulação ele contém dois esporocistos cada qual contendo quatro esporozoítos (Dubey, 1993, Dubey *et al.*, 1998; Cimerman, 1999, Sibley 2003).

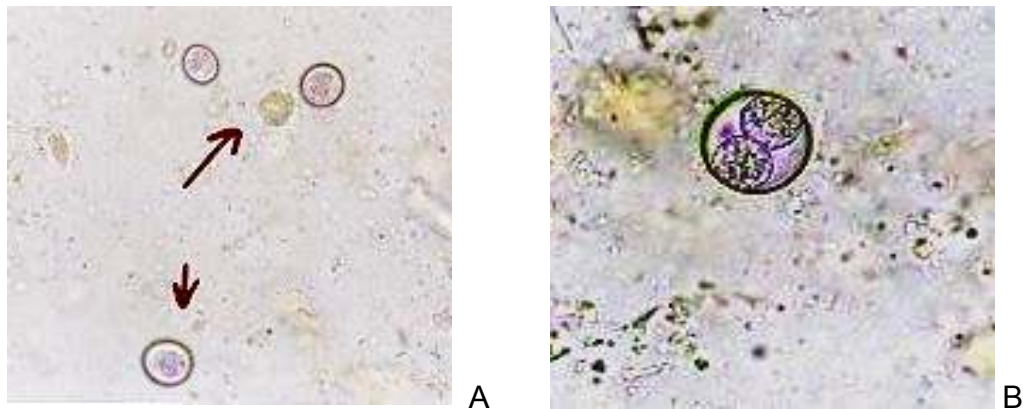


Figura – 3: Oocistos imaturos (A) e esporulados (B) de *Toxoplasma gondii*. Fotomicrografia – aumento de 100X (A) e 400X (B)

HOSPEDEIROS

O parasito pode infectar todas as espécies de animais de sangue quente, mamíferos e aves (Tenter *et al.*, 2000), mas apenas os felídeos podem excretar oocistos, quando são infectados (Frenkel *et al.*, 1970; Miller *et al.*, 1972).

Hospedeiros definitivos: este parasito é específico de felinos que são considerados hospedeiros completos e representam os únicos hospedeiros definitivos conhecidos.

O ciclo do parasito se completa no intestino delgado e termina com a excreção de oocistos. Além do gato doméstico, outras 17 espécies de felídeos selvagens são descritas como hospedeiros definitivos (Dubey & Odening, 2001).

Hospedeiros intermediários: uma grande gama de animais domésticos, animais selvagens, aves e o homem são listados como hospedeiros intermediários (Amato Neto, 1995; Howe *et al.*, 1997 a; Howe *et al.*, 1997b; Dubey *et al.*, 1998;

Sibley, 2003). Os roedores são altamente receptivos à infecção (Dubey, Speer, Shen, Kwoke Blixt, 1997) enquanto que entre os animais domésticos os eqüinos e bovinos são considerados poucos receptivos (Dubey, 2001). Nos hospedeiros intermediários o parasito está presente em líquidos somáticos, exceto em hemácias, com tropismo por células embrionárias e tecido nervoso (de Carli, 2001).

CICLO DE VIDA

O *Toxoplasma* apresenta um ciclo heteroxênico (fase assexuada ou extra – intestinal e sexuada ou enteroepitelial). A fase sexuada ocorre no gato que é o hospedeiro definitivo, portador e excretor do oocisto (Dubey, 1993; Dubey *et al.*, 1998; Cimerman, 1999; Black & Boothroyd, 2000). A fase assexuada ocorre nos hospedeiros intermediários (Figura 4).

Nos felídeos a contaminação ocorre por ingestão de oocistos contendo esporozoítos em material fecal ou por carnivorismo de cistos contendo bradizoítos. A seguir ocorre a digestão dos cistos ou oocisto e liberação dos bradizoítos ou esporozoítos. A partir de então dá-se a penetração nas células epiteliais podendo seguir dois caminhos:

- 1- Reprodução assexuada ou extra-intestinal, por endodiogenia que resulta na formação de taquizoítos. Os enterócitos se degeneram e liberam os taquizoítos que penetrarão em novas células, que asseguram a difusão e manutenção da parasitose. Portanto, o gato se comporta nesta fase como hospedeiro intermediário.

- 2- Reprodução sexuada, certos taquizoítos se transformam no interior dos enterócitos em gametócitos masculinos e femininos seguidos de fecundação e formação do oocisto imaturo que será eliminado para o exterior com as fezes. A eliminação geralmente ocorre em média de 10 a 12 dias após a ingestão de oocisto com esporozoítos e de três a sete dias após a ingestão de cistos com bradizoítos.

Os hospedeiros intermediários se contaminam quer seja a partir de oocistos esporulados, quer seja por carnivorismo (cistos com bradizoítos) (Dubey, 1993; Dubey *et al.*, 1996,1998). A fase de parasitemia dura de 8 a 10 dias. Os esporozoítos ou bradizoítos livres se transformam em taquizoítos e passam para a circulação geral, invadindo mucosa intestinal e macrófagos. Segue-se uma fase mesenquimatosa (multiplicação por endodiogenia) e posterior fase parenquimatosa (bradizoítos no interior de cistos se multiplicando lentamente) (Black & Boothroyd, 2000).

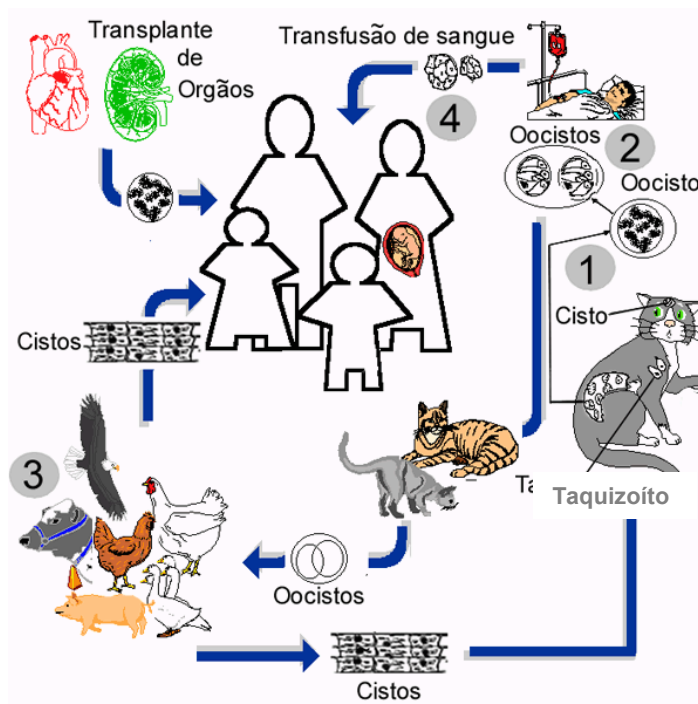


Figura 4 - Ciclo Biológico do *Toxoplasma gondii*.
 Fonte : http://www.usp.br/coseas/jornal_p6.html

CONTAMINAÇÃO HUMANA

O homem pode adquirir a infecção por diversos meios, como pela ingestão acidental de oocistos provenientes de fezes de gato, pela ingestão de carne mal cozida contendo cistos com bradizoítos, intra-uterinamente ou por transfusões sanguíneas (Siegel *et al.*, 1971; Chu, 1999; Maschke *et al.*, 1999; Martino *et al.*, 2000). As principais formas de contaminação humana são:

- Diretamente, pela ingestão de oocistos infectantes presentes nos alimentos, ou água contaminada pelas fezes do gato;
- Indiretamente, por ingestão de carne crua ou mal cozida de animais infectados (acredita-se que 25% das carnes de carneiro e de porco

vendidas em supermercados contenham cistos viáveis, Buxton, 1998; Warnekulasuriya *et al.*, 1998);

- Por transmissão congênita, durante a fase de parasitemia a mãe infectada durante a gravidez passa ao feto formas de taquizoítos (Tenter *et al.*, 2000; Lopez *et al.* 2000; Petersen *et al.*, 2001);

- Por transplante de órgãos, os órgãos a serem transplantados podem conter cistos e infectar os receptores que são previamente submetidos a quimioterapia imunossupressiva preparatória.

A maioria das pesquisas se preocupa com a prevalência da toxoplasmose em humanos e animais. Porém, é importante ressaltar a fase do parasito (oocistos) que se encontra no meio ambiente que é tão importante quanto as formas presentes nos hospedeiros intermediários ou definitivos. Pois, milhares de oocistos podem ser espalhados no ambiente por um único animal (300.000 a 100 milhões de oocistos) (Frenkel, 1990; Tenter *et al.*, 2000) e podem atingir diferentes hospedeiros intermediários ou definitivos.

PATOGENIA

Nos últimos anos passou a ser concedida maior importância médica à toxoplasmose, porque os estudos sobre esta afecção demonstram que a patologia é realmente um problema comum e não uma simples doença excepcionalmente diagnosticada (Hoffmann, 2005; Boyer *et al.*, 2005; Cantos *et al.*, 2000; Amato Neto, 1995). É uma doença considerada de aspecto endêmico, traduzido pela elevada prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma* na população mundial. A

patogenia depende da idade da infecção e do estado imunitário do indivíduo. A evolução da toxoplasmose é diferente entre indivíduos imunocompetentes, imunodeprimidos e doença adquirida durante a gestação:

Toxoplasmose em indivíduos imunocompetentes

A toxoplasmose adquirida em indivíduos imunocompetentes costuma ser assintomática, ou com marcante linfadenopatia (de Carli, 2001). Pode ainda haver comprometimento ocular e manifestações meningoencefálicas, pulmonares, hepáticas e cardíacas (Gagliuso, 1990; Chan *et al.*, 1994; Weiss *et al.*, 1997; Jones *et al.*, 2003).

Através do desenvolvimento da imunidade humoral e celular ocorre a restrição da ação patogênica do parasito, assumindo assim a fase crônica, latente e permanente.

Mesmo nos casos assintomáticos, pode ocorrer a queda da resistência do sistema defesa que torna possível a reativação dos bradizoítos e os parasitos podem invadir os tecidos e causar sintomas graves (Luft & Remington, 1992; de Carli, 2001). Em relação ao hospedeiro humano, a toxoplasmose comporta-se como um agente dotado de alta infectividade e baixa patogenicidade (Rey, 2001).

Na infecção inicial, pode-se observar em cerca de 15 a 20% dos casos: adenopatia, febre moderada e astenia (Dubey, 1968; Ody, 1993). Esta primo-infecção suscita rapidamente uma resposta imunitária humoral e celular, permitindo controlar a infecção aguda. Na fase inicial, os parasitos encontram-se na forma de taquizoítos, caracterizados por uma rápida multiplicação intracelular, o que leva à lise das células parasitadas. Após uma breve fase de disseminação

sangüínea (8 a 10 dias), o parasito se encista nos tecidos e, em particular, nos músculos estriados e no cérebro. As formas no interior do cisto multiplicam-se lentamente (bradizoítos), contudo, sem causar lise celular. Os cistos formados permanecem nos tecidos, quase sempre sem causar danos.

Estima-se que a persistência dos cistos mantenha uma imunidade durável, não esterelizante, mas protetora de uma nova infecção (Hunter & Remington *et al.*, 1994; Amato Neto, 1995; Dubey *et al.*, 1998).

Toxoplasmose em imunocomprometidos

Toxoplasmose em indivíduos imunocomprometidos pode ocorrer quando a doença se instala devido a um comprometimento do sistema imune celular e humoral de pacientes transplantados em regime de imunossupressão severa, portadores de AIDS, de doença linfoproliferativa e outras neoplasias (Leport *et al.*, 1986; Israelski & Remington, 1993; Lopez *et al.*, 2000).

Nestes indivíduos a defesa imunitária parece ser incapaz de controlar a multiplicação dos taquizoítos, e se observa então uma multiplicação rápida dos parasitos levando a necroses tissulares focalizadas e uma eventual disseminação por via sangüínea (Luft & Remington, 1992). As lesões observadas são principalmente cerebrais, caracterizadas por sinais neurológicos, podendo haver generalização em outros órgãos (Leport *et al.*, 1986).

Em pacientes HIV positivos a toxoplasmose tem sido uma causa de óbito com índices bastante elevados, e estima-se que a toxoplasmose afete cerca de 1 – 3% dos pacientes com AIDS (Leport & Remington, 1992; Derouin *et al.*, 1991, 1992; Gagliuso *et al.*, 1990; Pivetti-Pezzi *et al.*, 1994; Kasper & Buzoni-Gatel,

1998; Chu, 1999). A toxoplasmose é uma das principais causas de morte associada a AIDS, contando com cerca de 12,2% dos óbitos (Shapiro & Englund, 1995; Lewden *et al.*, 2005). Outros pacientes com maior susceptibilidade a toxoplasmose são: transplantados submetidos a regimes de imunossupressão, pacientes oncológicos, politransfundidos (Dagher & Lucas, 1996; Thomaz-Soccol *et al.*, 2003; Coelho *et al.*, 2003; Khurana *et al.*, 2005).

Toxoplasmose em gestantes

A toxoplasmose congênita é conhecida por desenvolver uma síndrome denominada tétrede de Sabin com modificação do volume do crânio; calcificações cerebrais; coriorretinite e retardamento mental.

Todavia, a infecção recente, aguda e ativa durante a gestação não resulta necessariamente em infecção fetal, pois o risco de transmissão pode variar conforme a idade gestacional em que ocorreu a infecção (Pelloux *et al.*, 2002). No período periconcepcional o risco é de cerca de 0 a 2%, e no primeiro trimestre é de 15 a 20%, no segundo trimestre é de 30 a 50% e no terceiro trimestre é de 60 a 80%.

Em casos de toxoplasmose congênita, a gravidade das lesões decorrentes, pode depender da data da contaminação materna (Sabin, 1941; Desmonts & Couvreur, 1986; Hohlfeld *et al.*, 1994; Pratlong *et al.*, 1996; Pelloux *et al.*, 1996, 2002). Quando a infecção materna se dá no segundo trimestre as lesões são menos graves, podendo ocorrer aborto espontâneo em 25% dos casos ou doença severa. No terceiro trimestre geralmente ocorre doença subclínica. Enfim, qualquer que seja a data da contaminação fetal, os cistos são formados nos

tecidos e o risco de reagudização posterior é importante, com a possibilidade de haver, nestes casos, corioretinite (Engstrom *et al.*, 1991).

A toxoplasmose congênita pode se manifestar de quatro formas: **1.**doença manifesta no período neonatal, **2.**doença severa ou discreta nos primeiros meses de vida, **3.**seqüela ou reativação de infecção prévia, não diagnosticada **4.** infecção sub-clínica. A maior parte dos casos de toxoplasmose congênita não apresenta sinais ou sintomas ao nascer, indicados por testes de pediatria como o APGAR (1953), em especial quando relacionado a recém-natos de mães tratadas com protocolo padrão (Lopez *et al.*, 2000; Remington *et al.*, 2001).

Em humanos, o problema social decorrente deste tipo de infecção é bastante sério, e em animais domésticos representa graves perdas econômicas (Roberts *et al.*, 1994; Buxton, 1998; Yasodhara *et al.*, 2004).

TRATAMENTO DAS PACIENTES GESTANTES

Pacientes gestantes com indicação diagnóstica e clínica para toxoplasmose devem ser preferencialmente indicadas para protocolo de tratamento (Couvreux *et al.*, 1993; Pelloux *et al.*, 1996, 2002). Embora a eficácia do protocolo seja controversa, o tratamento precoce pode prevenir a progressão da infecção e o desenvolvimento de seqüelas no feto (Peyron *et al.*, 1999). As drogas mais utilizadas na maioria dos protocolos de monitoramento da toxoplasmose congênita são: espiramicina, pirimetamina e as sulfonamidas. A espiramicina (Tabela 1) é utilizada na maioria dos protocolos dos países europeus, em especial a França, e

Brasil; contudo nos Estados Unidos da América esta droga é de uso restrito a alguns Estados.

As drogas do protocolo não eliminam cistos nem todos os parasitos. Estas drogas agem bloqueando a via metabólica envolvendo o ácido *p*-amniobenzóico (PABA) e o ciclo dos ácidos fólico e folínico. Tanto a pirimetamina (Daraprim®) como a sulfonamida são bem toleradas quando administradas em conjunto, todavia, efeitos adversos como trombocitopenia, leucopenia podem ocorrer.

Estes efeitos podem ser circunventados pela administração de ácido folínico, uma vez que humanos podem utilizar ácido folínico pré-sintetizado, enquanto que o *T. gondii* não o utiliza.

Portanto, as sulfonamidas mais utilizadas são: sulfadiazida, sulfametazina e sulfamerazina, e agem eficazmente contra a toxoplasmose pela capacidade de difusão a membrana da célula hospedeira. As sulfonamidas, portanto devem ser administradas preferencialmente em fase aguda. Como os compostos das sulfonamidas são rapidamente excretados (poucas horas) após a administração, elas devem ser administradas em doses fracionadas e diárias.

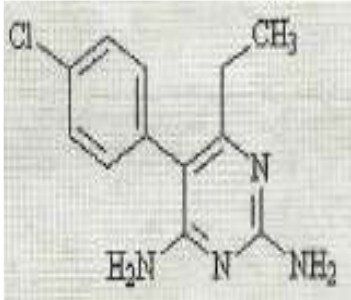
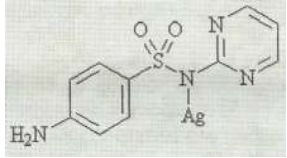
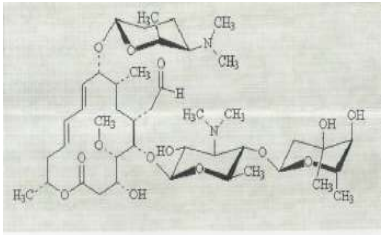
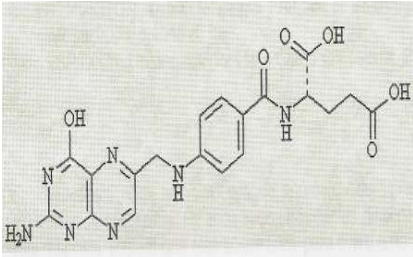
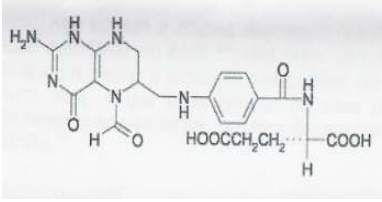
Atualmente não existem vacinas contra toxoplasmose, contudo alguns centros de pesquisas em biotecnologia estão avançando em modelos animais, como na Nova Zelândia (Dubey *et al.*, 1998), onde o número de abortos em ovelhas tem diminuído significativamente.

O Instituto Pasteur de Bruxelas na Bélgica está em fase avançada de modelo de vacina de DNA em modelo murino, com resultados promissores (Scorza *et al.*, 2003, Bivas-Benita *et al.*, 2003). Modelos de vacinas de DNA para

humanos encontram-se, a despeito dos avanços, ainda a nível experimental (Gottstein, 1995; Bout *et al.*, 2002).

Apesar da associação de drogas e do rigor do protocolo mundialmente utilizado, não existem evidências da erradicação do parasito em circulação, nem do impedimento de transmissão transplacentária. A refratariedade ao tratamento pode estar relacionada a genótipos de cepas mais patogênicas (Ajzenberg *et al.*, 2002; Grigg & Suzuki, 2003).

Tabela – 1: Mecanismo de Ação das Drogas do Protocolo contra Toxoplasmose Congênita.

Droga	Nome Comercial	Mecanismo de Ação	Fórmula estrutural
Pirimetamina	Daraprim®	Inibe a enzima diidrofolato redutase, bloqueando a conversão do ácido diidrofolico em ácido tetraidrofolico, resultando na redução da produção de ácidos nucleicos e proteínas protozoárias. Na TC é usada em doses altas, podendo causar toxicidade ao feto. Recomenda-se o uso associado ao ácido fólico.	
Sulfadiazina	Neosulfadiazina, Triglobe® (Associação), Triglobe F® (Associação)	Estruturalmente semelhante ao PABA, inibe a enzima dihidropterato sintetase responsável pela conversão do PABA em ácido dihidropterico, precursor imediato do ácido fólico.	
Espiramicina	Periodontil® (Associação), Rovamicina®	Atravessa a membranas e une-se de forma irreversível a subunidade ribossômica 50 S, inibindo a translocação (Coppens <i>et al.</i> , 2001). Suspeita-se que atua estimulando a dissociação do peptidil-tRNA dos ribossomos durante a translocação.	
Ácido Fólico	Acfol, Endofolin® (Associação), Folacin®, Iberin fólico® (Associação), Iloban® (Associação)	Após a absorção, o ácido fólico é reduzido para ácido tetraidrofolico que age como acceptor de carbonos, formando coenzimas de papel específico no metabolismo celular. As coenzimas originadas podem atuar: conversões de homocisteína e metionina e de serina em glicina, no metabolismo da histidina e na síntese de purinas	
Ácido Fólico	Leucovorin®	Forma reduzida do ácido fólico convertida, rapidamente, em derivados do mesmo. Não sofre a ação dos medicamentos antagonistas do ácido fólico permitindo a síntese de purina e timina, DNA, RNA e proteínas. Utilizado em associação com drogas que possam induzir aplasia de medula.	

Referência: www.drugdex.com.br, www.guiaderemedios.com.br, Consejo General de Colégios Oficiales de Farmacêuticos de España, Goodman & Gilman, 2003, Remington, 2000, USP DI Drug Information, 2003.

EPIDEMIOLOGIA

O *Toxoplasma gondii* já foi assinalado na maior parte das regiões do globo. A grande mobilidade dos hospedeiros intermediários infectados, as aves em particular, permitiu que a parasitose se distribuísse por todas regiões não importando o clima ou barreiras geográficas (Frenkel, 1990). Porém, as maiores soroprevalências são encontradas nas áreas tropicais úmidas (Camargo, 1996; Cantos *et al.*, 2000).

Estima-se que entre 30 e 50% da população humana do planeta apresenta anticorpos para o agente etiológico da toxoplasmose, o que indica uma exposição ao organismo patogênico, mas não necessariamente o desenvolvimento da doença (Dubey & Beatie, 1988).

A faixa de prevalência de toxoplasmose mundial é muito variável encontrando-se dados entre 20 a 90% (Server *et al.*, 1988; Jaqueti *et al.*, 1991; Lappalainen *et al.*, 1992, 1993; Lelong *et al.*, 1995; Rodier *et al.*, 1995; Pelloux *et al.* 2002). Esta variação pode estar relacionada a diferentes fatores como: formas de transmissão, hábitos alimentares, infraestrutura sanitária, clima e idade (Cantos *et al.* 2000).

A prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* na população de diferentes partes do mundo e no Brasil estão respectivamente descritas nas Tabelas 2 A e B.

Tabela 2 A – Prevalência de toxoplasmose em gestantes em diversos países por pesquisa de IgG.

País	IgG Prevalência (%)
AUSTRÁLIA e NOVA ZELÂNDIA	4
ÁUSTRIA	37
BÉLGICA	53
CANADÁ (MONTREAL)	40,8
EL SALVADOR	75
ESPANHA	38,8
ETIÓPIA	48
EUA	10 - 50
FINLÂNDIA (MÉDIA DA ESCANDINÁVIA)	20
FRANÇA	50 - 60
ITÁLIA	40
PANAMÁ	63
POLÔNIA	36
SUÍÇA	46,1

Mac Abe & Remington, 1988; Aspöck & Pollack, 1992; Roos *et al.*, 1993; Lappalainen *et al.*, 1992, 1993; Pelloux *et. al.*, 2002 ;Villeneuve, 2003.

Tabela 2 B – Prevalência no Brasil de toxoplasmose em gestantes em diferentes regiões com dados soroepidemiológicos por pesquisa de IgG.

Cidade/Estado	Ano	Pesquisador	n	Prevalência IgG (%)
BELÉM DO PARÁ/ PA	1997	Carmo <i>et al.</i>	192	71
	2001	Bichara <i>et al.</i>	656	81
BELO HORIZONTE/ MG	1970	Araújo <i>et al.</i>	729	50
BRAGANÇA PAULISTA/ SP	1998	Brisighelli <i>et al.</i>	398	55
CURITIBA / PR	2003	Thomaz-Soccol <i>et al.</i>	152	45,4
FLORIANÓPOLIS / SC	2000	Cantos <i>et al.</i>	2.994	41,9
PORTO ALEGRE / RS	1994	Neves <i>et al.</i>	812	54
	2003	Varella <i>et al.</i>	1261	59,8
RECIFE / PE	1999	Nóbrega <i>et al.</i>	1.309	69,4
SÃO PAULO / SP	1990	Vaz <i>et al.</i>	481	67
	1995	Pedreira <i>et al.</i>	2.333	58
	1997	<i>al.</i> Inagaki <i>et al.</i>	175	65

n (número total de gestantes triadas sorologicamente).

Dados de regiões do Brasil que realizaram inquérito soroepidemiológico revelam um alta prevalência da toxoplasmose com variações de 41,9 (SC) a 81% (PA). No Brasil, estudos realizados por Camargo *et al.*, 1996 indicam que em adultos a taxa de prevalência oscila entre 50 a 80%. Para avaliação de doença aguda, a presença de positividade para anticorpos (Acs) IgM e títulos crescentes de IgG podem indicar doença ativa, e a análise deve ser realizada de maneira criteriosa para a interpretação soroepidemiológica (Bertschinger, 1980). Segundo Camargo (1996) qualquer título de Acs IgM traduz infecção recente

independentemente da presença ou não de títulos de Acs IgG. Contudo a presença de Acs IgM pode não significar necessariamente uma infecção ativa, mas sim uma marca do contágio recente, e também pela característica desta classe de Acs permanecer em circulação por cerca de 18 meses (Bader *et al.*, 1997)

A incidência mundial de toxoplasmose aguda na gravidez varia de 0,06 a 1,4% (Remington, 1990), onde aproximadamente 15% das infecções fetais resultam em morte intra-uterina, e em cerca de 85% dos que nascem, 80% podem desenvolver lesões diversas ou desordens do sistema nervoso central (SNC) tardias na vida (Cantos *et al.*, 2000). Alguns países que realizaram o estudo de fase aguda pela detecção de Acs IgM revelam semelhanças: Espanha IgG (38,8%) com IgM (1,2%) (Jaqueti *et al.*, 1991); Suíça IgG (46,1%) e IgM (1,7%) (Jacquier *et al.*, 1995).

MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DA TOXOPLASMOSE: PARASITOLÓGICOS, SOROLÓGICOS E MOLECULARES

Em função da variedade fisiopatológica e clínica da infecção, as modalidades de diagnóstico devem ser diferenciadas em se tratando de uma reativação em indivíduos imunodeprimidos, de infecção congênita e neonatal ou infecção primária e infecção em indivíduos imunocompetentes (Spalding *et al.*, 2005).

O diagnóstico pode ser feito pela demonstração do parasito. No entanto, a pesquisa pelo exame direto é difícil e deve, freqüentemente, ser complementada

por métodos indiretos tais como inoculação em animais de laboratório, cultura celular ou técnicas sorológicas (Derouin *et al.*, 1988; Daffos *et al.*, 1988; Abboud *et al.*, 1997; Camargo *et al.*, 1995; Dubey *et al.*, 1998; Uchoa *et al.*, 1999; Robert-Gagneux *et al.*, 1999).

Os métodos moleculares não são unanimidade entre os laboratórios clínicos, ficando mais restritos a universidades e centros de pesquisa, em função da complexidade dos protocolos, infraestrutura específica, recursos humanos especializados e do alto custo dos reagentes e equipamentos. A complexidade genômica do *Toxoplasma gondii* reflete a grande variedade de *primers* (iniciadores) e protocolos descritos em literatura e em uso. Contudo, a falta de padronização e centros de referência para fins de controle de qualidade diagnóstica tornam a aplicação da técnica como alvo de controvérsias (Pelloux *et al.*, 1996).

- **Métodos Parasitológicos:** são importantes para visualização do parasito em amostras de tecidos ou de biópsia e até mesmo em suspensão de cultivo celular, sendo que o parasito pode ser observado nas formas de taquizoítos, cistos tissulares contendo bradizoítos ou em formas enteroepiteliais. Este método deve ser empregado em especial quando os diagnósticos sorológicos não apontam dados conclusivos (Frenkel, 1969 a,b; Burg *et al.*, 1989; Derouin & Garin, 1992; Nguyen *et al.*, 1996; Dubey *et al.*, 1998; Rey, 2001). O isolamento do parasito é realizado através de inoculação intraperitoneal do material suspeito (líquido amniótico, sangue, placenta, feto abortado, cultivo celular) em animais de laboratório, como camundongos ou em cultivo celular *in vitro* (Amato Neto, 1995; Spalding *et al.*, 2002, 2005).

- **Métodos Sorológicos:** a sorologia representa a base do diagnóstico e do controle da toxoplasmose (Eskild *et al.*, 1996). A presença de anticorpos específicos permite diagnosticar uma infecção pelo *Toxoplasma gondii* (Morris *et al.*, 2004). A sorologia pode ser útil, mas sua interpretação pode ser bastante difícil.

A alta prevalência do *Toxoplasma* em algumas regiões pode favorecer resultados falso-positivos. Além disso, pacientes imunocomprometidos podem não produzir níveis significantes de anticorpos (The Analyst™ Digitalnaturopath, 2005).

Em pacientes imunocompetentes, os exames sorológicos para pesquisa de anticorpos das classes IgG e IgM são os mais indicados, sendo sensíveis e específicos, disponíveis comercialmente e realizados na maioria dos laboratórios privados e da rede oficial (Contreras *et al.*, 2000).

Em triagem sorológica para toxoplasmose anticorpos da classe IgM podem ser detectados entre 5 e 14 dias, atingindo níveis séricos elevados em um mês, podendo permanecer positivos por cerca de 18 meses (Bader *et al.*, 1997).

Anticorpos IgA específicos positivam-se após cerca de 14 dias, desaparecendo entre 5 e 6 meses. Em pacientes gestantes, sob suspeita de infecção, anticorpos IgG específicos podem atingir uma titulação máxima cerca de 2 meses a partir da infecção, declinando cerca de 5 a 6 meses após, contudo mantendo-se detectáveis pelo resto da vida. A avidéz com que os anticorpos IgG ligam-se a seus respectivos antígenos (Ags) pode ser avaliada pela maior ou menor quebra dessa ligação. Anticorpos (Acs) produzidos até cerca de quatro meses têm avidéz fraca (Avf) ou intermediária, sugerindo infecção recente, enquanto que Acs antigos têm avidéz forte (AvF), sugerindo doença passada. Acs

IgG maternos passam a barreira transplacentária, enquanto que os Acs IgM não. No recém-nato, a presença de IgG específicas podem representar Acs maternos transferidos passivamente. Na criança não infectada congenitalmente IgG apresentam títulos em declínio até desaparecerem, por doze meses. Os Acs IgM estarão negativos. Ao contrário da criança infectada, os níveis de Acs IgG permanecem elevados ou ascendentes, enquanto que os Acs IgM podem estar ou não presentes (Pinon *et al.*, 1985, 1996; Fricker-Hidalgo & Pelloux, 1996; Pelloux *et al.*, 2002).

Os testes sorológicos utilizam, em sua maioria, extratos de antígenos de parasitos, ou o parasito inteiro. Os testes de Sabin-Feldman, imunofluorescência indireta (IFI) e o da aglutinação utilizam o parasito inteiro para demonstrar anticorpos contra antígenos presentes nos parasitos (Dubey *et al.*, 1998). Os testes que utilizam extratos antigênicos são atualmente os mais utilizados em rotinas de larga escala, em função da padronização e reprodutibilidade de resultados com ganho em termos de controle de qualidade. São eles os: imunoensaios enzimáticos e suas variações comerciais, e o teste da hemaglutinação passiva (HAG) (Jacobs & Lund, 1957; Duffy *et al.*, 1989; Camargo *et al.*, 1976, 1989, 1995).

O teste de Sabin-Feldman (Sabin, 1948) obedece a reações imunológicas clássicas, onde os parasitos são postos em reação com soro que contém anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* mais proteínas do complemento, sofrendo lise e incorporando corantes, como o azul de metileno, empregados para evidenciar a reação. É um teste altamente sensível e específico, contudo em função de sua complexidade para realização, associado a risco de exposição ao parasito, este

teste tornou-se inviável em rotina laboratorial, exceto em laboratórios de pesquisa e referência (Remington *et al.*, 2001).

Jacobs & Lunde descreveram em 1957, um teste onde utilizavam hemácias de carneiro revestidas de antígenos parasitários, denominado de hemaglutinação passiva. Este teste apresentava baixa sensibilidade, e não possibilitava a detecção de anticorpos IgG e IgM; podendo levar a resultados falso-positivos por ação de anticorpos heterófilos. Posteriormente, a técnica foi otimizada pelo emprego de hemácia de aves sensibilizadas com antígenos integrais do parasito e aglutináveis por anticorpos IgG e IgM, ampliando a sensibilidade do método. A inclusão deste método em rotina de triagem sorológica deu-se por sua facilidade de execução, sensibilidade e baixo custo (Camargo *et al.*, 1989).

O teste de Imunofluorescência indireta (IFI) utiliza parasitos íntegros de cepas referência (RH ou NH14) e fixados em lâmina. É um método de baixo custo, de fácil execução e que apresenta boa especificidade e sensibilidade, sendo muito utilizado em laboratórios de rotina (Camargo *et al.*, 1972, 1995, 1996 ; Desmonts & Couvrer, 1986; Dubey & Beatie 1988; Vidotto, 1992; Pratlong *et al.*, 1994; Thomaz-Soccol *et al.*, 2003).

Este método possibilita a detecção de anticorpos das classes IgM e IgG e é usado em triagem sorológica e na correlação com fase clínica. No entanto, resultados falso-positivos podem ocorrer pela presença do fator reumatóide no soro, além de resultados falso-negativos, pela competição com anticorpos IgG pelos antígenos parasitários, descrito por Camargo *et al.*, em 1972. Além destes inconvenientes, há necessidade de utilização de microscópios específicos de alto

custo, e também de técnicos especializados, além da subjetividade de interpretação.

Por isso, se faz em necessário a utilização de duas ou mais técnicas. Nos últimos 30 anos, novos testes de triagem sorológica, utilizando extratos antigênicos, foram sendo introduzidos no mercado. Atualmente, métodos de ensaio imunoenzimáticos como ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) são os mais utilizados nos serviços de análises clínicas e de hemoterapia em função da relação do custo benefício garantida pela automação e padronização. Outros tipos de testes também são utilizados em diagnóstico e na triagem sorológica, como, por exemplo, a hemaglutinação (HA), aglutinação de partículas (AP) e quimioluminescência (Chamone *et al.*, 2004).

A versão comumente utilizada de imunoensaio é do tipo “sanduíche”. Neste método utiliza-se uma quantidade fixa de antígeno ou anticorpo em uma fase sólida na qual irá se ligar o anticorpo ou antígeno a ser pesquisado. A utilização de um anticorpo marcado servirá de ponte para reação de evidenciação da quantidade da substância a ser dosada.

Os imunoensaios mais realizados, de maneira geral são: ELISA, MEIA (*Microparticle Enzyme Immuno Assay* - ABBOTT Laboratories – Diagnostics Division), ELIFA (*Enzyme Linked Immuno Fluorescent Assay* – BioMérieux) e ISAGA (*Immunosorbent Agglutination Assay* - BioMérieux), sendo a maioria automatizados, (Desmonts *et al.*, 1981; 1986; Duffy *et al.*, 1989; Weiss *et al.*, 1990; Derouin *et al.*, 1991; Choi *et al.*, 1992; Chan *et al.*, 1994) (Tabela 3).

Tabela 3 - Testes Sorológicos para Diagnóstico da Toxoplasmose Congênita.

Teste	Características
Imunoglobulina G	
Sabin-Feldman (<i>Dye Test</i>)	Emprega o corante azul de metileno para o parasito <i>Toxoplasma gondii</i> . O taquizoíto lisa na presença de anticorpos específicos IgG e IgM. <i>Gold Standard</i> para o diagnóstico de toxoplasmose. Sensível e específico. Requer o organismo vivo e só pode ser realizado por laboratórios de referência. Detectável após 2 semanas de infecção. Baixos títulos persistindo ao longo da vida.
IFI (Imunofluorescência Indireta)	Títulos mensuráveis comparáveis ao Sabin-Feldman. Comercialmente disponível, contudo os resultados podem ser subjetivos e levar a resultados falso-positivos. Mais utilizado do que o <i>Dye Test</i> . Atualmente em uso decrescente.
ELISA / EIE	O EIE – IgG duplo sanduíche é um dos testes mais sensíveis. Os anticorpos IgG detectados por este teste são de fase tardia, e atravessam a barreira transplacentária. Resultados IgG positivos em associação com resultados positivos para IgM não determinam fase aguda ou infecção recente, discriminação de fase clínica deve ser feita pelo teste de avidéz (IgG Av).

Tabela 3 - Testes Sorológicos para Diagnóstico da Toxoplasmose Congênita (continuação)

Teste	Características
Imunoglobulina M EIE/ELISA (enzima imunoensaio)	O EIE – IgM duplo sanduíche é o teste mais sensível. Os anticorpos IgM detectados por este teste são de fase precoce, por não atravessarem a barreira transplacentária. Anticorpos IgM são úteis na determinação de infecção congênita. Resultados positivos devem ser repetidos, ou confirmados por laboratórios da rede oficial.
IFI (Imunofluorescência Indireta)	Menos sensível que EIE/ELISA. Fator reumatóide e anticorpos antinucleares podem levar a resultados falso-positivos
ISAGA (Immunosorbent agglutination assay)	Emprega organismos fixados por formalina ou partículas de látex revestidas de antígenos para detectar IgM. Pode ser complementar ao EIE/ELISA. Resultados positivos devem ser repetidos, ou confirmados por laboratórios da rede oficial.
Imunoglobulina A EIE/ELISA	Útil na determinação de infecção congênita, uma vez que IgA não cruza barreira transplacentária. Testes EIE/ELISA IgA são pouco mais sensíveis do que EIE/ELISA IgM, contudo o uso tem sido descontinuado em função do alto número de resultados indeterminados. Útil na avaliação de infecção do feto e do recém nato.
ISAGA	Método complementar para detecção de IgA.
Imunoglobulina E	A duração da detecção de anticorpos IgE é mais curta do que IgA e IgM. No entanto, a detecção de anticorpos IgE pode revelar uma fase de infecção recente. Útil na determinação de infecção congênita, a partir de uma única amostra de soro quando em combinação com determinações para IgA e IgM. Pouco utilizado em laboratórios clínicos.
ISAGA	Método complementar para detecção de IgE.

Referência: Quiñonez *et al.*, 2004 *Pediatric Medicine Board Review Manual*, AHME vol. 2 part 2 p. 5

- **Métodos Moleculares:** Recentemente, a técnica de Reação em Cadeia da polimerase (PCR) foi adaptada para o diagnóstico da toxoplasmose congênita, utilizando genes únicos (P30) ou repetidos (gene *B1*, seqüência TGR1E), além de genes ribossomais -18S r DNA (Chabbert *et al.*, 2004).

Contudo, os oligonucleotídeos utilizados em reações de PCR que mais eficazmente detectaram o DNA do *T.gondii*, após análises comparativas de PCR *In-House* (caseiro), foram os *primers* para o gene *B1* (Hohlfeld *et al.*, 1994; Pelloux *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 2003). Filisetti *et al.*, 2003, testaram os mesmos *primers*, incluindo o AF146527 (AF – amniotic fluid) para uma das regiões de repetição do gene *B1*. Os autores constataram que não havia uma diferença significativa em termos de sensibilidade e especificidade que definisse qual *primer* seria o ideal, dentre os testados, para o diagnóstico da TC em amostras de líquido amniótico, ou mesmo em outras amostras biológicas humanas (Ho-Yen *et al.*, 1992; Fricker-Hidalgo *et al.*, 1998; Remington *et al.*, 2004).

Para o monitoramento de parasitemia e carga de infecção e da reativação de infecção em situações de imunossupressão envolvendo transplantes de medula óssea alogênicos, foi desenvolvido o PCR-*Real Time* (PCR em tempo real) utilizando *primers* para genes *SAG-1* e *SAG-2* (*Surface Antigens 1 e 2*). Porém, este método é mais utilizado a título na pesquisa clínica e em protocolos clínicos restritos (Costa *et al.*, 2000).

Além de laboratórios de análises clínicas, serviços de hemoterapia têm utilizado técnicas moleculares para minimizar riscos transfusionais, como a transcrição mediada por amplificação (NAT/TMA), contudo *primers* para uma

seqüência conservada do *T. gondii* ainda estão em fase de definição, assim como a padronização da técnica (Stramer *et al.*, 2000).

Estudos multicêntricos envolvendo 15 laboratórios europeus do Programa BIOMED-2 da Comunidade Européia (Pelloux *et al.*, 1996, 1998), demonstraram que há uma grande discrepância quanto à homogeneidade e o desempenho de resultados entre diferentes protocolos de PCR. Este estudo colaborativo ressaltou a necessidade de programas rigorosos de controle externo e de garantia da qualidade, a fim de minimizar resultados Falso-Negativos (FN) e Falso-Positivos (FP), o que é significativamente crítico em relação à decisão clínica de adotar terapia específica com drogas tóxicas e evitar seqüelas ao feto durante a gestação (Pelloux *et al.*, 1996,1998, 2002; Angelici *et al.*, 1999; Raggi *et al.*, 2003). Estudos combinados de duas ou mais técnicas são, na maioria das vezes, necessários para confirmar o diagnóstico (James *et al.*, 1996; Ashburn *et al.*, 2000; Visvesvara *et al.*, 2002). Assim, estas técnicas utilizadas complementarmente aumentam a sensibilidade dos resultados, podendo variar de 89,5% a próximo de 100% (Savva *et al.*, 1990; Grover *et al.*, 1990; Pratlong, 1996; Pelloux *et al.*, 1996,1998, 2002; Costa *et al.*, 2000; Raggi *et al.*, 2003). Com o avanço das técnicas de biologia molecular, diversos métodos de avaliação de polimorfismos genéticos no DNA tem sido utilizados para melhor caracterizar cepas de *T. gondii*, isoladas em amostras clínicas de pacientes sorologicamente positivos para o *T. gondii* (Howe *et al.*, 1995,1997b; Literák & Rychlík, 1999; Fuentes *et al.*, 2001). A vantagem destas técnicas é que permitem analisar diretamente a variabilidade da seqüência nucleotídica do DNA, incluindo as regiões altamente conservadas como outras variáveis.

A definição do genótipo específico das cepas isoladas pela caracterização molecular pode auxiliar na compreensão da evolução da doença, assim como no monitoramento e definição de protocolo quimioterápico mais adequado (Fuentes *et al.*, 2001; Ajzenberg *et al.* 2002). Contudo, a utilização de métodos de caracterização molecular de cepas de *Toxoplasma gondii* está restrito a estudos de epidemiologia molecular, e a relação dos genótipos observados (tipo: I,II,III) com os parasitos isolados e descritos em literatura, variam muito em diferentes regiões e países, assim como a sua relação com virulência das cepas e refratariedade a quimioterapia (Howe *et al.*, 1995,1997b; Ajzenberg *et al.*,2002; Yera *et al.*, 2003). Estudos prospectivos deveriam ser desenvolvidos, a curto prazo, para melhor compreensão sobre a patogenicidade das cepas isoladas e os genótipos encontrados nos países e regiões (Dardé, 2004; Soares, 2004).

Por esta razão, as técnicas que foram selecionadas para o uso neste estudo foram: a técnica de ELISA (por sua facilidade de execução e possibilidade de automação para análise de um grande número de amostras em procedimentos de triagem sorológica); método parasitológico direto e histopatologia para avaliação de presença do parasito, de cistos cerebrais e lesões teciduais em modelos de infecção *in vivo* e em placenta de mulheres gestantes; isolamento *in vitro* (cultivo celular) do parasito a partir de amostras de líquido amniótico; análises moleculares como a PCR e a genotipagem para a caracterização do DNA das cepas isoladas de *T. gondii*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Abboud, P; Villena, I.; Chemla, C.; Leroux, B.; Talmud, M.; Bednarczyk, Pinon J.M.; Quereux C. Screening for Congenital Toxoplasmosis: Pregnancy Outcome After Prenatal Diagnosis in 211 Cases. **J Gynecol Obstet Biol Reprod.** (Paris), v. 26, n. 1, p. 40 - 46, 1997.

Adl, S.M.; Simpson, A.G.B.; Farmer, M.A.; Andersen, R.A.; Anderson, O.R.; Barta, J.R.; Bowser, S.S.; Brugerolle, G.; Fensome, R.A.; Fredericq, S.; James, T.Y.; Karpov, S.; Krugens, P.; Krug, J.; Lane, C.E.; Lewis, L.A.; Lodge, J.; Lynn, D.H.; Mann, D.G.; McCourt, R.M.; Mendoza, L.; Moestrup, O.; Mozley-Standridge, S.E.; Nerad, T.A.; Shearer, C.A.; Smirnov, A.V.; Spiegel, F.W. and Taylor, M.F.J.R. The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. **J Eukaryot Microbiol.** v. 52, n. 5, p. 399 – 451, 2005.

Ajzenberg, D.; Cogné, N.; Paris, L.; Bessièrès, M. H.; Thulliez, P.; Filisetti, D.; Pelloux, H.; Marty P.; Dardé, M. L. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* Isolates Associated with Human Congenital Toxoplasmosis, and Correlation with Clinical Findings. **J Infect Dis.** v. 186, n. 5, p. 684 - 689, 2002.

Amato Neto, V. **Toxoplasmose.** São Paulo: Savier, 1982.

Amato Neto, V., Medeiros, E.A. **os Médicos** – São Paulo, ppS., Levi, G.C. & Duarte, M.I.S. **Toxoplasmose.** 4^a. Edição. SARVIER, p. 29-37, 1995.

Angelici, M.C.; Buffolano, W.; Grandolfo, M. E.; Gramiccia, M.; Majori, G. Control of congenital toxoplasmosis in Italy: The project of the Istituto Superiore di Sanita. **Ann Ist Super Sanita.** v. 35, n. 2, p. 329 - 333, 1999.

Apgar, V. A proposal for a new method of evaluation of the newborn infant. **Curr Res Anesth Analg.** v. 32, n. 4, p. 260 - 267, 1953.

Araújo, F.G. Anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em doadores de sangue. **Rev Inst Med Trop.** São Paulo, v. 12, p. 105 -111, 1970.

Ashburn, D.; Evans, R.; Chatterton, J. M. W.; Joss, A. W. L.; Ho-Yen, D. O. *Toxoplasma* Dye Test Using Cell Culture Derived Tachyzoites. **J Clin Pathol.** v. 53, n. 8, p. 630 - 633, 2000.

Aspöck, H.; Pollak, A. Prevention of prenatal toxoplasmosis by serological screening of pregnant women in Austria. **Scand J of Infec Dis.** v. 84, p. 32 - 37, 1992.

Bader, T. J.; Marcone, G. A.; Asch, D. A. Prenatal Screening for Toxoplasmosis. **Obsts & Gynecol.** v. 90, n. 3, p. 457 - 464, 1997.

Bertschinger, B. Técnicas de Imunofluorescência e Análise interpretativa dos resultados. **Apostila**, Porto Alegre, 1980.

Bichara, C.N.C. Perfil epidemiológico da toxoplasmose humana na área metropolitana de Belém/PA: a experiência no serviço de parasitologia do Instituto Evandro Chagas [Dissertação – U.F.P.]. Belém: Universidade Federal do Pará, MPEG, EMBRAPA; 2001.

Bivas-Benita, M.; Laloup, M.; Versteyhe, S.; Dewit, J.; Braekeleer, J.; Jongert, E. and Borchard, G. Generation of *Toxoplasma gondii* GRA1 protein and DNA vaccine loaded chitosan particles: preparation, characterization, and preliminary in vivo studies. **Internat J of Pharmaceutics**. v. 6, n. 266, p. 17 - 27, 2003.

Black, M. W.; Boothroyd, J. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*. **Microbiol Mol Biol Rev**. v. 63, n. 3, p. 607 - 623, 2000.

Bout, D.T.; Mevelec, M.N.; Velge-Roussel, F.; Dimier-Poisson, I. & Lebrun, M. Prospects for a human *Toxoplasma* vaccine. **Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord**. v. 2, n. 3, p. 227 - 234, 2002.

Boyer, K. M.; Holfels, E.; Roizen, N.; Swisher, C.; Mack, D.; Remington, J.; Withers, S.; Meier, P.; McLeod, R. and the Toxoplasmosis Study Group. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in mothers of infants with congenital toxoplasmosis: Implications for prenatal management and screening. **Am J Obst Gynecol**. v. 192, n. 2, p. 564 - 571, 2005.

Brisighelli Neto, A. Prevalência da Toxoplasmose em gestantes da cidade de Bragança Paulista - São Paulo. [Dissertação - USP]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública; 1998.

Burg, J.I.; Grover, G.M.; Pouletty, P. *et al.* Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii* by polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol**. v. 8, n. 27, p. 1787 – 1792, 1989.

Buxton, D. Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora canium* and *Sarcocystis* spp.) in sheep and goats: recent advances. **Vet Res**. v. 29, n. 3 - 4, p. 289 - 310, 1998.

Camargo, M.E.; Leser, P.G.; Rocca, A. Rheumatoid factors as a cause for false positive IgM anti-*Toxoplasma* fluorescent tests. A technique for specific results. **Rev Inst Med Trop**. São Paulo, v. 14, n. 5, p. 310 - 313, 1972.

Camargo, M.E. & Leser, P.G. Diagnostic information from serological tests in human toxoplasmosis II – Evolutive study antibodies and serological patterns in acquired toxoplasmosis, as detected by hemagglutination, complement fixation, IgG and IgM immunofluorescence tests. **Rev Inst Med Trop**. São Paulo, v. 18, n. 4, p. 227 - 238, 1976.

Camargo, M.E.; Moura, M.E.G.; Leser, P.G. Toxoplasmosis serology: an efficient hemagglutination procedure to detect IgG and IgM antibodies. **Rev Inst Med Trop.** v. 31, n. 4, p. 279 - 285, 1989.

Camargo, M.E. Alguns aspectos atuais do diagnóstico de laboratório da Toxoplasmose. **An Acad Nac Med.** v. 155, p. 236 - 239, 1995.

Camargo, M.E. **Toxoplasmosis.** In: Ferreira A.W., Ávila S.L.M. (eds) Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes, Ed Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 165 –174, 1996.

Cantos, G.A.A.; Prando, M.D.; Siqueira, M.V.; Teixeira, R.M. Toxoplasmose: ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e diagnóstico. **Rev da Assoc Med Bras.** v. 46, n. 4, p. 335 - 341, 2000.

Carmo, E.L.; Povoá, M.M.; Trindade, D.B.; Machado, L.D.; Mesquita, M.P.M. Levantamento da prevalência de *Toxoplasma gondii* através de diferentes métodos sorológicos em um grupo de grávidas e crianças (0-2 anos) da cidade de Belém/PA. In: 14º Congresso Brasileiro de Parasitologia; 1997; Salvador. Anais. Salvador: [s.n.], p. 107, 1997.

Chabbert, E.; Lachaud, L.; Crobu, L.; Bastien, P. Comparison of Two Widely Used PCR Primer Systems for Detection of *Toxoplasma* in Amniotic Fluid, Blood, and Tissues. **J Clin Microbiol.** v. 42, n. 4, p. 1719 -1722, 2004.

Chamone, D.A.F.; Sáez-Alquézar, A, Salles, N.A. *et al.* Triagem Sorológica em Bancos de Sangue. **Manual de Transfusão Sangüínea.** Roca. 2001. 227-256. In: Carrazzone C.J.V.; Brito, A.M.; Gomes, Y.M. Importância da avaliação sorológica pré-transfusional em receptores de sangue. **Rev Bras Hematol Hemoter.** v. 26, n. 4, p. 93 - 98, 2004.

Chan, C.C.; Palestine, A.G.; Li Q.; Nussenblatt, R.B. Diagnosis of ocular toxoplasmosis by the use of immunocytology and the PCR. **AJO.** p. 803 - 805, 1994.

Choi, M. Y.; Nam, H. W.; Youn, J. H.; Kim, D. J.; Kong, Y.; Kang, S. Y.; Cho, S. Y. Detection of antibodies in serum and cerebrospinal fluid to *Toxoplasma gondii* by indirect latex agglutination test and enzyme-linked immunosorbent assay. **Kisaengchunghak-Chapchi.** v. 30, n. 2, p. 83 – 90, 1992

Chu, R.W. Leukocytes in blood transfusion: adverse effects and their prevention. **HKMJ.** v. 5, n. 3, p. 280 - 284, 1999

Cimerman B. & Cimerman S., **Parasitologia Humana e seus Fundamentos Gerais,** Ed. Atheneu , São Paulo, 375 p, 1999.

Coelho, R.A.L.; Kobayashi, M; Carvalho, J.L.B. Prevalence of IgG antibodies specific to *Toxoplasma gondii* among blood donors in Recife, Northeast Brazil. **Rev Int Med Trop S Paulo**. v. 45, n. 4, 2003.

Contreras, M.D; Sandoval, M.L; Salinas, P; Muñoz, P; Vargas, S. Utilidad diagnóstica de ELISA IgG, IgM, IgA y ELISA avidéz de IgG em toxoplasmosis reciente y cronica. **Bol Chil Parasitol**. v. 55, n. 1 - 2, p. 1 – 10, 2000.

Coppens, I. And Joiner K.A. Parasite-host cell interactions in toxoplasmosis: new venues for intervention? Expert Reviews in Molecular Medicine. Acession information(01)00277-7a.pdf(short code:txt001kjj); 15 janeiro 2005. Acesso: <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk>.

Costa, J. M.; Pautas, C.; Ernault, P.; Foulet, F.; Cordonnier, C. and Bretagne S. Real-Time PCR for Diagnosis and Follow-Up of *Toxoplasma* Reactivation after Allogeneic Stem Cell Transplantation Using Fluorescence Resonance Energy Transfer Hybridization Probes. **J Clin Microbiol**. v. 38, n. 8, p. 2929 - 2932, 2000.

Couvreur, J.; Thulliez, P.; Daffos, F.; Aufrant, C.; Bompard, Y.; Gesquiere, A.; Desmots, G. In utero treatment of toxoplasmic fetopathy with the combination pyrimethamine-sulfadiazine. **Fetal Diagn Ther**. v. 8, n. 1, p. 45 - 50, 1993.

Daffos, F.; Forestier, F.; Capella-Pavlovsky, M.; Thulliez, P.; Aufrant, V.; Valenti, D.; Cox, W.L. Prenatal management of 746 pregnancies at risk for congenital toxoplasmosis. **N Engl J Med**. v. 318, n. 5, p. 271 - 275, 1988.

Dagher, R. & Lucas, K. Toxoplasmosis in the patients with cancer. **Infect Med**. n. 13, p. 998 -1000, 1996.

Dardé, M. L. Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. **Ann Ist Sanita**. v. 40, n. 1, p. 57 - 63, 2004.

de Carli, G.A. Parasitologia Clínica – Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para Diagnóstico das Parasitoses Humanas. São Paulo: Atheneu, p. 525, 2001.

Decoster, A. P.; Gontier, E.; Dehecq, J. L.; Demory and M. Duhamel. Detection of anti-*Toxoplasma* immunoglobulin A antibodies by Platelia-Toxo IgA directed against P30 and by IMx Toxo IgA for diagnosis of acquired and congenital toxoplasmosis. **J Clin Microbiol**. v. 33, n. 8, p. 2206 - 2208, 1995.

Derouin, F.; Chastang, C. Enzyme immunoassay to assess effect of antimicrobial agents on *Toxoplasma gondii* in tissue culture. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 32, n. 3, p. 303 – 307, 1988.

Derouin, F.; Thulliez, P.; Garin, Y. J. F. Interêt et limites da la sérologie de toxoplasmose chez les sujets VIH+. **Path Biol**. v. 39, n. 4, p. 255 - 259, 1991.

Derouin, F. Pathogeny and immunological control of toxoplasmosis. **Braz J Med Biol Res.** v. 25, n. 12, p. 1163 - 1169, 1992.

Derouin, F. & Garin, Y. J. F. Isolement de *T. gondii* par culture cellulaire chez les sujets infecté par le VIH. **Presse Med.** v. 21, n. 39, p. 1853 - 1856, 1992.

Desmonts, G.; Couvreur, J.; Alison, F.; Baudelot, J.; Gerbaux, J.; Lelong. Epidemiological study on toxoplasmosis: the influence of cooking slaughter-animal meat on the incidence of human infection. **Rev Fr Etud Clin Biol.** v. 10, n. 9, p. 952 – 958, 1965.

Desmonts, G.; Naot, Y.; Remington, J. S.. Immunoglobulin M immusorbent agglutination assay for diagnosis of infections diseases: diagnosis of acute congenital and acquired *Toxoplasma* infections. **J Clin Microbiol.** v. 14, p. 486 - 491, 1991.

Desmonts G. & Couvreur, J. Toxoplasmose congénitale. Estude prospective de l'issue de la grossesse chez 542 fêmmes atteintes de toxoplasmose acquise en cours de gestation. **Sem Hôp Paris.** v. 62, p. 1418 - 1422, 1986.

Dubey, J. P. Isolation of *Toxoplasma gondii* from the feces of a helminth free cat. **J Protozool.** v. 15, n. 4, p. 773 - 775, 1968.

Dubey, J. P. & Beattie, C. P. Toxoplasmose of animals and man. Boca Raton. **CRC Press.** p. 1 - 220, 1988.

Dubey, J.P. *Toxoplasma*, *Neospora*, *Sarcocystis*, and other cystforming coccidian of humans and animals. In: Kreier, J.P. (ed.) **Parasitic Protozoa.** Academic Press, New York, v. 4, p. 1-57, 1993.

Dubey, J.P. Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and humans. **Vet Parasitol.** v. 64, n. 1-2, p. 65 -70, 1996.

Dubey, J. P.; Speer, C. A.; Shen, S. K.; Kwok, O. C. H. and Blixt, J. A. Oocyst-induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity, and stage conversion in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **J Parasitol.** v. 83, n. 5, p. 870 – 882, 1997.

Dubey, J.P.; Lindsay, D.S. and Sperr, C.A. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. **Clin Microbiol Reviews.** v. 11, n. 2, p. 267 - 299, 1998.

Dubey, J.P.; Odening, K. Toxoplasmosis and related infections. In: Parasitic diseases of wild mammals. Samuel W.M., Pybus M.J., Kocan A.A. (eds). Iowa State University Press, Ames, p. 478 - 492, 2001.

Duffy, K.; Wharton, P.J.; Johnson, J.; New, L.; Holliman, R.E. Assessment of immunoglobulin-M immunosorbent agglutination assay (ISAGA) for detecting *Toxoplasma* specific IgM. **J Clin Pathol.** v. 42, n. 9, p. 1291-1295, 1989.

Dupon, M.; Cazenave, J.; Pellegren, J.L. *et al.* Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR and tissue culture in cerebrospinal fluid and blood of human immunodeficiency virus-seropositive patients. **J Clin Microbiol.** v. 33, n. 9, p. 2421 - 2426, 1995.

Engstrom, R. E.; Holland, G. N.; Nussenblatt, R. B.; Jabs, D. A. Current practice in the management of ocular toxoplasmosis. **Am J Ophthalmol.** v. 111, n. 5, p. 601 - 611, 1991.

Eskild, A., Oxman, A., Magnus, P., Bjorndal, A., Bakkeig, L.S. Screening for toxoplasmosis in pregnancy: what is the evidence of reducing a health problem? **J Med Screen.** v. 3, n. 4, p.188 -194, 1996.

Filisetti, D.; Gorcii, M.; Pernot-Marino, E.; Villard, O. and Candolfi E. Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis Comparison of Targets for Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR. **J Clin Microbiol.** v. 41, n. 10, p. 4826 – 4828, 2003.

Foudrinier, F.; Marx-Chemla, C.; Aubert, D.; Bonhomme, A.; Pinon, J.M. Value of specific immunoglobulin A detection by two immunocapture assays in the diagnosis of toxoplasmosis. **Europ J of Clin Microbiol & Infect Dis.** v. 14, n. 7, p. 585 – 590, 1995.

Frenkel, J.K. Choice of animal models for the study of disease processes in man. Introduction. **Fed Proceedings.** v. 28, n. 1, p. 160 – 161, 1969(a).

Frenkel, J.K. Models for infectious diseases. **Fed Proceedings.** v. 28, n.1, p.179 - 190, 1969 (b).

Frenkel, J.K.; Dubey, J.P. & Miller, N.L.(1970). *Toxoplasma gondii* in cats: Fecal stages identified as coccidian oocysts. **Science.** v. 167, n. 3919, p. 893 - 896, 1970.

Frenkel, J.K., Transmission of toxoplasmosis and the role of immunity in limiting transmission and illness. **J Am Vet Med Assoc.** v. 196 , n. 2, p. 233 - 240, 1990.

Fricker-Hidalgo, H.; Pelloux, H.; Racinet, C.; Greffenstette, I.; Bost-Brut, C.; Goullier-Fleuret, A.; Ambroise-Thomas, P. Detection of *Toxoplasma gondii* in 94 placentae from infected women by polymerase chain reaction, in vivo, and in vitro cultures. **Placenta.** v. 19, n. 7, p. 545 – 549, 1998.

Fuentes, I.; Rubio, J.M.; Ramirez, C. and Alvar, J. Genotypic Characterization of *Toxoplasma gondii* Strains Associated with Human Toxoplasmosis in Spain: Direct Analysis from Clinical Samples. **J Clin Microbiol.** v. 39, n. 4, p. 1566 -1570, 2001.

Gagliuso, D.J.; Teich, S.A.; Friedman, A.H.; Orellana, J. Ocular toxoplasmosis in AIDS patients. **Trans Am Ophthalmol Soc.** n. 88, p. 63 – 88, 1990.

Goldsmith, R.S. Infectious diseases: protozoal & helminthic. Current Medical Diagnosis and treatment. 37th edition. Stamford, Connecticut. USA: Appleton & Lange. 1998. In: Gottstein, B. (1995). *Toxoplasma gondii*: perspectives for a vaccine. **Schweiz Med Wochenschr.** n. 65, 89S-95S, 1995.

Grigg, M.E. & Suzuki, Y. Sexual recombination and clonal evolution of virulence in *Toxoplasma*. **Microbes Infect.** v. 5, n. 7, p. 685 - 690, 2003.

Grover, C. M.; Thulliez, P.; Remington, J. S.; Boothroyd, J. C.. Rapid prenatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid. **J Clin Microbiol.** v. 28, n. 10, p. 2297 - 2301, 1990.

Hoffmann, C. Cerebral Toxoplasmosis. HIV Medicine. Christian Hoffmann, Jürgen Rockstroh and Bernd Sebastian Kamps (Editors)2005, Acessado em 10/01/2005. Acesso: <http://www.hivmedicine.com/textbook/oi/toxo.htm>.

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 Engl J Med.** v. 331, n. 11, p. 695 - 699, 1994.

Howe, D.K.; Sibley, L.D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **J Infect Dis.** v. 172, n. 6, p. 1561 - 1566, 1995.

Howe, D.K.; Honore, S.; Derouin, F.; Sibley, L.D. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. **J Clin Microbiol.** v. 35, n. 6, p. 1411 - 1414, 1997 (a).

Howe, D.K.; Sibley, L.D. Development of molecular genetics for *Neospora caninum*: A complementary system to *Toxoplasma gondii*. **Methods.** v. 13, n. 2, p. 123 –133, 1997 (b).

Ho-Yen, D. O.; Joss A.W.; Balfour, A.H.; Smyth, E.T.; Baird, D.; Chatterton, J.M. Use of the polymerase chain reaction to detect *Toxoplasma gondii* in human blood samples. **J Clin Pathol.** v. 45, n. 10, p. 910 - 913, 1992.

Huskinson-Mark, J.; Araujo, F.G.; Remington, J.S.: Evaluation of the effect of drugs on the cyst form of *Toxoplasma gondii*. **J Infect Dis.** v. 164, n. 1, p. 170-171, 1991.

Hutchinson, W.M. Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. **Nature.** v. 206, n. 4987, p. 961- 962, 1965.

Hunter, C.A.; Remington, J.S. Immunopathogenesis of toxoplasmic encephalitis. **J Infect Dis.** v. 170, n. 5, p. 1057-1067, 1994.

Inagaki, A.D.M. Toxoplasmose e gravidez. Dissertação - UNIFESP. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina; 1997.

Israelski, D.M. & Remington, J.S. Toxoplasmosis in patients with cancer. **Clin Infect Dis.** 1993, v. 17, n. 2, p. 423 - 435, 1993.

Jacobs, L.; Lunde, M. A. Hemagglutination test for toxoplasmosis. **J Parasitol.** v. 43, n. 3, p. 308 - 314, 1957.

Jacquier, P.; Nadal, D.; Zuber, P.; Eckert, J. The status of infection with *Toxoplasma gondii* in the Swiss population: contribution of a seroepidemiologic study from the Zurich canton. **Schweiz Med Wochenschr Suppl.** v. 65, n. 23 S-28S, 1995.

James, G.S.; Sintchenko, V.G.; Dickenson, D.J. and Gilbert, G.L. Comparison of Cell Culture, Mouse Inoculation, and PCR for Detection of *Toxoplasma gondii*: Effects of Storage Conditions on Sensitivity. **J Clin Microbiol.** v. 34, n. 6, p. 1572–1575, 1996.

Jankü, J. Pathogenes a patologická anatomie taknazvaného vnozeného kolohome zluté skrny v oku normálne velikém a mikrophthalmickém s nálezem parazitu v sítnici. **Cas Lék Ces.** v. 62, p. 1021 - 1027, 1054 - 1059, 1081 -1085, 1111 - 1115, 1138 -1144, 1923.

Jaqueti, J.; Hernandez-Garci, R.; Nicolas, D.; Martinez-Hernandez, D.; Navarro-Gallar, F.; Garcia-Esteban, R.J. Serology against *Toxoplasma gondii* in pregnant women. Development of prevalence rates in the course of 4 years. **Rev Clin Esp.** v. 188, n. 6, p. 278 - 280, 1991.

Jones, J.L.; Kruszon-Moran, D.; Wilson, M. *Toxoplasma gondii* infection in the United States, 1999-2000. **Emerg Infect Dis.** v. 9, n. 11, p. 1371 – 1374, 2003.

Kasper, L.H. & Buzoni-Gatel, D. Some opportunistic parasitic infections in AIDS: Candidiasis, Pneumocystosis, Cryptosporidiosis, Toxoplasmosis. **Parasitol Today.** v. 14, n. 4, p. 150 –156, 1998.

Khurana, S.; Dubey, M.L.; Malla N. Association of Parasitic Infections and Cancers. **Ind J Med Microbiol.** v. 23, n. 2, p. 74 – 79, 2005.

Lappalainen, M.; Koskela, P.; Hodman, K. Incidence of primary *Toxoplasma* infections during pregnancy in southern finland: a prospective cohort study. **Scand J Infect Dis.** v. 24, n. 1, p. 97-104, 1992.

Lappalainen, M.; Koskela, P.; Koskiniemi, M.; Ammala, P.; Hillemaa, V.; Terame, K. Toxoplasmosis acquired during pregnancy: improved serodiagnosis based on avidity of IgG. **Infect Dis.** v. 167, n. 3, p. 691 - 697, 1993.

Lelong, B.; Rahelimino, B.; Candolfi, E.; Ravelojaona, B.J.; Villard, O.; Rasamindrakotroka, A.J.; Kien, T. Prevalence of toxoplasmosis in a population of pregnant women in Antananarivo. **Bull Soc Pathol Exot.** v. 88, n. 1, p. 46 - 49, 1995.

Leport, C.; Vilde, J.L.; Katlama, C. Failure of Spiramicyn to prevent neurotoxoplasmosis in immuno-suppressed patients. **JAMA.** v. 255, n. 17, p. 2290, 1986.

Leport, C. & Remington, J. S. Toxoplasmosis au cours du SIDA. **Presse Med.** v.21, n. 25, p. 1165 -1171, 1992.

Levine, N.D. Taxonomy of *Toxoplasma*. **J Protozool.** v. 24, n. 1, p. 36 - 41, 1997.

Levine, N.D. Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. **J Parasitol.** v. 66, n. 5, p. 830 - 834, 1980.

Lewden, C.; Salmon, D.; Morlat, P.; Bévilacqua, S.; Jouglu, E.; Bonnet, F.; Héripret, L.; Costagliola, D.; May, T.; Chêne, G. and the Mortality 2000 study group. Causes of death among human immunodeficiency virus (HIV)-infected adults in the era of potent antiretroviral therapy: emerging role of hepatitis and cancers, persistent role of AIDS. **Intl J Epidemiol.** v. 34, n. 1, p. 121 - 130, 2005.

Literák, I.; Rychlík, I. Genome Changes in the *Toxoplasma gondii* Strains During Laboratory Passages in Mice. **Acta Vet Brno.** v. 68, n. 3, p. 203 - 208, 1999.

Lopez, A.; Dietz, V.J.; Wilson, M.; Navin, T.R.; Jones, J.L. Preventing Congenital Toxoplasmosis. **M M W R - Recommendations and Reports.** v. 49 (RR02), p. 57 - 75, 2000.

Luft, B.T.; Remington, J.S. Toxoplasmic encephalitis. **J Infect Dis.** v. 15, n. 2, p. 211- 222, 1992.

MacAbee, R.; Remington, J.S. Toxoplasmosis: the time has come. **N Eng J Med.** v. 318, n. 5, 313 - 315, 1988.

Martino, R.; Maertens, J.; Bretagne, S.; Rovira, M.; Deconinck, E.; Ullmann, A.J.; Held, T. & Cordonnier, C. Toxoplasmosis after hematopoietic stem cell transplantation. **Clin Infect Dis.** v. 31, n. 5, p. 1188 -1194, 2000.

Maschke, M.; Dietrich, U.; Prumbaum, M.; Kastrup, O.; Turowski, B.; Schaefer, U.W.; Diener, H.C. (1999). Opportunistic CNS infection after bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplant.** v. 23, n. 11, p. 1167 - 1176, 1999.

Miller, N.L.; Frenkel J.K.; Dubey, J.P. Oral infections with *Toxoplasma* cysts and oocysts in felines, other mammals, and in birds. **J Parasitol.** v. 58, n. 5, p. 928 – 937, 1972.

Montoya, J.G.; Remington, J.S. Toxoplasmic chorioretinitis in the setting of acute acquired toxoplasmosis. **Clin Infec Dis.** v. 23, n. 2, p. 277 - 282, 1996.

Morris, A.; Croxson, M. Serological evidence of *Toxoplasma gondii* infection among pregnant women in Auckland. **N Zeal Med J.** v. 117, n. 1189, 2004.

Mozzatto, L.; Soibelmann, R.P. Incidence of congenital toxoplasmosis in southern Brazil: a prospective study. **Rev Inst Med Trop S Paulo.** v. 45, n. 3, 2003.

Nakane, P. K.; Peroxidase Labeled Antibody. A New Method of Conjugation. **J Histochem Cytochem.** v. 22, n. 12, p. 1084 –1091, 1974.

Neves, J.M.; Nascimento, L.B.; Ramos, J.G.L.; Martins-Costa, S.H. Toxoplasmose na gestação. **Rev Bras Ginecol Obstet.** v. 16, n. 6, p. 197 – 202, 1994.

Neves, D. P.; Melo, A. L.; Genaro, O. & Linardi, P. M. **Parasitologia Humana.** 10^a. Ed.: Ed. Atheneu, São Paulo , p. 428 , 2000.

Nguyen, T.D.; de Kesel, M.; Bigaignon, G.; Hoet, P.; Pazzaglia, G.; Lammens, M.; Delmee, M. Detection of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradyzoites in blood, urine, and brains of infected mice. **Clin Diagn Lab Immunol.** v. 3, n. 6, p. 6359, 1996.

Nicole, C.; Manceaux, L. Sur une infection a corps de leishman (ou organisme voisins) du gondii: C.R. **Acad Sci.** n. 147 , p. 763 – 766, 1908.

Nicole C, Manceaux L. Sur un protozoaire nouveau du *gondii*. **Acad Sci.** n. 147, p. 763 – 766, 1909.

Nóbrega, M.C.; Magalhães, V.; Albuquerque, Y.; Magalhães, C.; Arcoverde, C.; Castro, C. Toxoplasmose em gestantes e em seus recém-nascidos, atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco. **RBM Rev Bras Med.** n. 56, p. 23 – 29, 1999.

Ody, P. The Herby Society's Complete Medicinal Herbal. Dorling Kindersley, London, 1993.

Pediatric Medicine Board Review Manual, **AHME - USA.** v. 2, (parte 2), p. 5, 2002.

Pedreira, D.A.L. Contribuição ao estudo da toxoplasmose congênita. Dissertação - UNIFESP. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1995.

Pelloux, H.; Weiss J.; Simon, J.; Muet, F.; Fricker-Hidalgo, H.; Goultier-Fleuret, A.; Ambroise Thomas, P. A new set of primers for the detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid using polymerase chain reaction. **FEMS Microbiol Lett.** v. 138, n. 1, p. 11 – 15, 1996.

Pelloux, H.; Guy, E.; Angelici, M.C.; Aspöck, H.; Bessières, M.H.; Blatz, R.; Pezzo, M.D.; Girault, V.; Gratzl, R.; Petersen, M.H.; Johnson, J.; Krürger, D.; Lappalainen, M.; Naessens, A.; Olsson, M. A second European collaborative study on polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii*, involving 15 teams. **FEMS Microbiol Lett.** v. 165, n. 2, p. 231 – 237, 1998.

Pelloux, H.; Fricker-Hidalgo, H.; Pons, J.C.; Bost-Brut, C.; Brenier-Pinchart, M.P.; Jouk, P.S.; Ambroise-Thomas, P. Congenital toxoplasmosis: prevention in the pregnant woman and management of the neonate. **Arch Pediatr.** v. 9, n. 2, p. 206 – 212, 2002.

Petersen, E.; Pollak, A.; Reiter-Owona, I. Recent trends in research on congenital toxoplasmosis. **Intl J Parasitol.** v. 31, n. 2, p. 115-144, 2001.

Peyron, F.; Wallon, M.; Liou, C.; Garner, C. Treatments for toxoplasmosis in pregnancy (Cochrane Review). **The Cochrane Database of Systematic Reviews.** Issue n.3, art. n.: CD001684. DOI: 10.1002/14651858.CD001684, 1999

Pinkerton, H.; Weinman, D. Toxoplasmosis infection in man. **Arch Pathol.** v. 30, p. 374 – 392, 1940.

Pinkerton, H.; Henderson, R.G. Adult toxoplasmosis. A previously unrecognized disease entry simulating the typhus-spotted fever group. **J Am Assoc.** 1941, 116:807-814. Apud: Amato Neto, V. Medeiros, E.A. S., Levi, G.C., Duarte, M.I.S. Toxoplasmose. 4^a. Ed. São Paulo, Savier, p. 154, 1995.

Pinon, J. M.; Thoannes, H. and N. Gruson. An enzyme-linked immunofiltration assay used to compare infant and maternal antibody profiles in toxoplasmosis. **J Immunol Methods.** v. 77, n. 1, p. 15 - 23, 1985.

Pinon J.M.; Foudrinier, F.; Mougeot, G.; *et al.* Evaluation of risk and diagnostic value of quantitative assays for anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulin A (IgA), IgE, and IgM and analytical study of specific IgG in immunodeficient patients. **J Clin Microbiol.** v. 33, n. 4, p. 878 – 884, 1995.

Pivetti-Pezzi, P.; Accorinti, M.; Tamburi, S. Clinical features of retinochoroiditis in patients with AIDS. **Ann Ophthal.** v. 26, n. 3, p. 73 – 84, 1994.

Pratlong, F.; Boulot, P.; Issert, E.; *et al.* Fetal diagnosis of toxoplasmosis in 190 women infected during pregnancy. **Prenat Diagn.** v. 14, n. 3, p. 191 -198, 1994.

Pratlong, F.; Boulot, P.; Villena, I.; Issert, E.; Tamby, I.; Cazenave, J.; Dedet, J. P. Antenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: evaluation of the biological parameters in a cohort of 286 patients. ***Brit J Obst Gynaecol.*** v. 103, n. 6, p. 552 – 557, 1996.

Raggi, C.C.; Pinzani, P.; Paradiso, A.; Pazzagli, M. and Orlando, C. External Quality Assurance Program for PCR Amplification of Genomic DNA: An Italian Experience. ***Clin Chem.*** v. 49, p. 782 – 791, 2003.

Remington, J.S. The tragedy of toxoplasmosis. ***Ped Infect Dis J.*** v. 9, n. 10, p. 762 – 763, 1990.

Remington, J.S.; McLeod, R.; Desmonts, G. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein J.O., editors. ***Infect Dis Fetus Newborn.*** 5th ed. Philadelphia: WB Saunders, p. 205 – 346, 2001.

Remington, J.S.; Thulliez, P.; Montoya, J. G. Recent Developments for Diagnosis of Toxoplasmosis. ***J Clin Microbiol.*** v. 42, n. 3, p. 941 - 945, 2004.

Rey, L. Parasitologia, Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, 2001.

Roberts, T.; Murrel, K.D. & Marks, S. Economic losses caused by foodborne parasitic diseases. ***Parasitol Tod.*** v.10, n. 11, p. 419 – 423, 1994.

Robert-Gangneux, F.; Gavinet, M. F.; Ancelle, T.; Raymond, J.; Tourte-Schaefer, C. and Dupoy-Camet J. Value of Prenatal Diagnosis and Early Postnatal Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis: Retrospective Study of 110 Cases. ***J Clin Microbiol.*** v. 37, n. 9, p. 2893 – 2898, 1999.

Rodier, M.H.; Berthonneau, J.; Bourguin, A.; Giraudeau, G.; Agius, G.; Burucoa, C.; Hekpazo, A.; Jacquemin, J.L. Seroprevalences of *Toxoplasma*, malaria, rubella, cytomegalovirus, HIV and treponemal infections among pregnant women in Cotonou, Republic of Benin. ***Acta Trop.*** v. 59, n. 4, p. 271 – 277, 1995.

Roos, T.; Martius, J.; Gross, U.; Schrod, L. Systematic serologic screening for toxoplasmosis in pregnancy: is it possible to simplify the diagnostic procedures? ***J Gynecol Obstet Biol Reprod.*** V. 81, n. 22, p. 277 – 283, 1993.

Sabin, A.B. Toxoplasmic encephalitis in children. ***J Amer Med Ass.*** v. 116, p. 801 – 807, 1941.

Sabin, A.B.; Feldman, H.A. Dyes as microchemical Indications of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). ***Science.*** v. 108, p. 660 – 663, 1948.

Savva, D.; Morris, J. C.; Johnson, J. D.; Holliman, R. E. Polymerase Chain Reaction for detection of *Toxoplasma gondii*. **J Med Microbiol.** v. 32, p.25 - 31, 1990

Scorza, T.; D'Souza, S.; Laloup, M.; Dewit, J.; De Braekeleer, J.; Verschueren, H.; Vercammen, M.; Huygen, K. and E. Jongert. A GRA1 DNA Vaccine Primes Cytolytic CD8⁺ T Cells To Control Acute *Toxoplasma gondii* Infection. **Infection and Immunity.** v. 71, n. 3, p. 309 - 316, 2003

Server, J.; Elleberg, J.; Levy, A. Toxoplasmosis: maternal and pediatric findings in 23.000 pregnancies. **Pediatrics.** p. 181-192, 1988.

Sheffield, H.G.; Melton, M.L. *Toxoplasma gondii*: transmission through feces in absence of *Toxocara cati* eggs. **Science.** v. 164, n. 878, p. 431 – 432, 1969.

Shapiro, T.& Englund, P.T. The structure and replication of kinetoplast DNA. **Annu Rev Microbiol.** v. 49, n. 117, p. 1436-1441, 1995.

Sibley, L.D. Recent origins among ancient parasites. **Vet Parasitol.** v. 115, n. 2, p. 185 –198, 2003.

Sibley, L.D. *Toxoplasma gondii*: perfecting an intracellular life style. **Traffic.** v. 4, n. 9, p. 581 – 583, 2003.

Siegel, S.E.; Lunde, M.N.; Gelderman, A.H. *et al.* Transmission of toxoplasmosis by leukocyte transfusion. **Blood.** v. 37, p. 388 – 394, 1971.

Soares, R.M. Caracterização Molecular de *Toxoplasma gondii*. XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária&I Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses, Ouro Preto,M.G. **Rev Bras Parasitol Vet.** v. 13, supl. 1, 2004.

Spalding, S.M.; Amendoeira, M. R. R.; Coelho, J. M. C.; Angel, S. O. Otimização da reação em Cadeia da Polimerase para Detecção de *Toxoplasma gondii* em Sangue Venoso e Placenta de Gestantes. **J Bras Patol Med Lab.** v. 38, n. 2, 2002

Spalding, S.M.; Amendoeira, M.R.R.; Klein, C.H.; Ribeiro, L.C. Serological screening and toxoplasmosis exposure factors among pregnant women in South of Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop.** v. 38, n. 2, 2005

Splendore, A. Um nuovo protozoa parassita de conigli encontrado nelle lesioni anatomiche d'une malattiache ricorda in moltoprinti il kalazar dell' uomo: nota preliminare pel. **Rev Soc Sci.** v. 3, p. 109 – 112, 1908.

Stramer, S.; Caglioti, S.; Strong, D.M. NAT of the United States and Canadian Blood Suply. **Transfusion.** v. 40, p. 1165 –1168, 2000.

Sumikawa, E.; Luhm, K. R.; Freitas, E. R. Avaliação do Teste de IgA e Avidéz de IgG para toxoplasmose no diagnóstico da infecção recente na gestação. 38º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial. Temas Livres selecionados: Imunologia, 22 – 25 Setembro- 2004, Florianópolis-SC, Brasil.

Tenter, A.M.; Heckeroth, A.R.; Weiss, L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Intl J Parasitol*. v. 30, n. 12-13, p. 1217 - 1258, 2000.

The Analyst™ Digital Naturopath – Toxoplasmosis. Acessado em 13 de Dezembro de 2005. Acesso digital : <http://www.digitalnaturopath.com/cond/C669441.html> .

Thomas, B.M.; David, R.H.; Christine, M.L.; Edward, W.T.; Troy, D.J.; Harry, R.H. Evaluation of a PCR Probe Capture Assay for Detection of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Infect Dis /A.S.C.P* – Chicago Il 60612, 2000.

Thomaz-Soccol, V.; Gubert, I.C.; Carzino, L.C.; Massuquetto, S.C.; Thomaz-Soccol, A.T. Prevalência de Toxoplasmose em Gestantes Através da Padronização da Técnica de ELISA. *Rev Med Paraná*. v. 61, n. 1, p. 15 – 17, 2003.

Thomaz-Soccol V.; Thomaz- Soccol, A. T.; Riella J.; Gubert, I. C. Doença de Chagas em indivíduos imunocomprometidos pós transplante renal. *Rev Med Paraná*. v. 61, n. 1, p. 21-23, 2003.

Torres, C. M. Sur une nouvelle maladie de l'homme, caractérisée par la présence d'une parasite intracellulaire, très proche de *Toxoplasma* et de l'*Encephalitozoon*, dans le tissu musculaire cardiaque, les muscles du squelette, le tissu cellulaire sous-cutané et le tissu nerveux. *C R Soc Biol*. v. 97, p. 1778 –1781, 1927.

Uchoa, C. M.; Duarte, R. M.; Laurentino-Silva, V.; Alexandre. G. M. C.; Ferreira. H. G.; Amendoeira, M. R. R. Padronização do Ensaio Imunoenzimático para a Pesquisa de Anticorpos das Classes IgM e IgG anti-*Toxoplasma gondii* e Comparação com a Técnica de Imunofluorescência Indireta. *Rev Soc Bras Med Trop*. v. 32, n. 6, p.661 - 669, 1999.

Varella, I.S.; Wagner, M.B.; Darella, A.C.; Nunes, L.M.; Müller, R.W. Prevalência de Soropositividade para Toxoplasmose em Gestantes. 2003, *J Pediatr*. v. 79, n. 1, p. 69 - 74, 2003.

Vaz, A.J.; Guerra, E.M.; Ferrato, L.C.C.; Toledo, L.A.S., Azevedo-Neto, R.S. Sorologia positiva para sífilis, toxoplasmose e doença de chagas em gestantes de primeira consulta em centros de saúde de área metropolitana, Brasil. *Rev Saúde Pública*. v. 24, n. 5, p. 373 – 379, 1990.

Vidotto, O. Toxoplasmose: epidemiologia e importância da doença na Saúde *Animal Semina*. v. 13, n. 1, p. 69 – 75, 1992.

Villeneuve, A. Les zoonoses parasitaires. L' infection chez les animaux et chez les hommes . Les Presses de L'Université de Montreal, Québec, 499 p, 2003.

Visvesvara, G.S.; Garcia, L.S. Culture of protozoan parasites. ***Clin Microbiol Rev.*** v. 15, n. 3, p. 327 – 328, 2002.

Warnekulasuriya, M.R.; Johnson J.D.; Holliman, R.E. Detection of *Toxoplasma gondii* in cured meats. ***Intl J Food Microbiol.*** v. 45, n. 3, p. 211 - 215, 1998.

Weiss J., DNA Probes and PCR for Diagnosis of Parasitic Infections. ***Clin Microbiol Rev.*** v. 8, n. 1, p. 113-130, 1995.

Weiss, M.J.; Velazquez, N.; Hofeldt, A.J. Serologic tests in the diagnosis of presumed toxoplasmic retinochoroiditis. ***AJO.*** v. 109, n. 4, p. 407 – 411, 1990.

Wolf, A.; Cowen, D. Granulomatous encephalomyelitis due to an encephalitozoon (encephalitozoic encephalomyelitis). A new protozoan disease of man. ***Bull Neurol Inst NY.*** v. 6, p. 306 – 371, 1937.

Yasodhara, P.; Ramalakshmi, B.A.; Lakshmi, V.; Krishna, T.P. Socioeconomic status and prevalence of toxoplasmosis during pregnancy. ***Ind J Med Microbiol*** [serial online]. 2004, n. 22, p. 241 - 243 [cited 2005 Apr 30].

Yera, H.; Tzen, M.; Dupouy-Camet, J. Molecular biology for detection and characterization of protozoan infections in humans. ***Europ J Protistol.*** v. 39, n. 4, p. 435 – 443, 2003.

CAPÍTULO – II

SOROPREVALÊNCIA DE ANTICORPOS *anti-Toxoplasma gondii* EM MULHERES GESTANTES ATENDIDAS PELO SERVIÇO PÚBLICO DA CIDADE DE CURITIBA.

RESUMO

Durante um período de 15 meses (01/04/03 – 31/07/04) foram atendidos 530.119 pacientes pelo serviço público de saúde da cidade de Curitiba, onde 71% eram do sexo feminino (n= 376.734) e 29% (n= 153.734) do sexo masculino. Apenas mulheres em idade reprodutiva entre 15 e 49 anos ($25,8 \pm 7,0$) foram avaliadas para inclusão neste estudo, e compuseram uma amostra de 59,8% (n= 225.052). A avaliação sorológica para toxoplasmose foi realizada em mulheres com teste de gestação positivo (n= 20.389) pelos seguintes métodos imunoenzimáticos automatizados: MEIA-Axsym[®] da ABBOTT(IgG/IgM) e ELIFA-VIDAS[®] da Biomerieux(Avidez) no período de 01/04/03 a 18/02/04 e CLIA-LIASON[®] da DiaSorin (IgG/IgM e Avidez) no período de 19/02/04 a 31/07/04. Foi realizado o teste *Kappa* (*K*) para avaliar a variabilidade e concordância interensaios. Os Kits comerciais foram validados para uso em rotina com um valor *K* para MEIAXCLIA -IgG/IgG , IgM/IgM, variando entre: + 0,75 e 1,00 (excelente), e para CLIA X ELIFA – Avidez, o valor de *K* foi > 0,75 (bom – excelente). Foi estabelecido um padrão de distribuição de resultados sorológicos (IgG+/IgM+, IgG+/IgM-, IgG-/IgM+ e IgG-/IgM-), onde foi testado a hipótese pelo teste do Qui-quadrado para aderência, levando-se em consideração o nível de significância de 0,05 ($\chi^2 = 14.720,35$; $p = 0,00$). Das gestantes que realizaram diagnóstico sorológico para toxoplasmose, incluindo pesquisa das duas imunoglobulinas (IgG e IgM, n= 16.479); 53,03% (n= 8.740) com IgG (+) e IgM (-) apresentando-se na fase crônica da toxoplasmose, 3,10% (n= 512) apresentaram IgM (+) e IgG(+) indicando suspeita de infecção recente ou não, e 0,16% (n= 24) com IgM+/IgG-, e fase aguda de infecção. O percentual de gestantes compatíveis com o interesse deste estudo (IgG+/IgM+ e IgM+/IgG-) foi 3,26% (n= 536). Neste mesmo período, foram também realizados testes de Avidez (n= 166) para avaliar possíveis infecções recentes nas gestantes com sorologia reativa (IgG+ e IgM+) , onde 28,3% (n= 47) apresentaram avidéz fraca indicando infecção recente, e 58,4% (n= 97) com avidéz forte indicando infecção tardia e 13,3% com avidéz intermediária (n= 22) . A taxa de soroconversão observada neste estudo foi de 0,44% (n= 24, 0,16% fase aguda e n= 47, 0,28% fase infecção recente), contudo se considerarmos as 536 gestantes incluídas neste estudo a taxa de soroconversão seria 1,19% (n= 151, 0,91%). Destas pacientes testadas para avidéz, somente 7,83% (n = 13) aceitaram o termo de inclusão para acompanhamento clínico e laboratorial de toxoplasmose até o parto. Os resultados de soroprevalência para IgG e IgM, encontrados permitiram definir o perfil imune das gestantes incluídas neste estudo, e também revelaram que estão próximos aos índices observados em outras regiões do Brasil, demonstrando a importância da continuidade de inquéritos soropidemiológicos regionais e nacionais para a definição de estratégias e políticas de saúde pública e reverter os quadros de soroprevalência a exemplo de outros países onde há o monitoramento compulsório da toxoplasmose.

Palavras Chave: Soroprevalência para toxoplasmose, anticorpos contra-*Toxoplasma gondii*, Avidez, Gestantes, Toxoplasmose congênita.

ABSTRACT

During a period of 15 months (01/04/03 – 31/ 07/04) 530,119 patients were attended by the public health system of the City of Curitiba, where 71% (n= 376,734) were female and 29% (n= 153,734) were male. Women at reproductive age ranging 15 - 49 years old (25.8 ± 7.0), were included in this study, representing 59.8% (n= 225,052). The serological evaluation of toxoplasmosis was carried out in women showing reactive pregnancy tests (n= 20.389) throughout automated immunoenzymatic tests like: MEIA-Axsym[®] from ABBOTT(IgG/IgM) and ELIFA-VIDAS[®] from Biomerieux (Avidity) tested during the period of – 01/04/03 to 18/02/04, and CLIA-LIASON[®] from DiaSorin (IgG/IgM /Avidity) from 19/02/04 to 31/07/04. To evaluate interassay variability and concordance, a *Kappa* test (*K*) was applied. The commercial Kits were validated to laboratory routine use with *K* values to: MEIAXCLIA - IgG/IgG, IgM/IgM, ranging + 0.75 e 1.00 (excellent), and CLIA X ELIFA (Avidity) the *K* value was > + 0.75 (good – excellent). It was established a serological result distribution standard (IgG+/IgM +, IgG + /IgM-, IgG-/IgM + and IgG-/IgM-), and also the hypothesis by the Chi-square adherence test and the significance level of 0,05 ($\chi^2 = 14,720.35$; p = 0.00). It could be also observed that those pregnant women with simultaneous results to IgG and IgM (n= 16,479); 53.03% (= 8,740) showed IgG+/IgM- and were related to chronic phase of toxoplasmosis, 3.10% (n= 512) showed IgG+/IgM+ indicating a probable recent infection or not, and 0.16% (n= 24) were IgM+ a/IgG-, thus characterizing an acute phase of toxoplasmosis. The percentage of pregnant women compatible to the interest of this study (IgM+/IgG- and IgM+/IgG+) was 3.26% (n= 536). To discriminate between recent and past infection, it was also carried out at this same period, IgG Avidity tests (n= 166) to tests which resulted reactive for IgG and IgM, where 28.3% (n= 47) presented low avidity and associated to recent infection, 58.4% (n= 97) with high avidity and associated to previous or past infection and 13,3% (n= 22) with indeterminate results. The seroconversion index observed in this study was 0.44% (n= 24, 0.16% related to acute infection and n= 47, 0.28% recent infection), nevertheless, if we consider the 536 pregnant included in this study the seroconversion index would be 1,19% (n= 151 , 0.91%). Of such patients tested for avidity, only 7.8% (n = 13) accepted to participate into a clinical and laboratorial monitoring of congenital toxoplasmosis along the trimesters of pregnancy until birth. The seroprevalence results to IgG and IgM, permitted to define the serological profile of the pregnant women included in such study, and also revealed the proximity to other serology data found in other regions of Brazil, demonstrating the importance of continuous regional and national seroepidemiological inquiries to well define public health strategies and policies in order to revert and reduce serology prevalence as described in other countries where toxoplasmosis monitoring is mandatory.

Key words: Seroprevalence, antibodies anti-*Toxoplasma gondii*, Avidity, Pregnant Women

INTRODUÇÃO

A patologia na toxoplasmose congênita, depende, em geral, da data da contaminação materna (Desmonts & Couvrer, 1986; Hohlfeld *et al.*, 1994; Robert-Gangneux *et al.* 1999, Dunn *et al.*, 2000; Kodjikian, 2004). Durante a contaminação no primeiro trimestre da gestação, as lesões em geral podem ser mais extensas, levando a morte do feto ou à formação de focos necróticos, responsáveis por seqüelas graves (Dubey *et al.*, 1998; Jones, 2001; Pelloux *et al.*, 2002; Hill & Dubey, 2002; Ho-Yen, 2005). Quando a infecção materna se dá no segundo trimestre, a contaminação é mais freqüente, mas as lesões podem ser menos graves, podendo ocorrer aborto espontâneo em cerca de 25% dos casos ou doença severa (Jones, 2001; Pelloux *et al.*, 2002; Hill & Dubey, 2002; Manual - Projeto Mãe Curitibana, 2004). No terceiro trimestre geralmente ocorre doença subclínica (Remington & Desmonts 1990, Jones, 2001; Pelloux, 2002; Manual - Projeto Mãe Curitibana, 2004).

Em função da variedade fisiopatológica e clínica da infecção toxoplásmica, as modalidades de diagnóstico são diferenciadas, podendo estar relacionadas a uma reativação em indivíduos imunodeprimidos, a uma infecção neonatal ou a uma infecção primária (Guerina *et al.*, 1994; Hartup *et al.*, 1997; Hezard *et al.*, 1997; Hill & Dubey, 2002; Novotna; 2005)

O diagnóstico conclusivo pode ser feito pela demonstração do parasita. No entanto, a pesquisa pelo exame direto é difícil e deve, freqüentemente, ser complementada por métodos indiretos tais como inoculação em animais de laboratório, cultura celular ou técnicas sorológicas (Uchoa *et al.*, 1999; Robert-

Gagneux *et al.*, 1999, Montoya, 2002). Os métodos diretos são importantes quando os diagnósticos sorológicos não apontam dados conclusivos (Derouin & Garin, 1992, Uchoa *et al.*, 1999, Montoya, 2002).

Exames de triagem sorológica de rotina em pacientes gestantes para patógenos de importância clínica, como para o complexo *TORCH* (detecção de anticorpos circulantes para *Toxoplasma gondii*, Vírus da Rubéola, Citomegalovírus e para vírus da família *Herpesviridae*) são de ampla utilização na maioria dos laboratórios clínicos do Brasil e em muitos países (Joynson, 1990; Joyson *et al.*, 1990; Stamos *et al.*, 1994; Quiñonez, 2004; Turbadkar *et al.*, 2003). Todavia, não existe uma lei específica que obrigue a realização de testes sorológicos ou de outros métodos convencionais e moleculares para toxoplasmose em população de gestantes, exceto em alguns países da União Européia (EU), como a França.

O diagnóstico de infecção pelo *Toxoplasma gondii* por métodos imunoenzimáticos padronizados e automatizados é de suma importância, pois permite a inclusão de gestantes em fase de infecção recente na terapia protocolar (Vide Capítuo-I), visando minimizar complicações clínicas clássicas decorrentes da passagem transplacentária do parasita ao feto (Wilson, 1980; Pinon, 2001; Peyron *et al.*, 2001; Remington *et al.*, 2004). Contudo, a triagem sorológica tem sido muito questionada em função de seu alto custo, dificuldade de interpretação multiparamétrica, além da correlação de infecção ao longo dos trimestres de gestação com protocolos terapêuticos tóxicos (Angelici *et al.*, 1999; Peyron *et al.*, 1999; Gilbert, 2002; Mombró *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2003; Remington *et al.*, 2004).

Pacientes soronegativas devem ser submetidas a exames sorológicos ao longo dos três trimestres de gestação. No entanto, pacientes infectadas no último trimestre podem permanecer soronegativas até o parto, o que pode evidenciar a necessidade de manutenção de exames sorológicos ao longo da gestação, e de acordo com avaliação médica individual (Chemla *et al.* 2002; Varella *et al.*, 2003).

A toxoplasmose aguda geralmente é caracterizada pelo aparecimento de anticorpos IgM específicos entre 05 e 14 dias pós-infecção, com níveis em elevação em cerca de um mês, podendo permanecer positivos por cerca de 18 meses. Anticorpos IgG atingem um título máximo cerca de 2 meses da infecção, diminuindo após 05 e 06 meses, contudo podem manter-se detectáveis pelo resto da vida (Hill & Dubey, 2002; Pelloux *et al.*, 2002; Projeto Mãe Curitibana - Manual, 2004).

Para a discriminação entre infecção recente ou passada, utilizam-se imunoenaios como o teste de avidéz para anticorpos IgG (IgG Av) (Joyson *et al.*, 1990). Anticorpos produzidos até cerca de 4 meses pós-infecção, apresentam avidéz fraca ou intermediária, indicando infecção recente. Anticorpos antigos apresentam avidéz forte, indicando infecção antiga (ou menos recente). Anticorpos maternos IgG, podem ser transmitidos por via transplacentária ao feto e manter-se no recém nato (RN) (Cozon *et al.*, 1998; Yasodhara *et al.*, 2001; Tanyuksel *et al.*, 2004; Petersen *et al.*, 2005).

Nos casos de suspeita de infecção congênita, o declínio até a não detecção de anticorpos IgG ocorrem por volta de 12 meses, e os anticorpos IgM geralmente não são detectáveis (Amato Neto & Medeiros, 1995; Spalding *et al.*, 2003, 2005).

Contudo, soronegatividade materna e do RN, podem não excluir a possibilidade de TC (Chemla *et al.*, 2002).

Outras imunoglobulinas como a IgA e IgE também são pesquisadas em laboratórios clínicos privados, e em laboratórios oficiais, uma vez que ambas, quando detectadas, podem estar relacionadas a fase aguda da toxoplasmose. Para a avaliação de infecção recente (Ashburn *et al.*, 1998; Boyer, 2001; Roberts, 2001; Spalding *et al.*, 2005). Testes imunoenzimáticos para detecção de marcadores de fase aguda específicos como IgA e IgE tem demonstrado discrepâncias em função da falta de padronização e em consequência, tem sido pouco utilizados, ou mesmo não mais utilizados em análises de soropidemiologia (Decoster *et al.* 1992; Wong *et al.* 1993; Sumikawa *et al.*, 2004).

Casos clínicos sorologicamente inconclusivos são geralmente indicados para pesquisa de ácidos nucleicos pela reação em cadeia da polimerase (PCR), em especial, quando há necessidade da confirmação da presença de parasitos em amostras biológicas como: líquido amniótico, sangue de cordão umbilical, placenta de pacientes submetidas a protocolos terapêuticos (Castro *et al.*, 2001; Spalding *et al.*, 2002; Ajzenberg *et al.*, 2002). A presença do parasita nestas amostras, pode estar relacionado à ineficácia da terapia, ou à presença de cepas mais resistentes de *T. gondii*. (Dardé *et al.* 2004).

A toxoplasmose apresenta uma distribuição cosmopolita, sendo que as maiores soroprevalências são encontradas nas áreas tropicais úmidas, e em regiões apresentando índices sócio-econômicos desfavoráveis e com infraestrutura sanitária deficiente (Dubey, 1998; Hill, 2002; Yasodhara *et al.*, 2004).

A toxoplasmose é considerada de aspecto endêmico, traduzido pela elevada prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma* na população mundial (Amato Neto, 1982; Amato Neto & Medeiros, 1995; Pelloux *et al.*, 2002; Ho-Yen, 2005). Contudo, tem-se observado variações díspares de soroprevalência a nível mundial, podendo ser diferente em regiões de um mesmo país (EUA 10% - 50%), ou diferente entre países - França (50 - 60%) e Áustria (37%). Estas variações podem estar relacionadas a políticas de saúde, índices sócio-econômicos e hábitos alimentares (Vide Tabela 2A – Capítulo-I) (Cantos *et al.*, 2000).

No Brasil, diferenças de soroprevalência para anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* são também observadas em suas regiões, como em estados do sul: Santa Catarina (41,8%), Rio Grande do Sul (54%), Paraná (45,4%) e estados das regiões Norte e Nordeste: Pará (81%) e Pernambuco (69%), conforme detalhado na Tabela 1B do Capítulo-I (Camargo, 1996; Spalding & Amendoeira, 2003; Mozzatto *et al.*, 2003; Thomaz-Soccol *et al.*, 2003).

A soroprevalência de infecção pelo *Toxoplasma gondii* em gestantes e em adultos imunocompetentes pode variar de acordo com a população estudada (Varella *et al.*, 2003; Spalding *et al.*, 2003). Esta variação pode estar correlacionada a uma série de fatores tais como infecção por diferentes fontes de exposição entre elas carne rica em cistos, oocistos presentes em solo contaminado, transplantes de órgãos e transfusões de hemocomponentes (Dubey, 1998; Lopez *et al.*, 2000; Quiñonez, 2004). É imprescindível conhecer a população gestante sujeita ao risco de contrair toxoplasmose durante a gestação e saber qual a taxa de soroconversão para determinar políticas preventivas.

O objetivo deste presente trabalho foi conhecer a soroprevalência da toxoplasmose, e o perfil sorológico em gestantes na faixa etária compreendida entre 15 e 49 anos residentes no município de Curitiba e atendidas pela rede pública. Para atingir os objetivos propostos foram selecionadas técnicas imunoenzimáticas automatizadas, validadas e padronizadas para detecção de classes de imunoglobulinas relacionadas as diferentes fases de evolução clínica da infecção e determinar as taxas de prevalência e de soroconversão na população de risco, e possibilitar a inclusão das gestantes em protocolo clínico e terapêutico de rotina e de pesquisa relacionados a toxoplasmose congênita, que encontram-se descritos nos capítulos III e IV.

MATERIAL E MÉTODOS

AMOSTRAS CLÍNICAS

A coleta de amostras e pesquisas sorológicas foram realizadas ao longo de 15 meses (01/04/03 a 31/07/04): no Laboratório Municipal de Curitiba (LMC), na rede de unidades de saúde (US) da Secretaria Municipal de Saúde da Prefeitura de Curitiba (SMS-PMC), pelo serviço de atendimento pré-natal e ambulatorial do setor de tocoginecologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR). Fluxogramas de trabalho (Anexo 1) e as análises de dados referentes as gestantes foram realizadas nas dependências do Laboratório de Parasitologia Molecular da Universidade Federal do Paraná (LPM-UFPR).

A realização deste estudo foi aprovada mediante submissão de projeto descritivo sob as normas da Comissão de Estudos e de Ética em Pesquisa da

Secretaria Municipal de Saúde da Prefeitura de Curitiba (CES-SMS-PMC) e da Comissão de Ensino e Pesquisa do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CEP-HC-UFPR). Para tal, foram selecionadas aleatoriamente 20.389 amostras de soro de mulheres com teste imunológico de gravidez positivo (TIG+), a partir de uma amostragem inicial de 225.052 mulheres em idade fértil entre 15 e 49 anos de idade, participantes do Projeto Mãe Curitibana (MC) da SMS-PMC.

COLETA DE DADOS

Os dados relacionados à sorologia das gestantes foi obtido através do sistema informatizado do LMC-SMS-PMC e encaminhados para o LPM-UFPR, e avaliados conforme parâmetros sorológicos e critérios clínicos de inclusão das pacientes para estudo, conforme fluxograma de decisão, estabelecidos pelas equipes participantes do projeto.

ANÁLISES SOROLÓGICAS

Durante os trimestres gestacionais, as pacientes foram encaminhadas para as US ou diretamente para o LMC para coleta de exames sorológicos para a pesquisa de toxoplasmose. O sangue foi colhido por venopunção e acondicionado em tubo de hemograma com anticoagulante (EDTA Dissódico – Becton and Dickinson®) para obtenção de plasma, ou acondicionado em tubo sem anti-coagulante (Gel Neutro-Becton and Dickinson®) para obtenção de soro por centrifugação a 3.000 rpm (rotações por minuto) por cerca de 10 minutos.

A identificação dos tubos com etiqueta liberada após registro em sistema automatizado do LMC-SMS/PMC, contendo dados da paciente e código de barras

para rastreabilidade. Cada tubo foi direcionado ao laboratório de sorologia (sob refrigeração: 2 - 8°C) para realização dos imunoenaios. Os métodos utilizados no LMC (Tabela 1) para avaliação de classes de imunoglobulinas e do perfil sorológico das gestantes foram variados conforme período e empresa fornecedora dos *Kits* de imunodiagnósticos e incluídas em processo de licitação pública.

Os procedimentos para cada *Kit* comercial foram executados conforme especificações técnicas e validações de acordo as recomendações de cada fabricante (Anexo 2). Foram utilizados para a validação dos *Kits* previamente ao uso em rotina: painéis de amostras de soros positivos e negativos, controles positivos específicos de cada *Kit* diagnóstico e seus respectivos calibradores.

Tabela – 1: Métodos Imunoenzimáticos utilizados para diagnóstico de Toxoplasmose durante o período da pesquisa sorológica (01/04/2003 – 31/07/2004), e respectivos valores de sensibilidade e especificidade informados pelos *Kits* comerciais.

Parâmetros Kits	MEIA/AxSym®-ABBOTT Período: 01/04/2003 - 18/02/2004	CLIA/LIASON®-DiaSorin Período: 19/02/2004 - 31/07/2004	ELFA/VIDAS®- Biomerieux Período: 01/04/2003 - 18/02/2004
Sensibilidade - IgM	96,30%	90,21%	96,00%
Especificidade - IgM	99,80%	99,50%	99,25%
Sensibilidade - IgG	99,70%	100,00%	99,65%
Especificidade - IgG	99,10%	99,68%	99,92%
Avidez (IgG)	-	90,0%	90,1%

MEIA – imunoenensaio enzimático de microparticulas, **CLIA** – Quimioluminescência, **ELIFA** – método imunoenzimático com detecção final em fluorescência.

ANÁLISE DE DADOS

Foi realizado um estudo prospectivo desenvolvido pela equipe de pesquisadores do LPM – UFPR, que possibilitou a determinação de soroprevalência e perfil sorológico nas mulheres gestantes atendidas nas US-SMS/PMC e no HC-UFPR. Todas as pacientes com resultados sugestivos de infecção aguda (IgM + /IgG -) ou infecção recente (IgM + / IgG + / IgG Avidéz fraca) , ou ainda com perfil de infecção tardia, porém com indicação clínica (IgM+ /IgG+ e IgG Avidéz forte), foram avaliadas para pesquisa e subsequente inclusão no protocolo clínico.

Para testar o padrão de distribuição de classes de imunoglobulinas, foi realizado o teste de hipótese do Qui-quadrado para aderência, levando-se em consideração o nível de significância de 0,05 ($p < 0.05$).

Para verificar a variabilidade interensaios (entre os períodos de 01/04/03 a 18/02/04 e 19/02/04 a 31/07/04) foi utilizado o teste *kappa* não ponderado para comparação entre avaliações. O valor de *kappa* foi calculado para cada par arbitrário dos métodos diagnósticos utilizados.

O *kappa* médio foi computado em relação a todos os pares de testes laboratoriais. Foi calculada também a porcentagem global de concordância.

RESULTADOS

VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS IMUNOENZIMÁTICOS

Os resultados de variabilidade e concordância global entre os 3 métodos imunoenzimáticos automatizados utilizados neste estudo pelo teste Kappa (K) não ponderado foram: para MEIAXCLIA - IgG/IgG, IgM/IgM, variando entre: + 0,75 e 1,00 (excelente), e para CLIA X ELIFA – Avidez, o valor de K foi $> 0,75$ (bom – excelente). Os valores referentes as variabilidades e a concordância interensaios estão descritos nas Tabelas 2 A e B.

Tabela 2 A - Teste K – Análise de Concordância

ANALISE DE CONCORDÂNCIA

Concordância observada (Ao)	$a+d$
Máxima concordância possível (N)	$a+b+c+d$
% global de concordância (% conc.)	$(a+d)/(a+b+c+d)$
Concordância esperada para S (Cs)	$(a+b)(a+c)/(a+b+c+d)$
Concordância esperada para N (Cn)	$(c+d)(b+d)/(a+b+c+d)$
Concordância total esperada (Ac)	$Cs+Cn$
Kappa	$(Ao-Ac)/(N-Ac)$

Obs: Valores de 1 – 7 representam as correlações entre os Métodos Avaliados e Comparadores pelo teste K

1	ToxoG/MEIA-ABBOTT	ToxoG/CLIA-DiaSorin
2	ToxoG/MEIA-ABBOTT	ToxoM/MEIA-ABBOTT
3	ToxoG/MEIA-ABBOTT	ToxoM/CLIA-DiaSorin
4	ToxoG/CLIA-DiaSorin	ToxoM/MEIA-ABBOTT
5	ToxoG/CLIA-DiaSorin	ToxoM/CLIA-DiaSorin
6	ToxoM/MEIA-ABBOTT	ToxoM/CLIA-DiaSorin
7	AVIDEZ/ELIFA-Biomerieux	AVIDEZ/CLIA-DiaSorin

Tabela - 2 B - Análise de Concordância e Variabilidade Interensaios

Diagnóstico	1	2	3	4	5	6	7
concordância positiva	53	16	17	15	17	13	14
discordância positiva	0	0	3	0	3	2	1
discordância negativa	0	35	31	30	31	0	1
concordância negativa	34	36	32	33	32	61	3
Índices de concordância	1	2	3	4	5	6	7
Perc. global de concordância	100,00%	59,77%	59,04%	61,54%	59,04%	97,37%	89,47%
Kappa	100,00%	27,45%	24,22%	29,73%	24,22%	91,25%	68,33%
Concordância observada (Ao)	87	52	49	48	49	74	17
Máxima concordância possível (N)	87	87	83	78	83	76	19
Concordância esperada para S	32,287	9,379	11,566	8,654	11,566	2,566	11,842
Concordância esperada para N	13,287	29,379	26,566	26,654	26,566	50,566	0,842
Concordância total esperada (Ac)	45,575	38,759	38,133	35,308	38,133	53,132	12,684

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Durante o período analisado (01/04/2003 a 31/07/2004) foram atendidas, pelo programa de saúde do município de Curitiba, 530.119 pessoas. Deste total, 29% (153.734) era representado por pacientes do sexo masculino e 71% (n= 376.385), do sexo feminino (Figura 1).

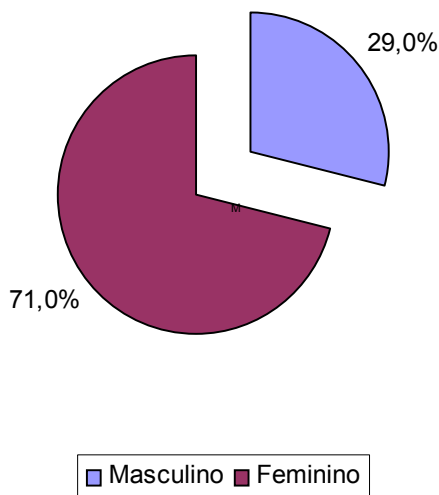


Figura 1 – Percentual de pacientes do sexo masculino (29%, n = 153.944) e do sexo feminino (71%, n= 376.175) atendidos pelo programa de saúde do município de Curitiba durante o período de 01/04/03 a 31/07/04 (n= 530.119).

Apenas as mulheres em idade reprodutiva entre 15 a 49 anos ($25,8 \pm 7,0$), assistidas pelo programa de saúde, foram avaliadas para inclusão no estudo, as quais compuseram uma amostra de 59,8% (n= 225.052). As mulheres com idade inferior a 15 anos e acima de 49 anos (40,2%, n= 151.123) não foram avaliadas.

Do total de mulheres em idade reprodutiva, 12,1% (n= 27.172) submeteram-se a exame sorológico para pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* da classe IgM, 8,7% (n= 19.504) para anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* da classe IgG e 79,3% (n= 178.376) não realizaram sorologia para toxoplasmose (Figura 2).

As pacientes que realizaram o teste imunológico de gravidez com resultado reagente (TIG+) e que retornaram às consultas para avaliação pré-natal foram incluídas neste estudo (n= 20.839) (Tabela - 3).

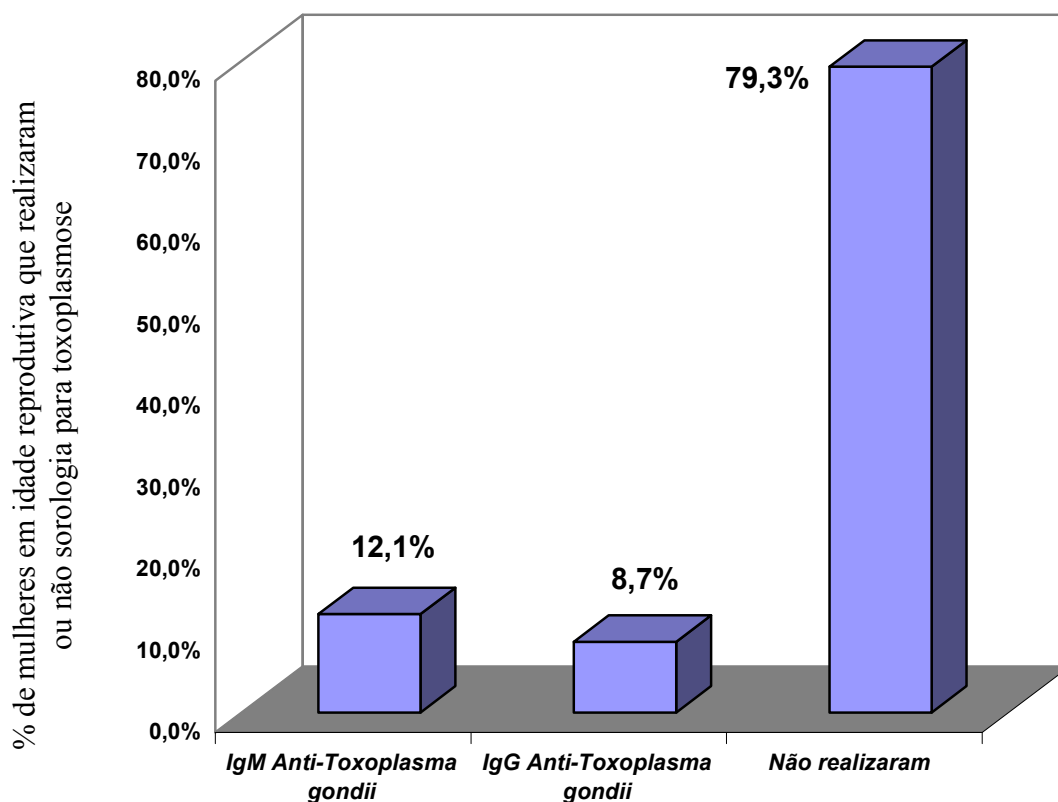


Figura 2 – Percentual de mulheres em idade reprodutiva (15 a 49 anos) que realizaram, ou não, o exame de sorologia para Toxoplasmose, durante o período de 01/04/2003 a 31/07/2004.

As mulheres gestantes que foram submetidas a pesquisa sorológica para toxoplasmose para apenas uma imunoglobulina (Ig) representaram um total de 3780, onde os resultados para Ig da classe IgG (n= 2.822) foram: IgG+ (n= 2.638, 93,48%) e IgG - (n= 184, 6,52%), e os resultados para Ig da classe IgM (n= 958) foram: IgM+ (n= 115, 12,00%) e IgM - (n= 843, 88,00%) (Tabela 3)

Do total de mulheres (n= 16.479) que realizaram o exame para Toxoplasmose simultâneo (IgM e/ou IgG), apresentaram os seguintes resultados

sorológicos: IgG+/IgM+ (n= 512, 3,10%), IgG+/IgM- (n= 8.740, 53,03%), IgG-/IgM+ (n= 24, 0,16%), IgG-/IgM- (n= 7.023, 43,71), onde 3,26% apresentaram-se sororeativas para IgM (IgM+ e IgG-/IgM+) (Tabela 3 e Figura 3).

Evidenciou-se o padrão de distribuição dos resultados sorológicos IgG+/IgM+, IgG+/IgM-, IgG-/IgM+ e IgG-/IgM-, testando a hipótese de que as freqüências entre tais grupos são iguais, já que a distribuição ocorre de maneira aleatória em uma população (Tabela 3). Para testar este padrão, foi realizado o teste de hipótese Qui-quadrado para Aderência, levando-se em consideração o nível de significância de 0,05 ($p < 0,05$). Após a execução do teste, pôde-se verificar que a distribuição das freqüências não é igual entre os diferentes padrões de sorologia ($\chi^2 = 14.720,35$; $p = 0,00$).

Tabela 3 - Número de gestantes participantes do Programa Mãe Curitibana (n = 20.389), que realizaram pesquisa para as imunoglobulinas IgM ou IgG e pesquisa para ambas simultaneamente (IgM e IgG) e percentual associado aos resultados.

Sorologia	Número de pacientes	Percentual (%)
Pesquisa de apenas uma imunoglobulina		
IgG+	2.638	93,48
IgG-	184	6,52
Total	2.822	100
IgM+	115	12,00
IgM-	843	88,00
Total	958	100
Pesquisa simultânea de duas imunoglobulinas		
IgG+/ IgM+	512	3,10
IgG+/ IgM-	8.740	53,03
IgG- /IgM+	24	0,16
IgG- /IgM-	7.203	43,71
Total	16.479	100
Sorologia Indeterminada	130	0,64%
Total Geral	20.389	100%

Os resultados definiram o perfil sorológico das gestantes em: Imunes (IgG+/IgM), Suscetíveis (IgG-/IgM-), e fase aguda (IgM+/IgG-). A partir da interpretação gráfica, se analisarmos apenas as mulheres que realizaram tanto diagnóstico sorológico para IgG como para IgM anti-*Toxoplasma* 53,03% apresentavam-se na fase crônica da doença (IgG+/IgM-) e não incluídas no perfil deste estudo, 3,26% do total apresentaram-se compatíveis ao propósito deste trabalho (IgG- /IgM+ e IgG+/IgM+, = 536) (Figura 3).

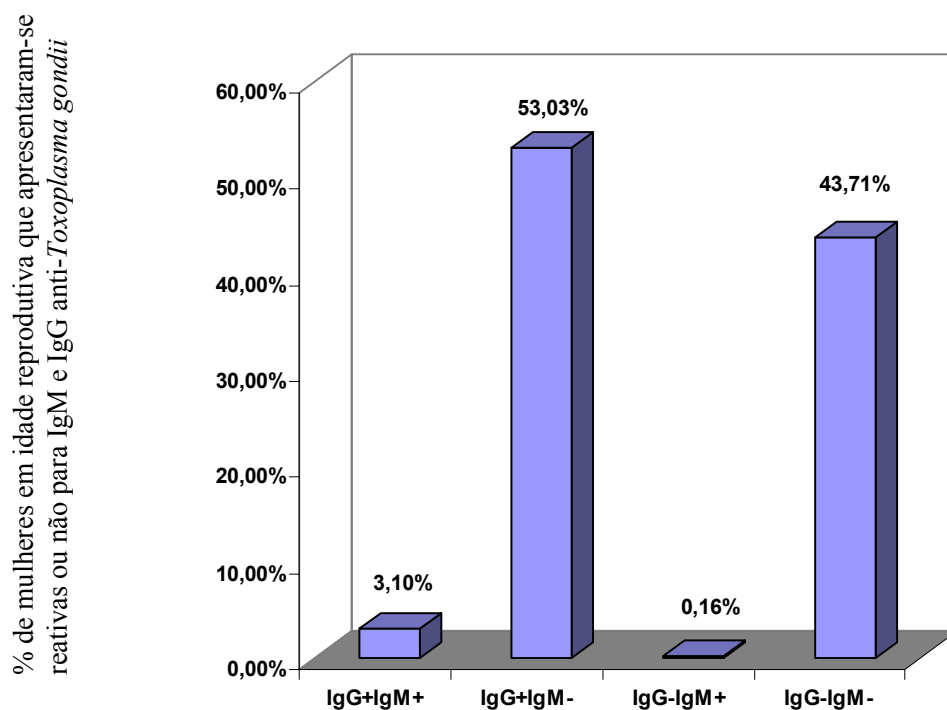


Figura 3– Percentual de mulheres em idade reprodutiva que se apresentaram reativas, ou não, para IgM e IgG anti-*Toxoplasma*, durante o período de 01/04/03 a 31/07/04.

A distribuição geográfica dos percentuais de soropositividade para as Igs das classes IgG e IgM (IgG+ e IgM+) das gestantes está expressa nas figuras 4 A e B, segundo a região administrativa da cidade de Curitiba (US-SMS-PMC). A taxa

de imunoglobulina IgM variou entre 9.03% (Regional do Cajuru) a 18,62% (Regional do Portão) e a imunoglobulina IgG variou de 8,95% (Regional da Matriz) a 21,51% (Regional do Portão).

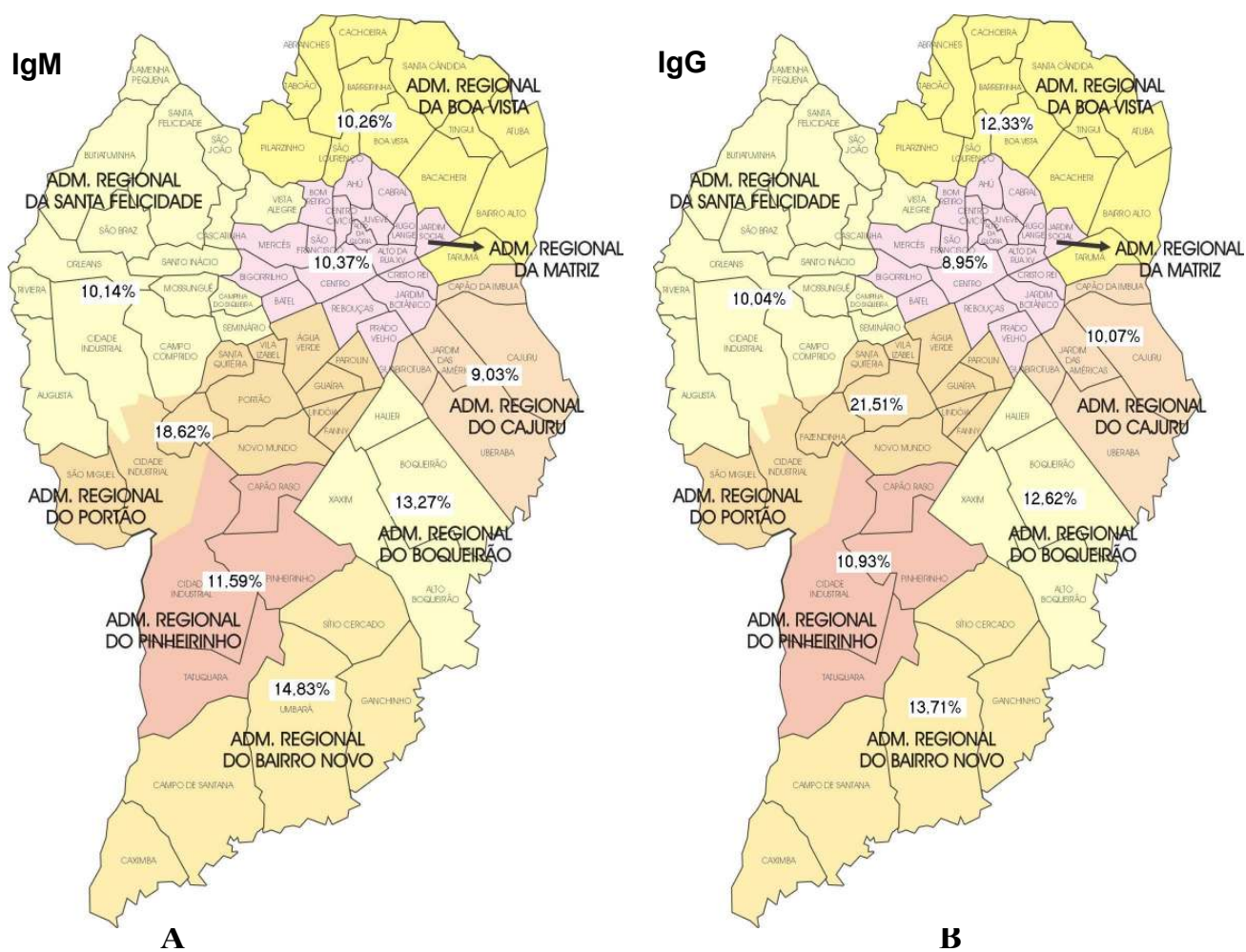


Figura 4 – Percentual de gestantes avaliadas pela pesquisa de imunoglobulinas IgM (A) e IgG (B) nas diferentes Administrações Regionais da Cidade de Curitiba-PR.

Neste mesmo período, foram também realizados testes de Avidéz (n= 166), para avaliar possíveis infecções recentes nas gestantes (idade média $25,5 \pm$

7,0) com sorologia reativa para IgG e IgM, onde 28,3% (n= 47) apresentaram avidez fraca (em soroconversão) e 58,4% (n= 97) avidez forte (infecção tardia) e 13,3% (n= 22) consideradas como limítrofes (amostras com sorologia para Av-IgG intermediária) (Figura 5).

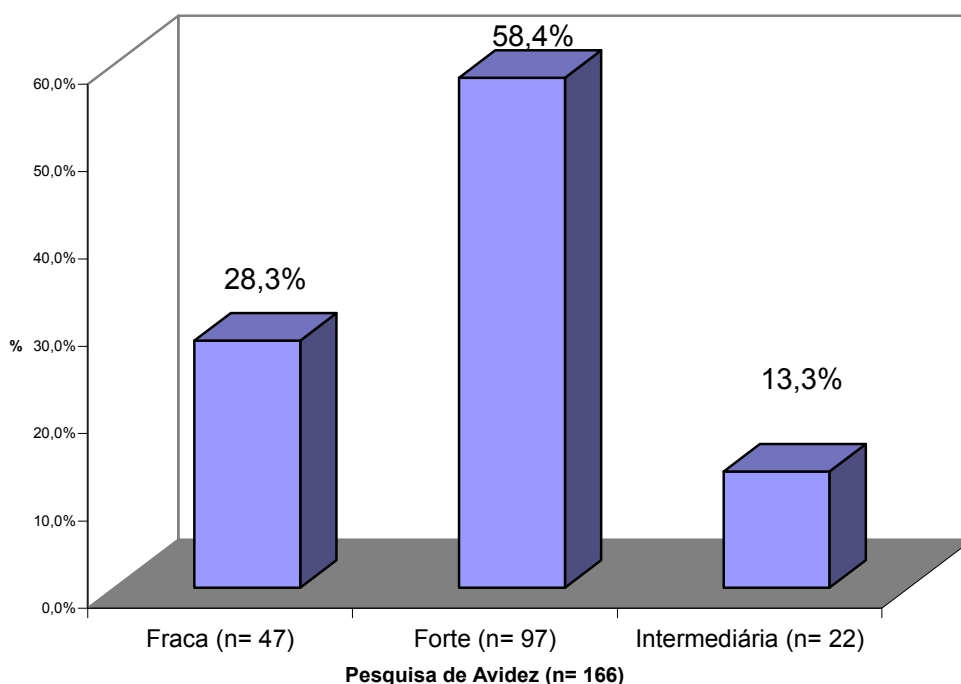


Figura 5 - Percentual de mulheres em idade reprodutiva ($25,5 \pm 7,0$) submetidas ao teste de avidez (IgG-Av, n= 166) e resultados distribuídos em: avidez fraca 28,3% (n= 47), avidez forte 58,4% (n= 97), e avidez intermediária 13,3% (n= 22), durante o período de 01/04/2003 a 31/07/2004.

Destas 166 pacientes, 13 (7,83%) aceitaram participar do projeto de pesquisa e assinaram o termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 3), onde a média de idade foi de 21 ($\sigma \pm 5,9$) com uma variação entre 15 e 35 anos de idade.

A taxa de soroconversão de toxoplasmose calculada foi de 0,44%, a partir de resultados de sorologia para IgM+ (n= 24, 0,16%) e resultados de sorologia indicando infecção recente pela avidéz fraca (n= 47, 0,28%). Contudo, ao considerar as 536 gestantes com sorologia IgM+ e IgM+/IgG+ (em soro conversão ou não) e as 47 expressando avidéz fraca (n= 151, 0,91%), a taxa de soroconversão foi de 1,19%.

O perfil sorológico das 13 pacientes incluídas no estudo está descrito na Tabela 4.

Tabela 4 - Perfil imune - humoral relacionado ao exame de Avidéz (Avf / AVF) das gestantes (n= 13, 7,83%) que concordaram em participar da pesquisa relacionada a infecção toxoplásmica ao longo dos trimestres gestacionais.

Resultados	Faixa Etária	IG(Média)	n	%
Avidéz				
Avf	15 - 35	21,2 ± 3,0	10	76,9
(infecção recente)	21,6 ± 6,4			
AvF	15 - 23	25,3 ± 6,1	3	23,1
(Infecção tardia)	19,0 ± 4,0			
Total	-	-	13	100

Av f (avidéz fraca), Av F(avidéz forte), IG (idade gestacional)

Treze pacientes foram incluídas no tratamento protocolar pós-diagnóstico sorológico. Todas as pacientes apresentaram-se assintomáticas no momento da consulta seqüencial, contudo, quatro gestantes (30,7%) apresentaram reações adversas à medicação protocolar. A média das IGs previamente a amniocentese foi de 23,2 σ = 4,7 (*range*: 18 – 32 semanas), e a média das IGs por faixa etária, prévia a coleta de líquido amniótico, está descrito na Tabela 5.

Tabela 5 - Média de Idade gestacional (IG) das gestantes por faixa etária em consulta prévia a amniocentece, por idade média (anos).

Idade (anos)	IG (Média,σ)	<i>n</i>	%
15 – 25 (18,5 \pm 3,3)	23,7 \pm 5,0	10	76,9
26 – 35 (29,3 \pm 4,9)	21,6 \pm 3,5	3	23,1
Total		13	100

Não houve casos de óbitos de gestantes relacionados à toxoplasmose em nenhuma das 13 pacientes incluídas e participantes do estudo. Também não foram registrados casos de aborto ao longo dos trimestres gestacionais. Durante o procedimento de coleta de LA, a amniocentese (POP-Anexo 4) foi acompanhada por ecografia, observando-se a evolução e desenvolvimento do feto e possíveis comprometimentos por infecção toxoplásmica. Na Tabela 6 encontram-se os dados das gestantes em relação a amniocentese e imagens ecográficas.

Tabela 6 - Observações Clínicas registradas durante o procedimento de Amniocentese acompanhado de ecografia e volume de líquido amniótico coletado para Isolamento *in vivo*, *in vitro* e realização da PCR e RFLP-PCR.

Pacientes N = 13	US	IG/AM 24,9+4,3	Fetoscopia	Volume de LA Coletado em mL	Intercorrência(s)
1 - LSL	Ipiranga	22	Normal	10	-
2 - DAFS	Santa Rita	20	Normal	10	-
3 - YBL	Pompéia	23	Normal	10	-
4 - SCSO	HC-UFPr	24	Normal	10	-
5 - DCO	Campina do Siqueira	22	Normal	10	-
6 - CSL	HC-UFPr	25	Normal	10	Intolerância ao Tratamento (Náusea a Sulfadiazina) Descontinuação : 2 semanas
7 - EKSM	Tarumã	34	Normal	5	Paciente Internada IG (35), pressão alta, ameaça de aborto
8 - JGG	Trindade	32	Sangramento pós coleta, Polidrâmnio	5	Paciente revelou intolerância a medicação. Paciente entrada Emergência HC-UFPr IG(33) com trabalho de parto prematuro, recebeu nifedipina → alta
9 - IS	União das Vilas	22	Placenta prévia, descolamento da borda inferior	LA insuficiente Coleta: 4 mL	Paciente queixou-se da medicação tripla (Intolerância)
10 - ARP	Atuba	28	Normal	10	Não tolerou pirimetamina e sulfadiazina desde o pré-natal
11 - EPS	Lotiguaçu	27	Normal	10	-
12 - KCB	Laboratório (Parolin)	20	Normal	10	HbeAg + / HBc + / HbsAg+ Paciente Alcolista (consumo de Alcool Industrial)
13 - ERJ	Cajuru	25	Normal	10	-

AM: amniocentese, IG (idade gestacional), US (Unidade de Saúde), mL (mililitros), HbeAg / HBc / HbsAg (marcadores sorológicos para o Vírus da hepatite B)

Uma das pacientes – JGG (17 anos), primípara, sem histórico de abortos, apresentou quadro de sangramento pós-amniocentese. Foi observado durante a ecografia um aumento do volume de líquido amniótico (Polidrâmnio) em relação a IG de 32 semanas. Uma semana após a AM, a paciente entrou em trabalho de parto prematuro com IG de 33 semanas, foi medicada e obteve alta, prosseguindo com a gestação. A paciente relatou intolerância a terapia tripla, suspendendo a medicação após a intercorrência clínica. Outras três pacientes (CSL, IS e ARP)

relataram intolerância a medicação (vide Tabela 6), não mencionado se iriam descontinuar o tratamento ao longo dos trimestres gestacionais (conforme estabelecido em prescrição médica).

Três pacientes apresentaram avidéz Forte (Av F - infecção tardia; vide Tabela 4) e foram incluídas no protocolo de pesquisa, segundo critérios médicos.

A paciente EKSM (15 anos) apresentou-se tardiamente à primeira consulta, assim como ao início do tratamento. A paciente IS (23 anos), realizou a primeira consulta com IG de 5 semanas e sorologia reagente IgG e IgM e Avidéz Intermediária, e retornou a segunda consulta quando apresentou IG de 18/19 semanas, iniciou o tratamento após a 19^a. semana de IG, realizou a AM na 20^a. semana de IG e não foi possível estabelecer o período de infecção. A paciente ERJ (19 anos), foi incluída em pesquisa protocolar (a critério médico) após a 21^a./22^a. semana de IG, não sendo possível estabelecer se a infecção foi recente ou tardia ao longo dos primeiros trimestres gestacionais.

As características obstétricas das 13 pacientes observadas e com suspeição de TC ao parto encontram-se descritos na Tabela 7.

Tabela 7 - Dados obstétricos das 13 gestantes com sorologia indicativa de toxoplasmose congênita (TC), ao parto.

Paciente	Raça	Número De Gestações Anteriores	US SMS	MC S/N	Parto HC	Perfil Imune	Parking	PC	PV	RN M/F	RN Peso (g)	RN Apgar 1' / 5'
1- LSL	B	0	Ipiranga	S	MNSF	IR	39 S	S	N	F	2.930	9 / 10
2- DAFS	B	0	Santa Rita	S	HC	IR	39 ½	S	N	M	3.230	8 / 9
3- YBL	B	3	Pompéia	S	HC	IR	40	N	S	M	3.685	9 / 10
4- SCSO	B	0	HC-UFPPr	S	HC	IR	40	N	S	M	3.280	10 / 10
5- DCO	B	1	Campina do Siqueira	S	HNSG	IR	39 ½	S	N	F	2.640	8 / 10
6- CSL	B	0	HC-UFPPr	S	HC	IR	40	N	S	F	2.710	8 / 10
7- EKSM	B	0	Tarumã	S	HC	IT	39 ½	S	N	M	2920	8 / 9
8- JGG	B	0	Trindade	S	HC	IR	40	N	S	M	3.125	3 / 5
9- IS	B	0	União das Vilas	S	HC	IT	40	N	S	F	3.250	9 / 10
10- ARP	B	2 abortos anteriores	Atuba	S	HC	IR	37 ½	S	N	M	2.310	9 / 9
11- EPS	B	3	Lotiguaçú	S	HC	IR	39 ½	S	N	M	2.930	9 / 10
12- KCB	B	3	Laboratório (Parolin)	S	HC	IR	40	N	S	M	2.545	9 / 10
13- ERJ	B	0	Cajuru	S	HC	IT	39 ½	S	N	F	2.995	8 / 10

US / SMS: Unidade de Saúde / Secretaria Municipal de Saúde, MC: Projeto Mãe Curitibana / S: Sim / N: Não, HC: Hospital de Clínicas, MNSF: Maternidade Nossa Senhora de Fátima, HNSG: Hospital Nossa Senhora das Graças, IG: Idade Gestacional, PC: Parto Cesáreo, PV: Parto Vaginal, RN: Recém-nato / M: Masculino / F: Feminino

Após o parto, os RNs foram avaliados por equipe de pediatria do HC-UFPPr, onde constatou-se a ausência de sinais ou sintomas de toxoplasmose congênita.

A placenta ao parto, foi coletada para análises parasitológicas e de histopatologia que estão relatadas no Capítulo III.

Foram observadas duas outras pacientes no período de segunda quinzena de dezembro de 2004 (fora do período de análises deste estudo), sendo que a primeira procurou a US-SMS-PMC no último trimestre de gestação e apresentou sorologia positiva e tardia para toxoplasmose (IgM+ / IgG+ / IgG Av forte) e recebeu medicação protocolar tardiamente. A segunda gestante não passou por nenhuma assistência pré-natal, apresentou-se oligossintomática e ao parto e o RN apresentou-se com quadro brando de TC.

Os dois casos de pacientes gestantes incluídas após o período de análises apresentaram resultados sorológicos compatíveis com infecção tardia:

Gestante – 14: Assintomática. Procurou a US no último trimestre de gestação, onde apresentou sorologia: IgM+ / IgG+ / Aidez forte. A paciente foi medicada de acordo com o protocolo do projeto MC, e exames ecográficos não revelaram anomalias características de infecções transplacentárias. A paciente foi medicada, assim como o RN ao nascimento. Não foi observado sinais e sintomas clássicos de TC ao RN. Não foi possível estabelecer em que trimestre ocorreu a infecção, sendo por isto incluída imediatamente após o resultado sorológico a terapia protocolar, e também seu RN no pós-parto.

Gestante – 15 – Oligossintomática. Não procurou a US, nem o CR-TC/HC-UFPR, não recebeu medicação protocolar. RN ao parto apresentou sinais e sintomas de TC. A terapia foi iniciada e ambos acompanhados pela equipe de infectologia e pediatria do HC-UFPR.

DISCUSSÃO

Durante o período de realização deste estudo, (01/04/03 a 31/07/04), o programa de saúde do município de Curitiba atendeu 530.119 pacientes, sendo deste número 71% eram de mulheres e 29% de homens, com idades e indicações clínicas diversas. Do percentual de mulheres atendidas, 59,8% (n= 225.052) compreenderam a faixa etária reprodutiva entre 15 e 49 anos de interesse deste estudo.

Destas 225.052 pacientes, 12,1% (n= 27.172) foram submetidas a exame sorológico para anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* da classe IgM, e 8,7% (n= 19.504) para anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* da classe IgG, e 79,3% (n= 178.376). Contudo, deste total nem todas estariam grávidas, e portanto, os exames relacionados a toxoplasmose, assim como exames relacionados a outras doenças poderiam estar associados ou não a este número de pacientes. Grande parte destas pacientes (79,3%) não retornaram para consultas nem realizaram exames para toxoplasmose.

Este último dado poderia estar relacionado a uma série de variáveis, como a não existência do campo – GESTANTE – junto aos demais dados demográficos das pacientes que deveriam ser incluídos no sistema para análises estatísticas.

Para a seleção de pacientes para inclusão neste estudo, foi necessário a avaliação de faixa etária reprodutiva, a realização do Teste Imunológico de Gravidez (TIG) e a solicitação de exames sorológicos para toxoplasmose.

Assim, o total de gestantes com faixa etária entre 15 e 49 anos de idade, com TIG+ compuseram um total de 20.389 atendidas pelo “Projeto Mãe Curitibana” da Secretaria Municipal de Saúde e que foram submetidas a exames sorológicos para Igs das classes IgG, IgM para toxoplasmose dentro do propósito deste estudo.

Para a avaliação sorológica foi considerado como critério de qualidade analítica a seleção de um só laboratório de referência oficial (Laboratório Municipal de Curitiba), evitando assim, possíveis variações interlaboratoriais. Outro critério para a realização de exames sorológicos, foi a escolha de sistemas automatizados com capacidade de alto *turn over*, em função do grande número de amostras para

análise, e que apresentassem sensibilidade e especificidade compatíveis, e que fossem validadas tecnicamente e referendadas em publicações (Decoster *et al.*, 1996, Hofgärtner *et al.*, 1997; Pinon *et al.*, 2001; Leser *et al.*, 2003; Tanyuksel *et al.*, 2004; Petersen, *et al.*, 2005).

Três sistemas de imunoenaios automatizados foram utilizados ao longo dos quinze meses deste estudo, eis que, o Laboratório Municipal de Curitiba utiliza sistemas e *Kits* diagnósticos mediante licitação pública, de acordo com custo benefício técnico-administrativo.

Evitou-se variações intermétodos com validações técnicas prévias à utilização dos *Kits* em rotina laboratorial, através de painéis de controles internos e controles dos *Kits* comerciais, pois os extratos antigênicos empregados pelos *Kits* comerciais diferem em tipo, concentração e apresentação, influenciando na sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade dos mesmos (Hofgärtner *et al.*, 1997; Varella *et al.*, 2003).

Os testes de validação e concordância apresentaram resultados mais do que satisfatórios para os parâmetros sorológicos avaliados, ou seja, método (1) IgG/IgG com percentual de concordância global de 100% e teste Kappa de 100% e o método (6) IgM/IgM com percentual de concordância global de 97,37% e teste Kappa de 91,25%. Os resultados associados ao percentual de concordância global para o teste de avidéz (método 7) foi de 89,47% e teste Kappa de 68,33%.

Todos estes resultados indicaram um ótimo desempenho técnico interensaios, confirmando a viabilidade e segurança para utilização destes diferentes métodos de imunoenai para o propósito deste estudo (Kato *et al.*, 1995; Cocchi *et al.*, 1996; Jekel *et al.*, 1999). O monitoramento, pré e pós-

analítico através de ferramentas estatísticas consolidou o propósito deste estudo, quanto ao aspecto de segurança diagnóstica, em função das possíveis variáveis associadas a infecção toxoplásmica na população estudada.

Os demais parâmetros sorológicos que apresentaram resultados de concordância e índice Kappa insatisfatórios (métodos: 2, 3, 4 e 5) não influenciaram o resultado, uma vez que não associaram resultados entre testes idênticos para as mesmas imunoglobulinas (IgG x IgG , IgM x IgM e Avidex x Avidex).

Todo este cuidado, foi para evitar erros laboratoriais, e ter uma prevalência mais precisa, uma vez que a prevalência mundial da toxoplasmose é muito variável, indo de 20 a 90% na população mundial (Server *et al.*, 1988; Jaqueti *et al.*, 1991; Lappalainen *et al.*, 1992, 1993; Lelong *et al.*, 1995; Pelloux *et al.* 2002), e estas oscilações de prevalências podem ocorrer por diversas razões como : clima, fatores socioeconômicos, hábitos alimentares, entre outros fatores de risco (Dubey *et al.*, 1998, Cantos *et al.*, 2000). Estas variáveis podem influenciar grandemente com o uso inadequado de métodos de avaliação sorológica, uma vez que dependendo do fabricante e arranjo antigênico, a sensibilidade e a especificidade podem apresentar-se dispare, podendo ocorrer resultados FP e FN em uma dada população. (Wilson *et al.*, 1997; Uchoa *et al.*, 1999; Petersen *et al.*, 2005)

Estudos realizados na França indicaram que cerca de 50 – 60% da população apresenta anticorpos contra *Toxoplasma*, enquanto que em países de origem anglo-saxônica e do norte da Europa a soroprevalência é de aproximadamente de 30% (Pelloux *et al.*, 2002)

Possivelmente a prevalência encontrada na França e em outros países francófonos da Europa (Bélgica) e na região francófona do Canadá – Quebec (Montreal) com soroprevalência de 40,8%, pode estar relacionada ao costume de ingestão de carne mal cozida ou mesmo crua (Desmonts *et al.* 1965; Pelloux *et al.*, 2002).

A soroprevalência para anticorpos anti-*T. gondii* da classe IgG, observada neste estudo foi 53,03% (n= 8.740), portanto imunes, encontrando-se na faixa de soroprevalência média (43,7%) de países europeus como: Áustria (37%), Bélgica (53%), Espanha(38,8%), França (55%), Itália (40%), Polônia (36%) e Suíça (46,1%) (Lappalainen *et al.*,1992 e 1993; Pelloux *et. al.*, 2002).

Contudo, se comparado a média dos países escandinavos, em especial Finlândia (20%), ou em países do mundo novo como a Austrália e a Nova Zelândia (4%) , a soroprevalência encontrada na região de Curitiba encontra-se bem acima destes registros.

Levando-se em consideração, condições de infraestrutura sanitária e socioeconômica da população de gestantes observada neste estudo (população de baixa renda) e com média de idade $21,6 \pm 6,4$, e atendida pelo sistema público de Curitiba (US), os índices de prevalência encontram-se não muito acima dos valores encontrados nestes países com economia consolidada e com altos índices de IDH (índice de desenvolvimento humano). Deve ser lembrado que a população de Curitiba é heterogênea e com forte influência de hábitos alimentares provenientes de imigrantes europeus orientais e alemães, e que poderiam influir como fatores de risco para toxoplasmose e nos dados sorológicos obtidos.

Também neste estudo, foi observada uma oscilação dos percentuais de soropositividade de Igs das classes IgG e IgM anti-*Toxoplasma gondii* dentro das regiões do município de Curitiba, onde os percentuais de soropositividade para Igs da classe IgG , variaram de 8,95% na Regional da Matriz a 21,51% na Regional do Portão. Neste mesmo estudo observou-se também uma variação de percentuais da distribuição de resultados de Igs da classe IgM entre 9.03% (Regional do Cajuru) a 18,62% (Regional do Portão). Os maiores percentuais observados, tanto para IgG como para IgM foram na “Regional” do Portão.

Este fato poderia estar relacionado a densidade populacional desta região, assim como da concentração de pessoas de baixa renda (independentemente de serem gestantes ou não), assistidas por esta US. Contudo, não se pode afirmar se os percentuais de gestantes sororeativas para as imunoglobulinas IgM e IgG encontradas nesta região poderiam estar relacionadas a infraestrutura habitacional, sanitária ou socioeconômica, pois estudos de coorte relacionados a estes fatores de risco associados a toxoplasmose não foram avaliados nesta pesquisa.

Portanto, seria importante rever a forma de abordagem das gestantes avaliadas durante a consulta para riscos associados à toxoplasmose no município de Curitiba, e assim poderiam ser realizados estudos estatísticos associados aos variados fatores de risco e exposição destas gestantes à toxoplasmose.

Estas mesmas oscilações são observadas em outro países e suas regiões, como EUA com soroprevalência variando entre 10 e 50%, e a variação mais extrema, observada foi no Canadá, na província de origem francesa de Quebec, na cidade de Montreal com 40,8% e valores oscilando entre 2,0 a 4,0% em outras

idades de províncias de origem anglo-saxônica (MacAbe & Remington, 1988, Aspöck, Pollack, 1992; Roos *et al.*, 1993; Villeneuve *et al.*, 2003).

No Brasil os valores de soroprevalência para anticorpos anti-*T. gondii* da classe IgG, apresentam também uma grande oscilação, podendo variar entre 41,9% -Florianópolis-SC (Cantos *et al.*, 2000) e 81% em Belém do Pará –PA (Bichara *et al.*, 2001). Em um estudo prévio sobre soroprevalência para anticorpos anti-*T. gondii* realizado em Curitiba-PR, apresentou um resultado de 45,4% (n= 152) para IgG (Thomaz-Soccol *et al.*, 2003).

Com isso, a soroprevalência encontrada neste estudo de gestantes na cidade de Curitiba (53,03%), fica próxima da média de soroprevalência brasileira (Camargo *et al.*, 1996), contudo encontra-se abaixo da prevalência média encontrada em São Paulo (SP) com 63,3% entre os anos de 1990 e 1995 (Vaz *et al.*, 1990; Pedreira *et al.*, 1995; Inagaki *et al.*, 1995) e Porto Alegre (RS) com 54% (Neves *et al.*, 1994) e 59,8% (Varella *et al.*, 2003).

No Brasil não existem muitos registros de inquéritos epidemiológicos relacionados ao diagnóstico sorológico de infecção em fase aguda, salvo dados isolados de algumas cidades como: Florianópolis – SC com prevalência IgM de 0,87% (Goldsmith, 1998; Cantos *et al.*, 2000), e Campo Grande-MS (Figueiró-Filho *et al.*, 2005), com 0,42% de IgM relacionada a fase aguda.

A prevalência de Acs da classe IgM, relacionadas a fase aguda obtida neste estudo, foi de 0,16% (n= 24), se considerarmos apenas IgM+. Foi também observado neste estudo, que apenas 3,10% das gestantes apresentaram sorologia IgG+/IgM+ (n= 512), indicando suspeita diagnóstica de infecção recente ou não. O percentual de gestantes compatíveis com o interesse deste estudo

(IgM+ e IgM+/IgG-) foi 3,26% (n= 536). A diferenciação de infecção recente de tardia foi estabelecida pelo teste de avidéz, e realizada em 166 gestantes, as quais retornaram para serem submetidas a este exame, onde 28,3% (n= 47) apresentaram avidéz fraca (infecção recente), e 58,4% (n= 97) com avidéz forte (infecção tardia), e 13,3% (n= 22) com avidéz intermediária.

A taxa de soroconversão observada; a partir dos dados de pacientes em fase aguda (n= 24, 0,16%) e em pacientes em fase de infecção recente (n= 47, 0,28%); foi de 0,44%, Contudo, se considerarmos as 536 gestantes, a taxa de soroconversão seria 1,19% (n= 151, 0,91%).

Portanto os dados referentes à prevalência de IgM+ neste estudo, indicam estar próximos da incidência mundial de toxoplasmose aguda na gestação, que varia de 0,06 a 1,4% (Remington, 1990; Cantos *et al.*, 2000). Alguns países que realizaram o estudo de fase aguda pela detecção de Acs IgM revelam semelhanças, com os dados obtidos nesta pesquisa em Curitiba, como: Espanha com IgM (1,2%) (Jaqueti,1991), IgM (1,7%) (Jacquier, 1995), Florianópolis-SC com IgM (0,87%) (Cantos *et al.*, 2000), Campo Grande-MS com IgM (0,42%) (Figueiró-Filho *et al.*, 2005).

Outro dado importante observado neste estudo, foi que não haviam dados estatísticos sobre o acompanhamento das gestantes suscetíveis para toxoplasmose (IgG-/IgM-), portanto estas gestantes poderiam adquirir a toxoplasmose em qualquer período gestacional. Estas gestantes não foram incluídas neste estudo.

Assim, destas pacientes testadas para avidéz, 7,83% (n = 13) aceitaram o termo de inclusão para acompanhamento clínico e laboratorial de toxoplasmose

congênita ao longo da gestação até o parto. O perfil destas 13 gestantes ao teste de avidéz (vide – Tabela 4) foi: Avidéz fraca 76,9% (n= 10) com idade variando entre 15 e 35 anos ($21,6 \pm 6,4$) e IG média de $21,2 \pm 3,0$, e Avidéz forte 23,1%(n= 3) com idade variando entre 15 e 23 anos ($19,0 \pm 4,0$) e IG média $25,3 \pm 6,1$.

Estes resultados indicam que não houve uma diferença significativa entre as pacientes com sorologia expressando índices de avidéz fraca ou forte, e revelaram que encontram-se na média brasileira e mundial, que estão relacionadas faixa etária reprodutiva em mulheres jovens, independentemente da condição socioeconômica, ou até mesmo educacional.

Estas gestantes foram submetidas a amniocentese (AM) associada a ecografia, para coleta do líquido amniótico (LA), a fim de verificar a presença de parasitas por método parasitológico, apesar da medicação protocolar administrada, e também na tentativa de isolar parasitas por métodos *in vitro* e *in vivo*. Análises histopatológicas foram realizadas com amostras de placenta coletadas ao parto (Capítulo III). Parte da amostra de LA coletada durante a AM, foi também para avaliar a presença do DNA do *T. gondii*, indicando infecção pré-natal e a definição do genótipo prevalente por caracterização molecular através da RFLP-PCR, visando associar possível refratariedade das cepas isoladas em relação as drogas protocolares (Capítulo-IV).

Todas as gestantes participantes (n= 13) desta pesquisa e assistidas pelo projeto “Mãe Curitibana”, com indicação sorológica de infecção aguda (IgM+/IgG-) ou recente (IgM+/IgG+ com avidéz fraca), foram incluídas no tratamento protocolar (pirimetamina, espiramicina, sulfadiazina e ácido folínico) , visando minimizar ao máximo riscos associados a infecção transplacentária e seqüelas graves ao feto.

Contudo, estas drogas isoladas ou em associação podem ser tóxicas e indutoras de efeitos colaterais, causando uma refratariedade de uso das mesmas pelas gestantes. Das 13 gestantes incluídas no protocolo terapêutico e clínico deste estudo, com IG média de $24,9 \pm 4,3$ semanas no momento da AM, 4 (30,7%) -CSL, JGG, IS e ARP, reportaram efeitos adversos a terapia prescrita. E uma delas (JGG – US-Trindade) primipara, entrou em trabalho de parto prematuramente (IG 33 semanas), sendo medicada, e prosseguiu com a gestação até o termo. Esta paciente, relatou a descontinuidade da terapia, e dados ecográficos (durante a AM) revelaram aumento do volume de LA (Polidrâmnio) em relação a IG naquele momento (IG32semanas). Ao parto (PV/Parking-40), o RN apresentou APGAR: 1' - 3 e no 5' - 5, valores estes bem abaixo da média observada em todas as outras gestantes (1' -8 e 5' - 9).

Outro fator que ressaltou a importância do diagnóstico sorológico no período pré-natal e do seguimento terapêutico, foi o caso de duas outras pacientes (não incluídas no estudo) observadas no período de segunda quinzena de dezembro de 2004, sendo que a primeira procurou a US-SMS-PMC no último trimestre de gestação e apresentou sorologia positiva e tardia para toxoplasmose (IgM + / IgG + / IgG Av forte) e recebeu medicação protocolar tardiamente.

A segunda gestante não passou por nenhuma assistência pré-natal, pois procurou a US de sua região praticamente uma semana prévia ao termo, e apresentou-se oligossintomática e ao parto e o RN apresentou quadro brando de TC. Estes dois casos foram relatados para o pesquisador do LPM-UFPR pelo LMC-SMS e pelo departamento de pediatria do HC-UFPR.

Apesar da grande variedade de métodos utilizados para o diagnóstico da toxoplasmose (parasitológicos, histopatologia, isolamento *in vivo* e *in vitro* e PCR) o método inicial de escolha, observado na maioria dos laboratórios clínicos públicos, e mesmo particulares, para a definição de infecção, fase clínica e inclusão em tratamento protocolar a fim de minimizar riscos associados, é por sorologia utilizando imunoenaios.

Contudo existem fatores como: complexo ciclo de vida do *T. gondii*, variedade da resposta imune individual, perfil clínico da gestante, carga infectante recebida ao longo dos trimestres gestacionais, persistência do parasita as drogas protocolares, que mostram que o uso de um só método diagnóstico não é recomendável em função destas variáveis (Remington *et al.*, 2004)

No Brasil, não existem estudos que apresentem valores médios obtidos de maneira contínua (dia a dia, mês a mês, ano a ano) o que dificulta o monitoramento, assim como o estabelecimento de projetos relacionados a prevenção e tratamento da toxoplasmose em gestantes e grupos de risco em território nacional, e suas diferentes regiões. Todavia, segundo Pelloux *et al.*, 2002, a média mundial de casos de TC é de 1 a 2 /1.000 nascimentos o que representaria cerca de 750.000 nascimentos anuais no mundo Nosso trabalho mostra que a situação da cidade de Curitiba-PR, não deve diferir muito da situação mundial.

Os resultados deste estudo, indicam a importância do monitoramento das gestantes ao longo dos trimestres gestacionais, em especial daquelas com perfil sorológico compatíveis com infecção aguda ou recente, visando minimizar ao máximo riscos de infecção pré-natal, e seqüelas das mais brandas a mais severas

no período periconcepcional ou tardias, observáveis no período pós-natal e até mesmo anos após parto. Vale ressaltar que o monitoramento sorológico compulsório da toxoplasmose para gestantes, como programa público de prevenção, possibilitou uma reversão nos quadros de soroprevalência em países como a França e a Áustria, onde a incidência média de toxoplasmose fetal foi reduzida de 40% para 7% (Warnekulasuriya *et al.*, 1998; Lopez *et al.*, 2000; Spalding *et al.*, 2003).

Desta forma urge medidas para que uma infecção banal não traga graves conseqüências para a população susceptível.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ajzenberg, D; Cogné, N; Paris, L; Bessièrès, M .H; Thulliez, P; Filisett,i D; Pelloux, H; Marty, P; Dardé, M. L. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* Isolates Associated with Human Congenital Toxoplasmosis, and Correlation with Clinical Findings. **J Infect Dis.** v. 186, p. 684 - 689, 2002.

Amato Neto, V. **Toxoplasmose**. São Paulo: Ed. Savier, 1982.

Amato Neto, V., Medeiros, E.A. **os Médicos** – São Paulo, Levi, G.C. & Duarte, M.I.S. **Toxoplasmose**. 4^a. Ed. Savier. p. 29 - 37, 1995.

Angelici, M.C; Buffolano, W; Grandolfo, M. E; Gramiccia, M; Majori, G. Control of congenital toxoplasmosis in Italy: The project of the Istituto Superiore di Sanita. **Ann Ist Super Sanita.** v. 2, n.35, p. 329 - 333, 1999.

Ashburn D, Joss AWL, Pennington TH, Ho-Yen DO. Do IgA, IgE and avidity tests have any value in the diagnosis of *Toxoplasma* infection in pregnancy? **J Clin Pathol.** v. 51, p. 312 - 315, 1998

Aspöck, H.; Pollak, A. Prevention of prenatal toxoplasmosis by serological screening of pregnant women in Austria. **Scand J of Infec Dis.** v. 84, p. 32 -37, 1992.

Bertschinger, B. Técnicas de Imunofluorescência e Análise interpretativa dos resultados. **Apostila**, Porto Alegre, 1980.

Bichara, C.N.C. Perfil epidemiológico da toxoplasmose humana na área metropolitana de Belém/PA: a experiência no serviço de parasitologia do Instituto Evandro Chagas [Dissertação – U.F.P.]. Belém: Universidade Federal do Pará, MPEG, EMBRAPA; 2001.

Binquet, C.; Wallon, M.; Metral, P.; Gadreau, M.; Quantin, C.; Peyron, F. Toxoplasmosis seroconversion in pregnant women. The differing attitudes in France. **Presse Med.** v. 33, n. 10, p. 775 - 779, 2004.

Boyer, K. Diagnostic Testing for Congenital Toxoplasmosis. **Ped Infect Dis J.** v. 1, n. 20, p. 59 - 60, 2001.

Camargo, M.E. **Toxoplasmosis.** In: Ferreira A.W., Ávila S.L.M. (eds) Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-ímmunes, Ed Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro. p. 165 -174, 1996.

Cantos, G.A., Prando, M.D.; Siqueira, M.V.; Teixeira, R.M. Toxoplasmosis: occurrence of antibodies anti-*Toxoplasma gondii* and diagnosis. **Rev Assoc Med Bras.** v. 46, n. 4, p. 335 - 41, 2000.

Castro, F.C; Castro, M. J. B. V.; Cabral, A.C.V.; Brasileiro Filho, G.; Vitor, R. W. A.; Lana, A M.A.; Andrade, G.MQ. Comparação dos métodos para diagnóstico da Toxoplasmose Congênita. **Rev Bras Ginec Obst.** v. 23, n. 5, 2001.

Chemla, C.; Villena, I.; Aubert, D.; Hornoy, P.; Dupouy, D.; Leroux, B.; Bory, J. P.; and Pinon, J. M. Preconception seroconversion and maternal seronegativity at delivery do not rule out the risk of congenital toxoplasmosis. **Clin and Diag Lab Immunol.** v. 9, n. 2, p. 489 - 490, 2002.

Cocchi, V.; Sintoni, C.; Carreti, D.; Sama, D.; Chiari, U.; Segala, V.; Delazer, .L.; Grilli, N.; Papaleo, R.; Ghirardini, C.; Bucchini, L. External quality assurance in cervical/vaginal cytology: interlaboratory agreement in the Emilia Romagna region of Italy. **Acta Cytologica.** Chicago, v. 40, n. 3, 1996.

Cozon, G.J.N.; Ferrandiz, J.; Nebhi, H.; Wallon, M.; Peyron, F. Estimation of the avidity of immunoglobulin G for routine diagnosis of chronic *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women. **Europ J Clin Microbiol Infect Dis.** v.17, n. 1, p. 32 - 36, 1998.

Dardé, M. L. Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. **Ann Ist Super Sanita.** v. 1, n. 40, p. 57-63, 2004.

Decoster, A; Darcy, F; Caron, A. Anti P30 IgA antibodies as prenatal markers of congenital *Toxoplasma* infection. **Clin Exp Immunol**; v. 87, n. 2, p. 310 - 315, 1992.

Decoster, A. and Lecolier, B. Bicentric Evaluation of Access Toxo Immunoglobulin M (IgM) and IgG Assays and IMx Toxo IgM and IgG Assays and Comparison with Platelia Toxo IgM and IgG Assays. A.S.M. **J Clin Microbiol**. v. 34, n. 7, p. 1606 – 1609, 1996.

Derouin, F. & Garin, Y. J. F.. Isolement de *T. gondii* par culture cellulaire chez les sujets infecté par le VIH. **Presse Méd**. v. 21, p. 1853 – 1856, 1992.

Desmonts, G.; Couvreur, J.; Alison, F.; Baudelot, J.; Gerbaux, J.; Lelong. Epidemiological study on toxoplasmosis: the influence of cooking slaughter-animal meat on the incidence of human infection. **Rev Fr Etud Clin Biol**. v.10, n. 9, p. 952 - 958, 1965.

Desmonts G. & Couvreur, J. Toxoplasmose congénitale. Etude prospective de l'issue de la grossesse chez 542 femmes atteintes de toxoplasmose acquise en cours de gestation. **Sem Hôp Paris**. v. 62, p. 1418 - 1422, 1986.

Dubey, J.P.; Lindsay, D.S. and Sperr, C.A. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. **Clin Microb Rev**. v. 11, n. 2, p. 267 - 299, 1998.

Dunn, D.; Wallon, M.; Peyron, F.; Petersen, E.; Peckham, C.; Gilbert, R. Mother-to-Child Transmission of Toxoplasmosis: Risk Estimates for Clinical Counselling. **Obst & Gynec Survey**. v. 55, n. 1, p. 6, 2000.

Figueiró Filho, E.A.; Lopes, A.H.A.; Senefonte, F.R.A.; Souza, V.G.; Botelho, C.A.; Figueiredo, M.S.; Duarte, G. Toxoplasmose aguda: estudo da frequência, taxa de transmissão vertical e relação entre os testes diagnósticos materno-fetais em gestantes em estado da Região Centro-Oeste do Brasil. **Rev Bras Ginecol Obstet**. v. 27, n. 8, p. 442 - 449, 2005.

Gilbert, R.E.; Peckham, C.S. Congenital toxoplasmosis in the United Kingdom: to screen or not to screen? **J of Med Screening**. v. 9, n. 3, p. 135 - 141(7), 2002.

Goldsmith, R.S. Infectious diseases: protozoal & helminthic. Current Medical Diagnosis and treatment. 37th edition. Stamford, Connecticut. USA: Appleton & Lange. 1998.

Guerina NG. Congenital infection with *Toxoplasma gondii*. **Pediatr Ann**. v. 23, p.138 –151, 1994.

Hartup, C., J. D. Johnson, and R. E. Holliman. The investigation of *Toxoplasma* infection associated with pregnancy. **J Infect**. v. 35, p. 47 - 54, 1997.

Hezard, N., M. Chemla, F. Foudrinier, I. Villena, C. Quereux, B. Leroux, D. Dupouy, M. Talmud, and J. M. Pinon. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis in 261 pregnancies. *Prenat Diagn*. V. 17, p. 1747 -1754, 1997.

Hill, D., Dubey, J.P. **Toxoplasma gondii: transmission, diagnosis and prevention.** *Clin Microbiol Infec*. v. 8, p. 634 - 640, 2002.

Hofgärtner, W.; Swanzy, S.R.; Bacina, R.M., Condon, J.; Gupta, M.; Matlock, P.E., Bergeron, D. L.; Plorde, J. J. and Fristche, T. R. Detection of Immunoglobulin G (IgG) and IgM Antibodies to *Toxoplasma gondii*: Evaluation of Four Commercial Immunoassay Systems. *J Clin Microb*, v. 35, n. 12, p. 3313 – 3315, 1997.

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 Engl J Med*, v. 331, p. 695 - 699, 1994.

Ho-Yen, D.O. Toxoplasmosis. *Medicine on line*. Medicine Publishing Company. v. 3, n. 5 (Infections – Cap.3), p. 120 -121, 2005.

Inagaki, A.D.M. Toxoplasmose e gravidez. Dissertação - UNIFESP. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina; 1997.

Jaqueti, J.; Hernandez-Garci, R.; Nicolas, D.; Martinez-Hernandez, D.; Navarro-Gallar, F.; Garcia-Esteban, R.J. Serology against *Toxoplasma gondii* in pregnant women. Development of prevalence rates in the course of 4 years. *Rev Clin Esp*. v. 88, n. 6, p. 278 – 80, 1991.

Jekel, J,F; Elmore, J.G. Katz,D. **Epidemiologia, bioestatística e medicina preventiva.** Porto Alegre:, Limed, 1999.

Jones, J. L.; Lopez, A.; Wilson, M.; Schulkin, J. and; Gibbs, R. Congenital Toxoplasmosis: A Review. *Obst & Gynec Survey*. v. 56, n. 5, p. 296 – 305, 2001.

Jones, J.L., Kruszon-Moran, D., Wilson, M. *Toxoplasma gondii* infection in the United States. *Emerg Infect Dis*. v. 9, n. 11, p. 1371 - 1374, 2003.

Joynson, D.H. Congenital toxoplasmosis and TORCH. *Lancet*, 1990.

Joynson, D.H.; Payne, R.A.; Rawal, B.K. Potencial role of IgG avidity for diagnosing toxoplasmosis. *J Clin Pathol*. v. 43, p. 1032 - 1033, 1990.

Kato, I.; Santamaria, M.; Ruiz, P.A; *et al*. Interobserver variation in cytological and histological diagnoses of cervical neoplasia and its epidemiologic implication. *J Clin Epidemiol*. Oxford. v. 48, n. 9, p. 1167 -1174, 1995.

Kodjikian, L.; Hoigne, I.; Adam, O.; Jacquier, P.; Aebi-Ochsner, C.; Aebi, C.; Garweg, J. Vertical Transmission of Toxoplasmosis From a Chronically Infected Immunocompetent Woman. ***Ped Infect Dis J***. v.23, n. 3p. 272 - 274, 2004.

Lappalainen, M.; Koskela, P.; Hodman, K. Incidence of primary *Toxoplasma* infections during pregnancy in southern finland: a prospective cohort study. ***Scand J Infect Dis***. v.24, n. 1, p. 97 -104, 1992.

Lappalainen, M.; Koskela, P.; Koskiniemi, M.; Ammala, P.; Hillemaa, V.; Terame, K. Toxoplasmosis acquired during pregnancy: improved serodiagnosis based on avidity og IgG. ***Infect Dis***. v. 167, p. 691 - 697, 1993.

Lelong, B.; Rahelimino, B.; Candolfi, E.; Ravelojaona, B.J.; Villard, O.; Rasamindrakotroka, A.J.; Kien, T. Prevalence of toxoplasmosis in a population of pregnant women in Antananarivo. ***Bull Soc Pathol Exot***. v. 88, n. 1, p. 46 -49, 1995.

Leser, P.G.; Assis-Rocha, L.S.; Moura, M.E.G.; Ferreira, A.W. Comparison of semi-automatized assays for anti-*T. gondii* IgG detection in low-reactivity serum samples: importance of the results in patient counseling. ***J Bras Patol Med Lab***. v. 39, n.2, p. 107-110, 2003.

Lopez, A.; Dietz, V.J.; Wilson, M.; Navin, T.R.; Jones, J.L. Preventing Congenital Toxoplasmosis. ***Morb and Mort Weekly Rep*** – Recommendations and Reports. v. 31, n. 49, p. 57 - 75, 2000.

MacAbe, R.; Remington, J.S. Toxoplasmosis: the time has come. ***N Eng J Med***. v. 318, n. 5, p. 313 - 315, 1998.

Manual - Projeto Mãe Curitibana / SMS-PMC – 2004, Capítulo III página 60: acesso: http://www.curitiba.pr.gov.br/saude/areastematicas/mulher/pre_natal.htm .

Mombrò, M.; Perathoner, C.; Leone, A.; Buttafuoco, V.; Zotti, C.; Lievre, M.A. and Fabris, C. Congenital toxoplasmosis: assessment of risk to newborns in confirmed and uncertain maternal infection. ***Europ J of Peds***. v. 162, n. 10, p. 703 – 706, 2003.

Montoya, J.G. Laboratory Diagnosis of *Toxoplasma gondii* Infection and Toxoplasmosis. ***The J of Infect Dis***. v. 185, n.11, p. 73 – 82, 2002.

Mozzatto L, Soibelman RP. Incidence of congenital toxoplasmosis in southern Brazil: a prospective study. ***Rev Inst Med Trop S Paulo***. v. 45, n. 3, p. 147 - 151, 2003.

Neves, J.M.; Nascimento, L.B.; Ramos, J.G.L.; Martins-Costa, S.H. Toxoplasmose na gestação. ***Rev Bras Ginecol Obstet***. v. 16, n. 6, p. 197 - 202, 1994.

Nogueira, S.A.; Guedes, A.L.; Machado, E.S.; Matos, J.A.; Costa, T.P.; Cortes, E.M. and Lambert, J.S. Toxoplasmic encephalitis in an HIV infected pregnant woman: successful outcome for both mother and child. **Braz J of Infec Trop Dis.** v. 6, n. 4, p. 201 – 205, 2002.

Novotna, M.; Hanusova, J.; Klose, J.; Preiss, M.; Havlicek, J.; Roubalova, K. and Jaroslav, F. Probable neuroimmunological link between *Toxoplasma* and cytomegalovirus infections and personality changes in human host. **BMC Infec Dis.** v. 5, n. 54, 2005.

Pedreira, D.A.L. Contribuição ao estudo da toxoplasmose congênita. Dissertação - UNIFESP. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1995.

Pelloux H. ; Weiss J.; Simon J.; Muet F. ; Fricker-Hidalgo H.; Goultier-Fleuret A.; Ambroise Thomas P. A new set of primers for the detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid using polymerase chain reaction. **FEMS Microb Letters.** v. 138, n. 1, p. 11 – 15, 1996.

Pelloux H.; Guy E.; Angelici M.C.; Aspöck H.; Bessiéres M.H.;Blatz R. ; Pezzo M.D.; Girault V. ; Gratzl R. ; Petersen M.H.; Johnson J.; Krürger D. ; Lappalainen M.; Naessens A. ; Olsson M. A second European collaborative study on polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii*, involving 15 teams. **FEMS Microb Letters.** v. 165, n. 2, p. 231 - 237, 1998.

Pelloux, H., Fricker-Hidalgo, H., Pons, J.C., Bost-Brut, C.,Brenier-Pinchart, M.P., Jouk, P.S., Ambroise-Thomas, P. Congenital toxoplasmosis: prevention in the pregnant woman and management of the neonate. **Arch Pediatr.** v. 9, n. 2, p. 206 -12, 2002.

Petersen, E.; Borobio, M.V.; Guy, E.; Liesenfeld, O.; Meroni, V.; Naessens, A.; Spranzi, E. and Thulliez, P. European Multicenter Study of the LIAISON Automated Diagnostic System for Determination of *Toxoplasma gondii*-Specific Immunoglobulin G (IgG) and IgM and the IgG Avidity Index. **J Clin Microb.** v. 43, n. 4, p. 1570 -1574, 2005.

Peyron, F., Wallon, M., Liou, C., Garner, C. Treatments for toxoplasmosis in pregnancy (Cochrane Review). **The Cochrane Database of Systematic Reviews.** v. 3, 1999.

Pinon, J. M.; Dumon, H.; Chemla, C.; Franck, J.; Petersen, E.; Lebech, M.; Zufferey, J.; Bessieres, M.-H.; Marty, P.; Holliman, R.; Johnson, J.; Luyasu, V.; Lecolier, B.; Guy, E.; Joynson, D. H. M. ; Decoster, A. ; Enders, G. ; Pelloux, H. and Candolfi, E. Strategy for Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis: Evaluation of Methods Comparing Mothers and Newborns and Standard Methods for Postnatal Detection of Immunoglobulin G, M, and A Antibodies. **J Clin Microb.** v. 39, n. 6, p. 2267 –2271, 2001.

Quiñonez, J. Congenital Toxoplasmosis and Congenital Cytomegalovirus Infection. **Ped Med**, 2004, Hospital Physician Board Review Manual. v. 2, n. 2. Acesso: http://www.turner-white.com/pdf/brm_PM_pre2_2.pdf

Remington J, Desmonts G. Toxoplasmosis. Em: Eds. Remington JS, Klein JO. Infectious disease of fetus and newborn infant. 3a. Ed. Philadelphia Saunders, p. 89 –195, 1990.

Remington JS, Thulliez P, Montoya J G. Recent Developments for Diagnosis of Toxoplasmosis. **J Clin Microbiol**. p. 941- 945, 2004.

Robert-Gangneux F, Gavinet M F, Ancelle T, Raymond J, Tourte-Schaefer C and Dupoy-Camet J. Value of Prenatal Diagnosis and Early Postnatal Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis: Retrospective Study of 110 Cases. **J of Clin Microb**. v. 37, n. 9, p. 2893 -2898, 1999

Roberts, A.; Hedman, K.; Luyasu, V.; Zufferey, J.;Bessières, M.-H.;Blatz, R.-M.; Candolfi, E.; Decoster, A; Enders, G.; Gross, U.; Guy, E.; Hayde, M.; Ho-Yen, D.; Johnson, J.; Lécolier, B.; Naessens, A.; Pelloux, H.; Thulliez, P.; Petersen, E. Multicenter Evaluation of Strategies for Serodiagnosis of Primary Infection with *Toxoplasma gondii*. **Europ J of Clin Microb & Infec Dis**. v. 20, n. 7, p. 467 – 474, 2001.

Roos, T.; Martius, J.; Gross, U.; Schrod, L. Systematic serologic screening for toxoplasmosis in pregnancy: is it possible to simplify the diagnostic procedures? **J Gynecol Obstet Biol Reprod**. v. 22, p. 277 - 283, 1993.

Server, J.; ElleMBERG, J.; Levy, A. Toxoplasmosis: maternal and pediatric findings in 23.000 pregnancies. **Pediatrics**. v. 181 –192.283, 1998.

Spalding SM, Amendoeira M R R, Coelho J M C, Angel S O. Otimização da reação em Cadeia da Polimerase para Detecção de *Toxoplasma gondii* em Sangue Venoso e Placenta de Gestantes. **J Bras Patol Med Lab**. v. 38, n. 2, p. 105 – 110, 2002.

Spalding, S.M.; Amendoeira, M.R.R.; Ribeiro, L.C.; Silveira, C.; Garcia, A. P. e Camillo-Coura, L. Estudo prospectivo de gestantes e seus bebês com risco de transmissão de toxoplasmose congênita em município do Rio Grande do Sul. **Rev da Soc Bras de Med Trop**. v. 36, n. 4, p. 483 - 491, 2003.

Spalding, S.M.; Amendoeira, M.R.R.; Klein, C.H.; Ribeiro, L.C. Serological screening and toxoplasmosis exposure factors among pregnant women in South of Brazil. **Rev da Soc Bras de Med Trop**. v. 38, n. 2, p. 173 -177, 2005.

Stamos, J.K.; Rowley. A.H. Timely diagnosis of congenital infections. **Pediatr Clin North Am**. v. 41, n. 5, p. 1017 - 1033, 1994.

Sumikawa, E., Luhm, K. R.; Freitas, E. R. Avaliação do Teste de IgA e Avidéz de IgG para toxoplasmose no diagnóstico da infecção recente na gestação. 38º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial. Temas Livres selecionados: Imunologia, 22 – 25 Setembro- 2004, Florianópolis-SC, Brasil.

Tanyuksel, M.; Guney, C.; Araz, E.; Saracli, M.A. and Doganci, L. Performance of the Immunoglobulin G Avidity and Enzyme Immunoassay IgG/IgM Screening Tests for Differentiation of the Clinical Spectrum of Toxoplasmosis. **J Microb.** v. 42, n. 3, p. 211 - 215, 2004.

Thomaz-Soccol,V.; Gubert, I.C.; Carzino, L.C.; Massuquetto, S.C.; Thomaz-Soccol. A. Prevalência de toxoplasmose em gestantes através da padronização da técnica de ELISA. **Rev Med Parana.** v. 61, n. 1, p. 15 –17, 2003.

Turbadkar, D.; Mathur, M; Rele, M. Seroprevalence of torch infection in bad obstetric history. **Ind J Med Microb.** v. 21, n. 2, p.108 –110, 2003.

Uchôa C M, Duarte R M, Laurentino-Silva V, Alexandre G M C, Ferreira H G, Amendoeira M R R. Padronização do EnsaioImunoenzimático para a Pesquisa de Anticorpos das Classes IgM e IgG anti-*Toxoplasma gondii* e Comparação com a Técnica de Imunofluorescência Indireta. **Rev Soc Bras Med Trop.** v.32, n. 6, p. 661 - 669, 1999.

Varella, I.S., Wagner, M.B., Darella, A.C., Nunes, L.M., Müller, R.W. Prevalência de Soropositividade para Toxoplasmose em Gestantes. **J Pediatr (Rio J).** 2003, v.79, n. 1, p. 69-74, 2003.

Vaz, A.J.; Guerra, E.M.; Ferrato, L.C.C.; Toledo, L.A.S., Azevedo-Neto, R.S. Sorologia positiva para sífilis, toxoplasmose e doença de chagas em gestantes de primeira consulta em centros de saúde de área metropolitana, Brasil. **Rev Saúde Pública.** v. 24, n. 5, p. 373 – 379, 1990.

Villeneuve, A. Les zoonoses parasitaires. L´infection chez les animaux et chez les hommes . Les Presses de L´Université de Montreal, Québec, 499 p., 2003.

Warnekulasuriya, M.R.; Johnson J.D.; Holliman, R.E. Detection of *Toxoplasma gondii* in cured meats. **Intl J Food Microbiol.** v. 45, n. 3, p. 211 -215, 1998.

Wilson, C.B.; Remington, J.S.; Stagno, S. Development of adverse sequelae in children born with subclinical congenital *Toxoplasma* infection. **Pediatrics.** v. 66, n. 5, p. 767 - 774, 1980.

Wilson, M.; Remington, J.S.; Clavet, C.; Varney, G.; Press, C.; Ware, D. and The FDA Toxoplasmosis Ad Hoc Working Group. Evaluation of Six Commercial Kits for Detection of Human Immunoglobulin M Antibodies to *Toxoplasma gondii*. **J Clin Microb.** v. 35, n. 12, p. 3112 – 3115, 1997.

Wong SY, Hajdu MP, Ramirez R, Thulliez P, McLeod R, Remington JS. Role of specific immunoglobulin E in diagnosis of acute *Toxoplasma* infection and toxoplasmosis. **J Clin Microb.** v. 31, p. 2952 - 2953, 1993.

Yasodhara, P.; Ramalakshmi, B.A.; Sarma, M.K.J. A new approach to differentiate recent vs chronic toxoplasma infection: Avidity elisa in *Toxoplasma* serology. **Ind J of Med Microb.** v. 19, n. 3, p.145 – 148, 2001.

Yasodhara, P.; Ramalakshmi B.A.; Lakshmi V.; Krishna T.P. Socioeconomic status and prevalence of toxoplasmosis during pregnancy. **Ind J of Med Microb.** v. 22, n.4, p. 241 –2 43, 2004.

CAPÍTULO III

**ANÁLISE PARASITOLÓGICA DE LÍQUIDO AMNIÓTICO E
HISTOPATOLÓGICA DE PLACENTA DE GESTANTES
COM INDICAÇÃO CLÍNICA E SOROLÓGICA DE
TOXOPLASMOSE AGUDA.**

RESUMO

A toxoplasmose congênita pode envolver riscos em graus variados para gestantes, bem como para o feto. Métodos parasitológicos diretos e isolamento do *Toxoplasma gondii*, tanto *in vivo* como *in vitro*, em amostras biológicas podem constituir uma opção na confirmação diagnóstica desta doença. Por este motivo o objetivo deste estudo foi observar os resultados obtidos e relacionados ao isolamento *in vivo* e *in vitro* do *Toxoplasma gondii* a partir de amostras biológicas de gestantes (n= 13) com sorologia para toxoplasmose e tratadas (ou não) com drogas protocolares, e também avaliar possíveis lesões em placenta destas gestantes. Para a pesquisa foram empregados os seguintes métodos: observação direta ou por concentração das amostras de líquido amniótico, inoculação intraperitoneal em camundongos, inoculação em cultivo celular e análise histopatológica de placenta. Foram observados taquizoítos em forma livre e intracelular, no exame parasitológico direto em todas as amostras de líquido amniótico e de placenta das gestantes. Foi possível observar parasitos em lavado peritoneal e em cérebro de camundongos infectados, a partir da 10^a. passagem, com período de manutenção médio de 55 passagens. Contudo não foram observados cistos em cérebro de camundongo, exceto em um animal que apresentou quadro clínico neurológico. No isolamento *in vitro* foi encontrado uma média de 222 taquizoítos/mL (média 16,7dias), e no período de manutenção com média de 1×10^6 parasitos/mL (5 – 6 meses) e o período de multiplicação ocorreu entre 5 a 12 meses após o inóculo inicial com uma concentração média de $61,5 \times 10^6$ parasitos/mL. Tanto no isolamento *in vitro*, como *in vivo* os parasitos apresentaram um comportamento menos agressivo quando comparados as cepas referência RH de *T. gondii*, provavelmente em função de variáveis como: tratamento protocolar das gestantes, fatores físico-químicos estressantes associados aos procedimentos, atenuação das cepas ao longo das passagens. Nas amostras de placentas por métodos histopatológicos não foram observadas alterações significativas. Os resultados obtidos neste estudo revelaram vantagens e desvantagens das técnicas diretas e serão discutidas neste artigo.

Palavras Chave: Isolamento, *in vitro*, *In vivo*, Análise Parasitológica, Análise Histopatológica

ABSTRACT

Congenital toxoplasmosis may lead to several risk factors to pregnant women; as well as to the foetus. Parasitological direct methods and *Toxoplasma gondii* isolation *in vivo* and *in vitro*, from biological samples may constitute an option to diagnostic determination of this disease. For this reason the aim of this study was to observe related results obtained from *in vivo* and *in vitro* isolation of *Toxoplasma gondii* from biological samples of pregnant women (n= 13) showing serological indication of toxoplasmosis, treated (or not) with protocol therapy and also evaluate lesions in the placenta of these pregnant women. To carry out the research, the following methods were used: direct observation of amniotic fluid samples or direct analysis from the centrifuged samples, intraperitoneal inoculation of mice, cell culture inoculation and histopathological analysis of placenta. Tachyzoites were observed both in free and intracellular forms during direct parasitological method, in all amniotic fluid and placenta samples. Parasites were also observed in peritoneal exsudate from inoculated mice since the 10th intraperitoneal passage, with a maintenance period of 55 passages. Nonetheless, cerebral cysts were not seen in any of the inoculated mice, except in one animal that showed neurological distress. During *in vitro* isolation an average concentration of tachyzoites (222 tachyzoites/mL) in a mean time of 16,7 days was obtained, and during maintenance growth period the average was 1×10^6 parasites/mL (5 – 6 months). The growth (multiplication) period occurred between 5 -12 months, with a initial average concentration of $6,15 \times 10^7$ parasites/mL. Both *in vitro* and *in vivo* isolation the parasites showed a less aggressive behavior when compared to standard RH-*T. gondii* and NC-1-*N. caninum* strains, probably due to several variables like: drugs used in protocol treatment of the pregnant women, physical and chemical stress conditions associated to the technical procedures, strain attenuation during the isolation passages. Significant histopathological alterations were not seen in placental samples. The results obtained in this study revealed advantages and also disadvantages related to the techniques discussed in this article.

Key Words: Isolation, *in vitro*, *in vivo*, Parasitological Analysis, Histopathological Analysis.

INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma doença relacionada a condições imunofisiopatológicas causadas pelo protozoário *Toxoplasma gondii*. Este parasito intracelular, durante o curso da infecção, pode estar presente em fluídos biológicos e em tecidos de humanos imunocompetentes assintomáticos ou sintomáticos, em pacientes imunocomprometidos (oncológicos, HIV positivos e em indivíduos geneticamente imunodeficientes) e no líquido amniótico e placenta de gestantes infectadas (Remington *et al.*, 2001, Abbasi *et al.*, 2003; Campana *et al.*, 2003).

Devido à complexidade do ciclo de vida do *T. gondii* e suas formas de transmissão e patogenicidade, existem métodos diagnósticos estabelecidos e distintos, como: testes sorológicos (imunoenzimáticos), amplificação de seqüências específicas de ácidos nucléicos (PCR), definição do genótipo da cepa isolada por caracterização molecular (RFLP-PCR, seqüenciamento), demonstração histológica do parasito e lesões associadas e o isolamento em animais experimentais (*in vivo*) ou em cultivo celular (*in vitro*) (Remington *et al.*, 2001; Montoya, 2002; Montoya *et al.*, 2004; Montoya & Rosso, 2005).

Métodos parasitológicos servem para evidenciar de forma direta, e a baixo custo, parasitos presentes em amostras biológicas de gestantes com suspeita clínica de infecção toxoplásmica. A demonstração direta do parasito, assim como de cistos ricos em bradizoítos em amostras tissulares ou em coleções líquidas ricas em células, pode ser feita através da inoculação em modelos animais

(isolamento *In vivo* em camundongos *Mus musculus*, não isogênicos – do tipo Swiss Webster) e através da inoculação em cultivo celular (células Vero, padrão ATCC) e permite estabelecer uma boa correlação clínica com a infecção pelo *Toxoplasma gondii* (Derouin, *et al.*, 1988; Daffos *et al.*, 1988; Dubey, 1998,2002; Montoya, 2002).

A observação de taquizoítos em amostras de tecidos corados por métodos convencionais, como hematoxilina e eosina (HE) ou May-Grünwald-Giemsa (MGG) são incomuns. Métodos parasitológicos podem indicar uma infecção pelo *T. gondii* em camadas trofoblásticas da placenta de gestantes infectadas, embora, possa não haver uma evidente correlação entre infecção trofoblástica, assim como lesões e danos, e presença de cistos neste tecido (Garcia, 1995; Montoya, 2002; Abbasi *et al.*, 2003; Rey, 2002; Junqueira, 2004).

Muitas das cepas de *T. gondii* podem ser acistogênicas e animais infectados com amostras clínicas podem não desenvolver cistos cerebrais. A patogenicidade das cepas de *T. gondii* isoladas pode variar conforme o genótipo, influenciando na concentração e nível de crescimento de parasitos, tanto no isolamento e manutenção *in vivo* como *in vitro*. Drogas protocolares (espiramicina, pirimetanina, sulfadiazina) utilizadas para o tratamento das gestantes com diagnóstico de toxoplasmose aguda ou recente, podem reduzir a parasitemia, e com isso diminuir o risco de transmissão transplacentária. Contudo, o compasso de administração das drogas e a fase clínica podem influenciar na eliminação ou não dos parasitos (Peyron *et al.*, 1999; Grigg & Suzuki, 2003; Dardé, 2004).

Parasitos refratários às drogas podem infectar células, tecidos diversos e o feto ao longo da gestação. Recém natos de gestantes tratadas podem

apresentar-se assintomáticos no período pós-natal. Recém-natos de mães infectadas e não tratadas, podem apresentar maiores chances de desenvolver seqüelas observáveis ao parto e nos primeiros meses de vida (Engstrom, 1991; Lopez, 2002; Remington *et al.*, 2001)

Os objetivos do presente trabalho foram:

- Detectar *Toxoplasma gondii* em amostras biológicas de gestantes com sorologia para toxoplasmose e tratadas (ou não) com drogas protocolares.
- Estudar o comportamento e patogenicidade do parasito isolado em modelos de infecção animal (*in vivo*) e em cultivo celular (*in vitro*).
- Avaliar a presença de parasitos em amostras de placenta das gestantes e de tecido cerebral de animais inoculados.

MATERIAL E MÉTODOS

CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS

Foi utilizado, para este estudo, amostras de líquido amniótico e placenta de 13 gestantes sorodagnosticadas para toxoplasmose por métodos imunoenzimáticos automatizados (Capítulo – II) para a realização de exames parasitológicos diretos isolamento *in vivo* (camundongos), *in vitro* (cultivo celular). Amostras foram colhidas entre os anos de 2003 e 2005. Além das amostras de placenta foi colhido uma amostra de sangue periférico anticoagulado de gestante (DAFS) em fase aguda (IgM+/IgG-) e não medicada no momento da coleta, foi processado para isolamento *in vivo* e *in vitro*. Também, no mesmo período, foram

realizadas análises histopatológicas de tecido de placenta das gestantes e de tecido cerebral dos camundongos infectados.

As amostras de LA foram mantidas refrigeradas (2 – 8°C), ao abrigo da luz, até a sua utilização (para isolamento *in vivo* e *in vitro*). O volume coletado de LA variou de 5,0 a 10,0mL, sendo que deste volume, 1,0 a 2,0 mL foi destinado a inoculação *In vivo*, 1,0 – 2,0mL para o isolamento *in vitro*, cerca de 1,0mL para criopreservação em N₂ líquido ou em freezer –80°C, e cerca de 1,0mL destinado a extração de DNA para PCR (Ver- capítulo IV).

As amostras de placenta foram obtidas no pós-parto em centro-cirúrgico do HC-UFPR, mantidas refrigeradas até sua utilização para exames parasitológicos, e uma parte do tecido foi preservada com solução de formol a 10% para análises histopatológicas e coloração com hematoxilina e eosina (HE).

PROCESSAMENTO DA AMOSTRA DE SANGUE ANTICOAGULADO

A amostra de sangue periférico anticoagulada (EDTA – Becton e Dickinson), oriunda de gestante (DAFS) em fase aguda e não medicada no momento da coleta, foi processada para o isolamento de camada leucocitária (*Buffy Coat*) através de centrifugação (3.000rpm, 10 minutos/TA) e gradiente de densidade (Ficoll-Hypaque[®] – Amersham Pharmacia Biotech). Antes do processamento, uma lâmina foi preparada e corada por coloração May-Grünwald-Giemsa, para pesquisa de taquizoítos em microscopia óptica (MO - 200x, 400X e 1.000X). O halo leucocitário foi lavado com solução salina estéril (0,9%) e centrifugado (3.000 rpm, 10 minutos/TA), e o sedimento formado foi ressuspensionado com 1,0mL tampão

PBS (pH = 7,2 / 6°C) e passados em agulha 25X6 *Gauge* para liberar possíveis parasitos. Uma gota da suspensão da camada leucocitária foi observada em microscopia óptica (200x, 400x e 1000X). O volume final da suspensão de leucócitos foi reservado para isolamento *in vivo* (camundongos do tipo Swiss Webster) e *in vitro* (cultivo de células Vero).

CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS EXPERIMENTAIS

Isolamento *in vivo*

Para os experimentos *in vivo* de *T. gondii* foram usados três grupos de animais: O primeiro era constituído de um lote de quatro camundongos em que foram inoculados com tampão PBS (pH = 7,2/6°C, 0,01M estéril, Penicilina Cristalina 25.000UI/mL e Estreptomicina 10mg/mL) para formar um grupo controle negativo (-) ou seja isentos de parasitos.

O segundo lote de animais, também foi constituído de quatro animais e serviu como controle positivo (+). Nestes animais foi inoculado intraperitonealmente taquizoítos da cepa referência de *T. gondii* (cepa – RH), cedida pelo LPM-UFPR e pelo CDME. Os grupos controle foram utilizados como parâmetro de análise em relação as cepas isoladas das gestantes.

O terceiro lote de animais foi inoculado com as amostras obtidas das gestantes. Para a inoculação das amostras foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) do tipo Swiss Webster machos, de cerca de 5 semanas e meia de vida. Os camundongos foram infectados por via intra-peritoneal (IP), com LA (cerca de 0,5mL por inóculo) proveniente das gestantes, e mantidos no biotério do LPM-UFPR e no biotério do CDME. Os animais foram separados em caixas

identificadas por paciente, foram usados quatro camundongos, sendo que dois animais foram inoculados e mantidos para passagens, e dois inoculados para pesquisa de cistos. Todos os animais receberam água e ração comercial à vontade. Os animais foram observados diariamente, quanto a possíveis sinais clínicos de toxoplasmose, como emagrecimento, condições da pelagem, comportamento anormal, tempo de sobrevivência e óbitos.

Após a inoculação da amostra clínica - LA era feita passagem cega a cada dois dias num total de 55 passagens. A ortotanásia dos animais para coleta de líquido da cavidade peritoneal era feita em caixa contendo algodão embebido com clorofórmio-PA da MERCK®. Para a recuperação do líquido peritoneal, foi realizada uma lavagem da cavidade com tampão PBS (pH = 7,2 / 6°C, 0,01M estéril, Penicilina Cristalina 25.000UI/mL e Estreptomicina 10mg/mL) com auxílio de uma seringa de 3 mL, e agulha de 25X6 Gauge. O líquido peritoneal coletado foi transferido para um tubo estéril, e foi centrifugado (2.600 rpm, por cerca de 10 minutos) a 6°C, e o sedimento examinado por microscopia óptica, para analisar a presença de taquizoítos.

À medida que foi possível observar (por microscopia óptica) a presença de taquizoítos livres ou intracelulares, foi iniciada a contagem dos parasitos em câmara de Neubauer, através de diluições com tampão PBS (pH = 7,2/ 6°C, 0,01M estéril, Penicilina Cristalina 25.000UI/mL e Estreptomicina 10mg/mL), para determinar a concentração de parasitos por volume administrado (IP). Os animais infectados para pesquisa de cistos cerebrais, foram sacrificados cerca de 12 a 14 meses após o inóculo inicial, ou quando apresentaram sinais clínicos de toxoplasmose ou quando morriam.

Após a ortotanásia, o cérebro foi removido para pesquisa, a fresco, de cistos ricos em bradizoítos, sendo que para cada hemisfério cerebral, foram preparadas 2 lâminas (com lamínulas), contendo frações de tecido cerebral de regiões distintas. As lâminas foram posteriormente examinadas ao microscópio óptico (Olympus) nos aumentos de 200x, 400x e 1000X. Possíveis cistos encontrados foram mensurados com o auxílio de micrômetro ajustado para objetivas de 20 e 40X e foto documentados em câmera fotográfica (Olympus) acoplada ao microscópio. Filmes digitais (câmera Sam Sung-SDC-310/Programa Image Tool) foram realizados a partir de suspensões cerebrais com tampão PBS (pH = 7,2 / 6°C, 0,01M estéril, Penicilina Cristalina 25.000UI/mL e Estreptomicina 10mg/mL) e solução de Azul de Tripán à 10%.

Isolamento *in vitro*: em cultivo celular (células vero – referência ATCC)

As alíquotas de LA, provenientes das gestantes, foram observadas ao microscópio óptico, antes e após a obtenção de sedimento por centrifugação (2.600 rpm, por cerca de 10 minutos, 6°C), para observação da presença e morfologia dos taquizoítos (intra e extracelulares).

As amostras (cerca de 1,0mL), foram posteriormente inoculadas em frascos de Roux de poliestireno de 25cm², contendo meio de cultura MEM (5,0mL de meio essencial mínimo de *Eagle* pH= 7,4 – cor vermelha, e ajustada com bicarbonato de sódio a 7,5%, suplementado com soro fetal bovino a 10%, 10% de caldo triptose fosfato, 100 U/mL de penicilina G potássica, 100 µg/mL de sulfato de de estreptomicina e 1,25 µg/mL de anfotericina B) e tapete de células Vero

(células de rim de macaco verde da África, com identificação CCL-81, no catálogo da ATCC), onde a concentração de células no frasco de 25cm² com 5,0mL de MEM era 1,5X10⁶ células/mL (equivalente a 1 parasito/ célula). O tempo médio para formação de monocamada de células (previamente a inoculação) foi de 48 horas.

Para evitar eventuais contaminações prévias a inoculação do LA, uma amostra do meio de *Eagle* foi submetida a um caldo para crescimento bacteriano (BHI – cérebro-coração) por 72 horas, à 37°C, para detectar eventuais contaminações bacterianas.

Após a inoculação do LA em cultivo celular, os frascos de Roux foram incubados em estufa de CO₂ à 37°C (cerca de 16 horas). Para a manutenção do cultivo celular com os parasitos, o meio de *Eagle* foi substituído 1 ou 2 vezes por semana.

Os frascos foram examinados diariamente em microscópio invertido (Olympus), para acompanhar o comportamento das cepas isoladas. A cada observação, foi analisado a presença de efeitos citopáticos na camada celular induzidos pelos parasitos e a presença de taquizoítos em forma livre ou intracelular.

A manutenção do cultivo celular ocorreu ao longo do recebimento de amostras de LA. Após o período de isolamento e manutenção, os parasitos foram mantidos em cultivo para multiplicação, permitindo avaliar a patogenicidade e crescimento das cepas em relação aos grupos controle.

A cepa (RH-*T. gondii*) foi processada nas diluições: 1:2, 1:5, 1:10.1:20 , e a cepa (NC-1 – *N. caninum*) nas diluições 1:5 e 1:10. Os isolados obtidos a partir

de LA das gestantes e de sangue de paciente em fase aguda (IgM+/IgG-) foram diluídos a 1:2, e 1:2 e 1:5. As células Vero utilizadas para o isolamento, manutenção e crescimento dos parasitos, apresentaram uma variação de passagens (1 – 2 vezes/semana) entre 40 – 100 (dependendo da disponibilidade do Banco de Células do CDME). As passagens e trocas de meio foram realizadas periodicamente, em função da multiplicação dos parasitos e dos efeitos na monocamada de células Vero. O local de processamento de amostras, inoculação e passagens foi realizado no laboratório de cultivo celular do CDME, e todas as etapas foram realizadas em fluxo laminar linear vertical, de maneira asséptica.

CULTIVO DE CEPAS REFERÊNCIAS DE *Toxoplasma gondii* (RH) e *Neospora caninum* (NC-1).

As cepas RH de *T. gondii* e NC-1 de *N. caninum* utilizadas eram provenientes do LPM-UFPR e do CDME. As cepas foram, de maneira separada, cultivadas em meio MEM contendo células Vero, para servirem de padrão controle em relação as cepas isoladas de gestantes. Os cultivos foram mantidos em incubação em estufa de CO₂ à 37°C. O meio de Eagle foi substituído de 1 ou 2 vezes por semana. De acordo com a destruição do tapete de células Vero, realizou-se as passagens dos parasitos para outras garrafas.

Estas cepas referências foram também utilizadas para extração de DNA, e serviram como controle para a realização da PCR (Capítulo IV). O DNA da cepa RH foi utilizada como controle positivo e o DNA da cepa NC-1 como padrão para

avaliar a especificidade da reação. A cepa NC-1 (Howe *et al.*, 1997) foi utilizada no isolamento *in vitro*, para servir de parâmetro comparativo com a cepa RH e com as cepas isoladas, uma vez que o *Neospora caninum* apresenta o ciclo de vida e morfologia próximos do *T. gondii*.

COLORAÇÃO POR MAY-GRÜNWARD-GIEMSA: Isolamento *in vitro* e *in vivo*

Ao longo das passagens dos parasitos nos cultivos celulares e do líquido da cavidade intraperitoneal dos camundongos, foram obtidas alíquotas dos sedimentos formados após centrifugação (2.600 rpm, por 10 minutos à 6°C) e foram preparadas lâminas a partir de extensões do sedimento obtido. As extensões foram secas ao ar (TA) e posteriormente coradas pelo método de coloração de May-Grünwald-Giemsa (Rey, 2002; Junqueira *et al.*, 2004).

CRIOPRESERVAÇÃO DAS CEPAS ISOLADAS *In vivo* e *In vitro*

Alíquotas obtidas (durantes as passagens) das cepas isoladas em cultivo celular e de líquido peritoneal dos camundongos inoculados, foram criopreservadas em *containers* contendo N₂ líquido. O meio de criopreservação foi preparado com 50% de MEM, 40% de soro albumina bovina e 10% do criopreservante - dimetil sulfoxido (DMSO – MERCK®). As suspensões celulares foram transferidas para tubos de criopreservação de polipropileno (Nunc® - GIBCO) e submetidas a resfriamento progressivo em freezer (-70°C / 24h), e

posteriormente os tubos foram acondicionados em suportes metálicos (*racks*) e inseridos nos *containers* de nitrogênio líquido (-196°C/ por tempo indefinido).

PREPARO DAS AMOSTRAS DE PLACENTA PARA HISTOPATOLOGIA

As placentas das gestantes utilizadas neste estudo foram macroscopicamente analisadas e pesadas, logo após o parto (n= 13) e fragmentos de porções aleatórias foram obtidas para análise a fresco (pesquisa de parasitos no sangue e em fluídos) e também fragmentos foram preservados em formol a 10% para histopatologia.

Os fragmentos para análise a fresco, foram preservados em refrigeração (2 - 8°C) e lâminas com fluído proveniente da placenta fracionada foi observado ao microscópio óptico (400, 1000X, MO. Olympus) para presença de parasitos livres ou intracelulares. O método de coloração para registro fotográfico e filmagem digital foi feito com Azul de Tripán (10%) e tampão PBS (pH = 7,2 / 6°C, 0.01M, Penicilina Cristalina, 25.000 UI/mL e Estreptomicina 10mg/mL).

Os tecidos (placenta de gestante e cérebro de camundongo infectado) foram cortados com espessura de 5 mm e fixados em álcool 70% por 24h e então transferidos para o formol a 10%. Estes foram desidratados em bateria crescente de álcool, diafanizados em xilol e impregnados e emblocados em parafina quente. Foram realizados dez cortes histológicos de cérebro e de placenta com 5 µm de espessura em cada experimento com o objetivo de detectar formas de *T. gondii*,

ou lesões teciduais. A coloração empregada foi a hematoxilina eosina (HE), (Rey, 2002; Junqueira *et al.*, 2004).

RESULTADOS

ISOLAMENTO DE PROTOZOÁRIOS

Os parasitos foram isolados das amostras de LA, oriundos das 13 gestantes submetidas à amniocentese, por dois métodos: *in vivo* e *in vitro*. Os protozoários foram inicialmente observados diretamente das amostras, e em sedimento suspenso (contendo células de descamação fetal) em 1,0 mL de tampão PBS (pH= 7,2 / 6°C) pós centrifugação (Tabela – 1).

Tabela - 1: Presença de Taquizoítos de *Toxoplasma gondii* (+) em amostra de líquido amniótico ricas em células de descamação fetal (LA) em suspensão direta e suspensão de sedimento pós-centrifugação (Microscopia óptica: 200, 400 e 1000X).

Amostras Gestantes	LA	LA – Sedimento (2600 rpm/10min/6°C) Extracelular	LA – Sedimento (2600 rpm/10min/6°C) Intracelular (células de descamação fetal)
1-LSL	-	+	+
2-DAFS	+	+	++
3-YBL	+	+	+
4-SCSO	-	+	++
5-DCO	-	+	+
6-CSL	-	+	+
7-EKSM	-	+	++
8-JGG	+	+	++
9-IS	-	+	+
10-ARP	-	+	++
11-EPS	+	+	+
12-KCB	-	+	++
13-ERJ	-	+	++

(-) Não foram observados Taquizoítos , (+ , ++) – Presença de Taquizoítos : Forma Livre ou Intracelular (em Células de Descamação do Feto)

Os taquizoítos foram também observados em forma livre e na forma intracelular nas amostras de placenta, no exsudato de cavidade peritoneal de camundongos do tipo Swiss Webster infectados (ao longo das passagens intra-peritoneais), e também nos camundongos infectados para pesquisa de cistos cerebrais.

Isolamento *in vivo*

Amostras de LA das gestantes (n= 13) foram inoculadas por via intraperitoneal em camundongos do tipo Swiss Webster. Durante as passagens intraperitoneais os parasitos foram observados em média a partir da 10^a passagem. O número realizado de passagens IP em camundongos foi 55, e a média das concentrações de parasitos ao longo das passagens encontra-se expressa na Figura 1 e na Tabela 2.

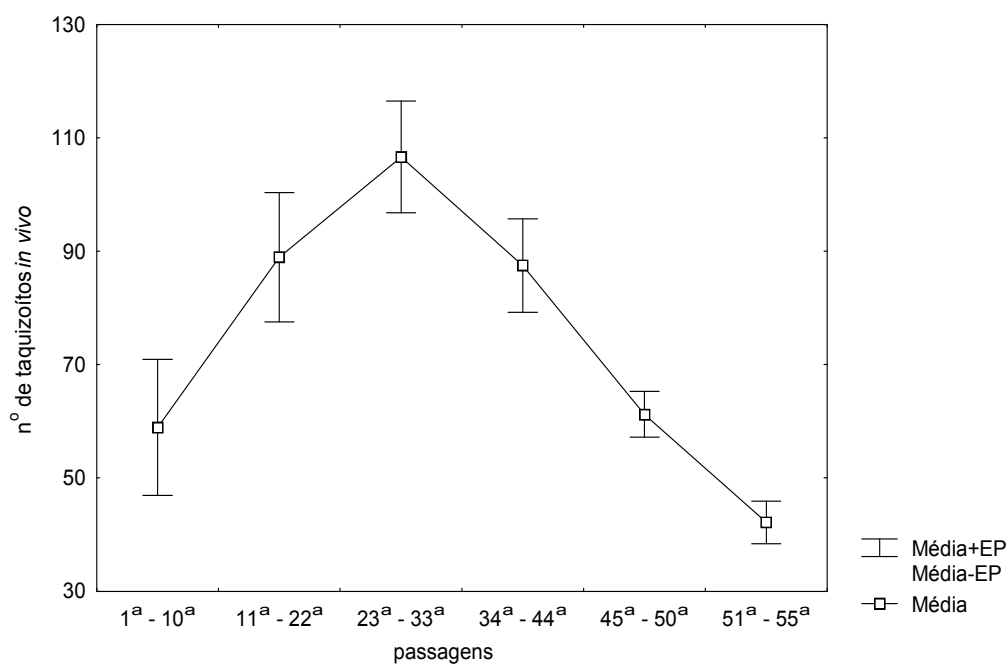


Figura 1: Concentração média de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* (por mL), da 1^a a 55^a passagem intraperitoneal (IP) em camundongos Swiss Webster infectados com amostras de líquido amniótico (LA) de gestantes com indicação sorológica de toxoplasmose.

Tabela – 2: Concentração de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* durante as 55 passagens intraperitoneais em camundongos submetidos a infecção com amostras de líquido amniótico de gestantes (n= 13) com indicação sorológica de toxoplasmose.

Animais	1 ^a .-10 ^a	11 ^a . – 22 ^a .	23 ^a . – 33 ^a .	34 ^a . – 44 ^a .	45 ^a . – 55 ^a .	51 ^a . – 55 ^a .
Inoculados	passagem(conc.	passagem(conc.	passagem(conc.	passagem(conc.	passagem(conc.	passagem(conc.
IP	Parasitos/mL)	Parasitos/mL)	Parasitos/mL)	Parasitos/mL)	Parasitos/mL)	Parasitos/mL)
Cdg-01	60	80	100	75	55	30
Cdg-02	180	200	220	180	100	78
Cdg-03	40	60	100	70	45	28
Cdg-04	50	60	88	78	64	42
Cdg-05	78	110	100	79	58	44
Cdg-06	20	60	98	88	54	42
Cdg-07	40	76	98	78	56	40
Cdg-08	98	140	120	108	78	56
Cdg-09	20	58	82	68	48	26
Cdg-10	40	78	88	72	58	42
Cdg-11	50	78	106	82	68	46
Cdg-12	20	58	84	70	50	32
Cdg-13	70	98	102	89	62	42
[] Média - Parasitos/ mL	58,9	88,9	106,6	87,5	61,2	42,1

Os taquizoítos observados ao microscópio óptico (200, 400 e 1000X) apresentavam comportamento e morfologia “bradizoíto-like”, embora fossem encontrados também formas clássicas de taquizoítos com movimentos braunianos (Figuras 2 A e B).

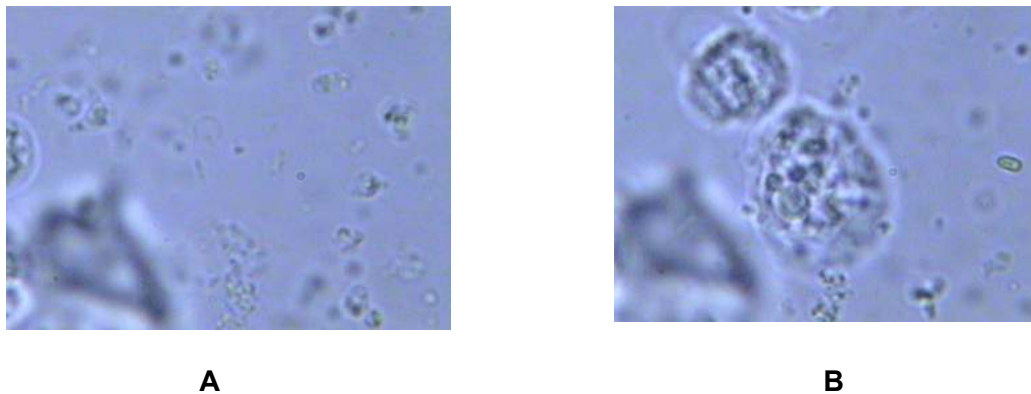


Figura 2: A e B: Taquizoítos de *Toxoplasma gondii* isolados de exsudato peritoneal de camundongos do tipo Swiss Webster infectados com amostras de líquido amniótico de gestantes. Formas: extracelulares e intracelulares (coloração de fundo: Azul de Tripán 10%)-câmera e filmadora Sam Sung-SDC- 310/Programa Image Tool. (Aumento: 400X e 1000 X).

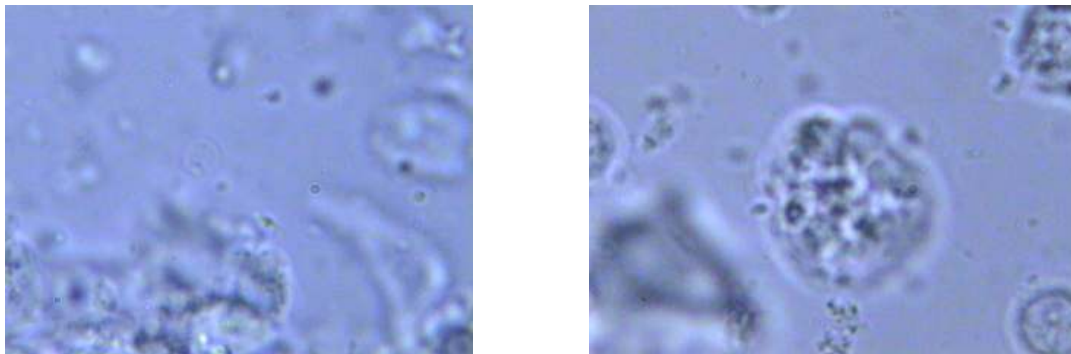
**A****B**

Figura- 3 A e B: Taquizoítos de *Toxoplasma gondii* extra e intracelulares de exsudato peritoneal (aumento: 400 e 1000 X) de camundongo inoculado com camada leucocitária de gestante em fase aguda. (câmera e filmadora: Sam Sung-SDC-310/Programa Image Tool)

A concentração de parasitos apresentou uma variação entre 2×10^3 e $1-2 \times 10^4$ entre a 5^a. e 7^a. passagem IP. Um dos camundongos utilizado nas passagens veio a óbito na 22^a. passagem IP com sinais clínicos de toxoplasmose

O cérebro deste camundongo foi removido e processado para observação de parasitos e cistos. Foi observado a presença de parasitos extracelulares em suspensão (PBS pH = 7,2 / 6°C + antibióticos) macerada de tecido cerebral (MO 1000 X) e um cisto observado a fresco por microscopia óptica em aumento de 1.000X (Figuras 4 A e B).

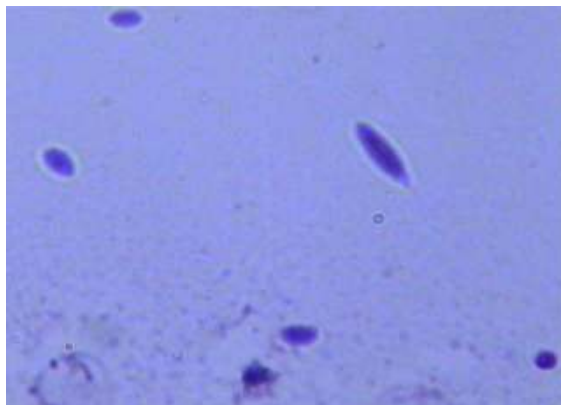


Figura 4 A – Taquizoítos de *Toxoplasma gondii* em suspensão de cérebro (extensão) de camundongo infectado com suspensão leucocitária isolada de sangue de gestante em fase aguda de infecção. (microscopia óptica – 1000X, imagem fotodigitalizada e filmada - câmera Sam Sung-SDC-310/Programa Image Tool).



Figura 4 B – Cisto de *Toxoplasma gondii* encontrado em camundongo inoculado com camada leucocitária de sangue de gestante em fase aguda de infecção (Pesquisa em corte histológico, aumento : 1000X, imagem fotodigitalizada e filmada - câmera Sam Sung-SDC-310/Programa Image Tool).

Isolamento *in vitro*

Os parasitos isolados em cultivo celular apresentaram crescimento lento em relação à cepas referências (RH-*T. gondii* e NC-1-*N. caninum*) no período de isolamento (média de 16,7 dias) Figura 5. No período de manutenção (média = 5,6 meses) a concentração média foi 1×10^6 parasitos/mL (Figura 6). O período de

multiplicação foi observado entre 5 à 12 meses após o inóculo inicial com uma concentração média de $6,15 \times 10^7$ parasitos/mL (Figura 7). A amostra de camada leucocitária, obtida de gestante isenta de medicação protocolar quando em fase aguda de infecção (IgM+/IgG), apresentou características mais agressivas ao longo das passagens (Tabelas 3 e 4).

Tabela – 3: Isolamento, manutenção e crescimento de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* em cultivo de células Vero, obtidos de amostras de líquido amniótico (n= 13) e camada leucocitária (n= 1) de gestantes com indicação sorológica de toxoplasmose (diluição utilizada – 1:2)

Amostras	Isolamento/	[] Taq	Manutenção	[]	Diluições	Crescimento/	[] Final
	Dias	/ mL	Meses	1×10^6 Taq/mL		Meses	1×10^6 Taq/mL
		Isolamento		Manutenção			
1- LSL (LA)	20	200	5	< 1	1:2	10	56
2- DAFS (LA)	14	250	4	>1	1:2	8	76
3- YBL (LA)	16	210	6	>1	1:2	12	60
4- SCSO (LA)	16	220	5	>1	1:2	10	62
5- DCO (LA)	16	256	6	< 1	1:2	12	59
6- CSL (LA)	18	245	6	< 1	1:2	10	60
7- EKSM (LA)	18	246	6	1	1:2	10	62
8- JGG (LA)	16	270	6	>1	1:2	10	65
9- IS (LA)	15	190	5	1	1:2	12	56
10- ARP (LA)	20	200	6	>1	1:2	10	60
11- EPS (LA)	18	210	6	1	1:2	10	59
12- KCB (LA)	15	200	5	>1	1:2	10	62
13- ERJ (LA)	16	190	8	1	1:2	12	57
2- DAFS (Sg)	9	450	4	80	1:2	-	-

(LA)- líquido amniótico, (Sg) – sangue, mL – mililitros, [] – concentração, Taq.- taquizoítos

Tabela – 4: Concentração de taquizoítos das cepas referência RH (*T. gondii*) e NC-1 (*N. caninum*) em cultivo de células Vero em meio de Eagle (MEM).

Cepas referência [] Inicial: 1×10^6 /mL	Diluição (Meio de Eagle)	[] pós 10 dias 1×10^6 /mL
RH – <i>T. gondii</i>	1:2	80
RH – <i>T. gondii</i>	1:5	76
RH – <i>T. gondii</i>	1:10	59
RH – <i>T. gondii</i>	1:20	48.5
NC-1- <i>N. caninum</i>	1:5	70
NC-1- <i>N. caninum</i>	1:10	58

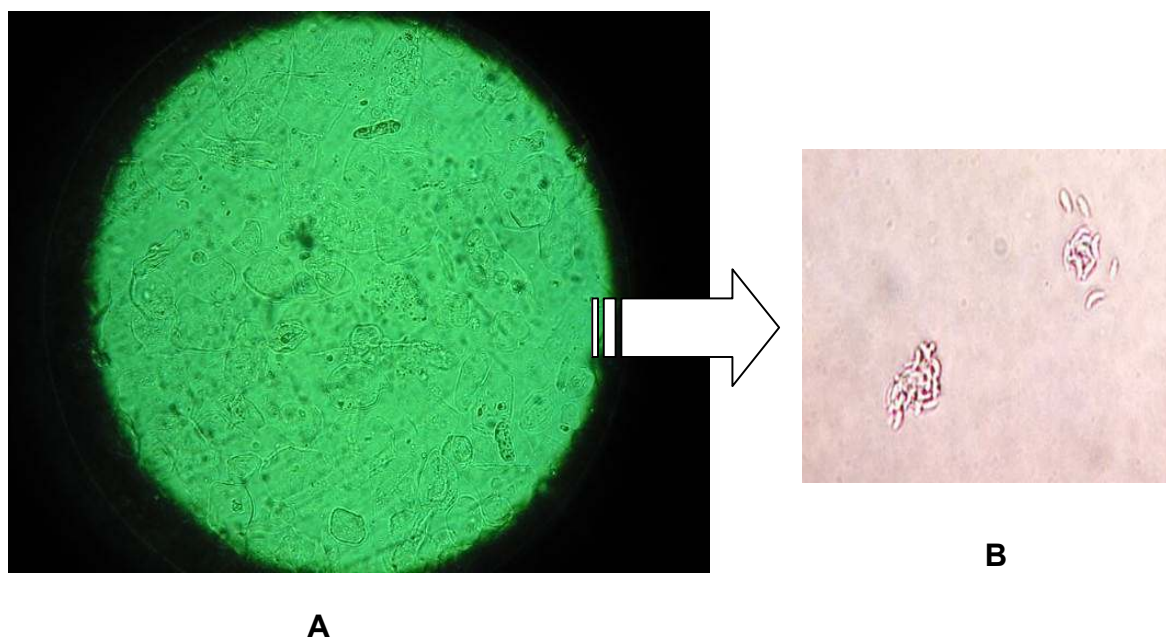


Figura 5 A e B: Taquizoítos de *Toxoplasma gondii* em cultivo de células Vero em período de isolamento. Amostra de líquido amniótico com parasitos livres e no interior de células de descamação fetal. (A: Fotomicrografia em Microscópio de Campo Invertido – Olympus aumento 400X, B: Fotomicrografia em microscópio óptico em aumento de 1000 X).

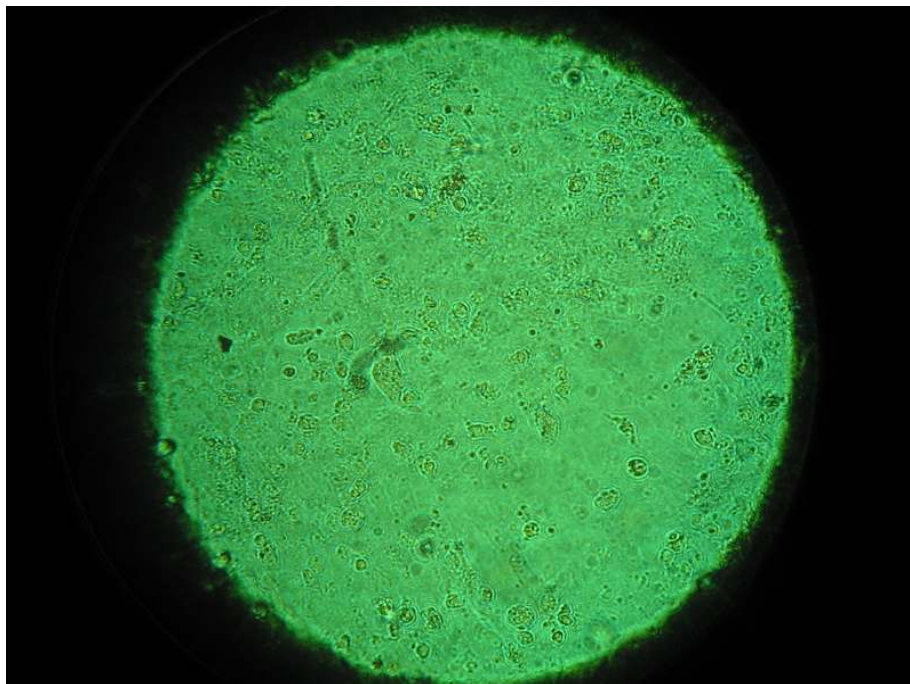


Figura 6: Monocamada de células Vero infectada com cepa de *Toxoplasma gondii* isolada de líquido amniótico de gestante com indicação clínica e laboratorial para Toxoplasmose (fase recente de Infecção). Período de Manutenção (concentração > 1×10^6 parasitos/mL). Fotomicrografia – Microscópio de Campo Invertido direto em frasco de Roux 25cm² (aumento 400X).

Após o estabelecimento do cultivo celular foi observado o comportamento das cepas em relação ao tapete de células Vero, que compreendeu desde a primeira observação de protozoários em cultivo, até as transferências periódicas para novos frascos de Roux.

No período de manutenção o comportamento e crescimento das cepas padrão RH - *T. gondii* e NC-1 - *N. caninum* e das cepas isoladas de LA e sangue (camada leucocitária) foi variado, nas diluições utilizadas, e está descrito na Tabela 5 e Figura 8.

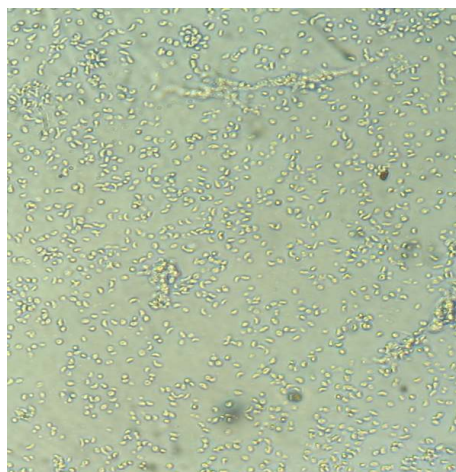


Figura 7: Fotomicrografia de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* (microscópio de campo invertido 400X) no período de multiplicação dos parasitos em cultivo de células Vero com uma concentração média final de $6,15 \times 10^7$ parasitos/mL (10 Meses pós-inóculo inicial de amostra de líquido amniótico).

Tabela - 5: Características de cultivos celulares a partir de cepas de *Toxoplasma gondii* isolados de líquido amniótico, sangue periférico anticoagulado de pacientes gestantes, e de cepa referência RH de *Toxoplasma gondii* e de NC-1 de *Neospora caninum*.

Cepas de Protozoários	Diluições Empregadas	Frequência (dias)	Freq. Média (dias)	Crescimento das Cepas
RH- <i>T.gondii</i>	1:2	5-10	7,5	Rápido
RH- <i>T.gondii</i>	1:5	10	10	Rápido
RH- <i>T.gondii</i>	1:10	10-12	11	Intermediário
RH- <i>T.gondii</i>	1:20	12-18	15	Intermediário
NC-1- <i>N.caninum</i>	1:5	5-7	6	Rápido
NC-1- <i>N.caninum</i>	1:10	10-12	11	Intermediário
Gest.01 (LA)	1:2	10-12	11	Lento
Gest.02 (LA)	1:2	5-10	7,5	Lento
Gest.02 (Sg)	1:2	5-10	7,5	Rápido
Gest.02 (Sg)	1:5	10	10	Intermediário
Gest.03 (LA)	1:2	5-10	7,5	Lento
Gest.04 (LA)	1:2	5-10	7,5	Lento
Gest.05 (LA)	1:2	7-10	8,5	Lento
Gest.06 (LA)	1:2	10-12	11	Lento
Gest.07 (LA)	1:2	5-10	7,5	Lento
Gest.08 (LA)	1:2	7-10	8,5	Lento
Gest.09 (LA)	1:2	5-10	7,5	Lento
Gest.10 (LA)	1:2	10-12	11	Lento
Gest.11 (LA)	1:2	7-10	8,5	Lento
Gest.12 (LA)	1:2	7-10	8,5	Lento
Gests.13 (LA)	1:2	5-10	7,5	Lento

Freq.- Frequência. Diluições realizadas para sedimento de parasitos obtidos de Frasco de Roux durante a manutenção dos cultivos. Frequência – intervalo de tempo entre inoculações em cultivo e a recuperação de parasitos (livres /intracelulares)

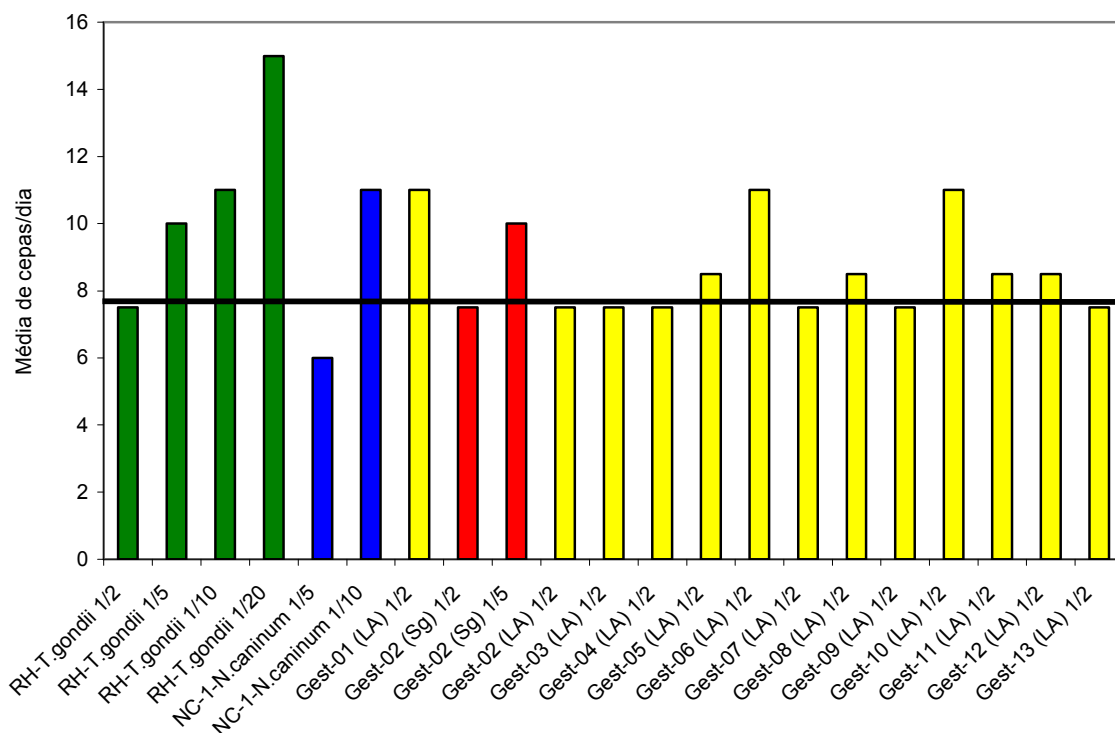


Figura 8: Comportamento dos isolados de amostras clínicas e de cepas referência (RH-T. *gondii* e NC-1- *N. caninum*, estabelecidas em cultivo celular e suas respectivas diluições.

Cepas Isoladas de Placenta

Placentas obtidas de mulheres gestantes (n = 13) incluídas no protocolo deste estudo, foram obtidas na maternidade do HC-UFPR (n = 11), na MNSF (n= 1) e no HNSG (n= 1). Fragmentos aleatórios foram obtidos para pesquisa parasitológica do tecido, sangue e fluídos, assim como para análises histopatológicas. Foi observado em MO (400 e 1000X) no sangue e em fluídos das placentas (100 %) a presença de parasitos na forma livre e intracelular (Figuras 9 A e B).

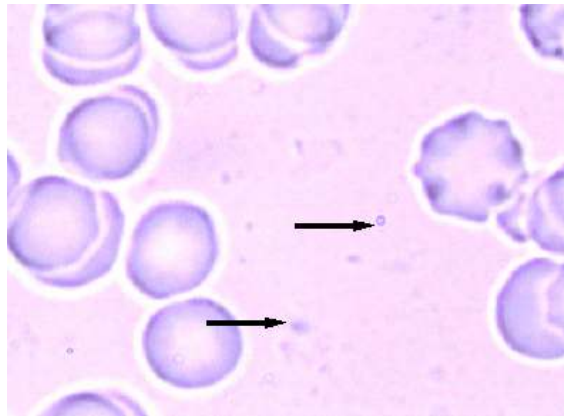


Figura 9 A: Formas extracelulares de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* isolados de sangue e fluido de placenta, de gestante no pós parto. Imagens digitalizadas (microscopia óptica, aumento - 1000X, câmera Sam Sung-SDC-310/Programa Image Tool)

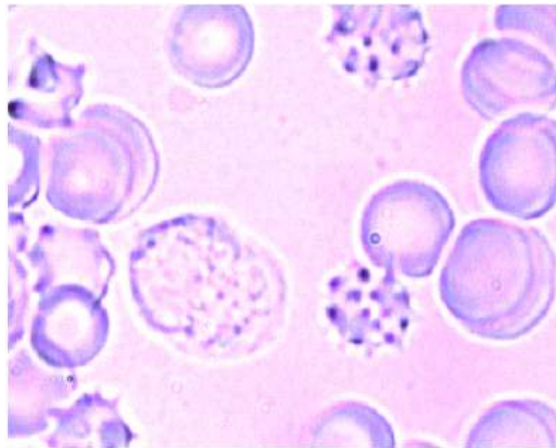


Figura 9 B: Formas intracelulares de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* isolados de sangue e fluido de placenta, de gestante no pós parto. Imagens digitalizadas (microscopia óptica, aumento - 1000X, câmera Sam Sung-SDC-310/Programa Image Tool).

Uma filmadora (Sam Sung-SDC-310) foi acoplada ao microscópio e a computador para obtenção de imagens digitalizadas (Programa Image Tool) dos parasitos nestas amostras biológicas. Foi também possível a coleta de duas amostras de sangue de cordão (EPS e KCB) (Figura 10 A e B), que apresentaram também taquizoítos intra e extracelulares em microscopia digital.

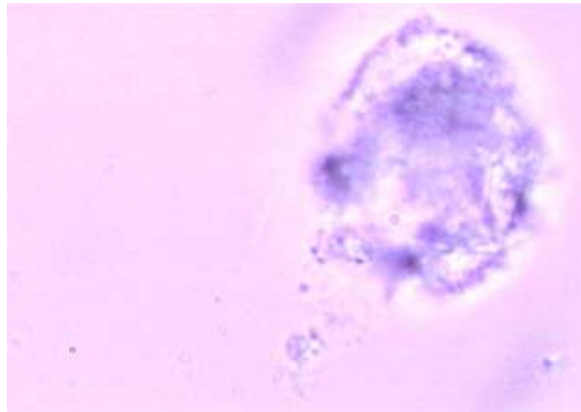


Figura 10 A: Imagem de amostra de sangue de cordão umbilical, obtido logo após o parto (da gestante EPS). Presença de taquizoítos livres e intracelulares. Imagem obtida por microscopia óptica em aumento de 400 e 1000X e sistema digital associado a computador (câmera Sam Sung-SD 310/Programa Image Tool. (Amostras em suspensão com meio de Eagle).

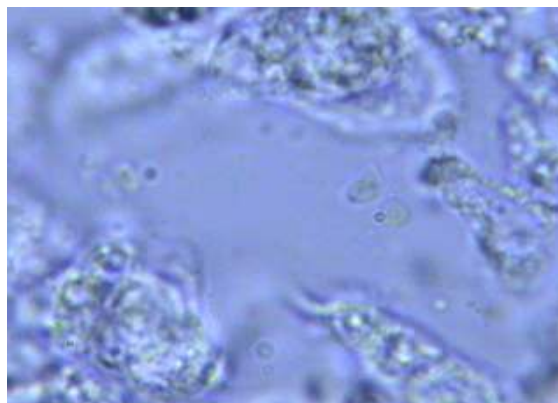


Fig. 10 B: Imagem de amostra de sangue de cordão umbilical, logo após o parto (gestante KCB). Presença de taquizoítos livres e intracelulares. Imagem obtida por microscopia óptica em aumento de 400 e 1000 X e sistema digital associado a computador (câmera Sam Sung-SDC-310/Programa Image Tool). Fundo Azul (Azul de Tripan 10%).

Cepas Isoladas em Cérebro de Camundongos do Tipo Swiss Webster

O tempo para o desenvolvimento de cistos em cérebro de camundongo inoculados com camada leucocitária de gestante com toxoplasmose aguda foi de 12 a 14 meses. Não houveram óbitos observados ao longo do período. Os camundongos foram submetidos a ortotanásia, e os cérebros foram observados a

fresco, após processamento (maceração em almofariz com pistilo de porcelana, com PBS ou MEM a 6°C) ou submetidos a cortes histológicos e corados por HE.

Em todas as suspensões de tecido cerebral (100%), foram vistos parasitos em forma livre, observados em lâmina e lamínula (200,400 e 1000X) (Figura12).

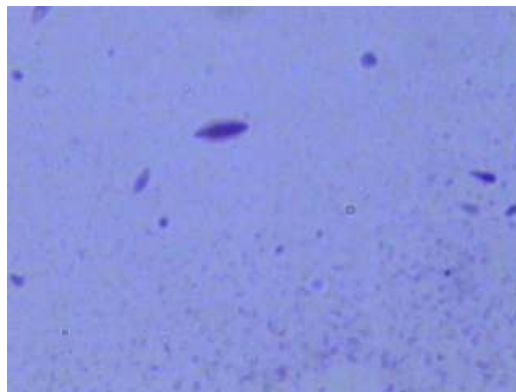


Figura 11 - Taquizoítos observados em extensão de suspensão de tecido cerebral de camundongos infectados, destinados a pesquisa de cistos cerebrais (Imagem digital em aumento - 1000X, câmera Sam Sung-SDC-310/Programa Image Tool).

Aparentemente não foram observadas formas clássicas de cistos com bradizoítos na suspensão de tecido cerebral, nem em cortes de tecido cerebral em lâmina e lamínula. Foram vistos pseudo-cistos em três amostras de cérebro de camundongos infectados com amostras de LA das gestantes (JGG, ERJ e EPS) (Figura 12).

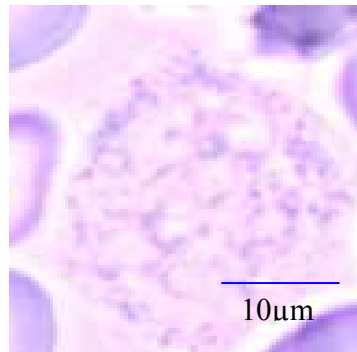


Figura 12: Pseudo-cistos de *Toxoplasma gondii* (10µm) observados em cortes de tecido cerebral de camundongos infectados, e destinados a pesquisa de cistos cerebrais. (microscopia óptica - 1000 X- digitalizada - câmera Sam Sung-SDC-310/Programa Image Tool). Corte em MEM e Azul de Tripán 10% / 6°C.

ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS

Placenta

Placentas obtidas no pós-parto de gestantes (n = 13) com indicação clínica e laboratorial de toxoplasmose foram pesadas e avaliadas macroscopicamente no pós-parto, e submetidas a análises histopatológicas (Tabela 6).

Em amostras de fluído e sangue de fragmentos frescos das placentas analisadas, foi observado a presença de parasitos em forma livre e intracelular.

Em amostras preservadas e processadas para análises histopatológicas, não foram observadas lesões clinicamente significativas em lâminas coradas com hematoxilina e eosina contendo fragmentos aleatórios de porções de placenta (Fig. 13 A e B).

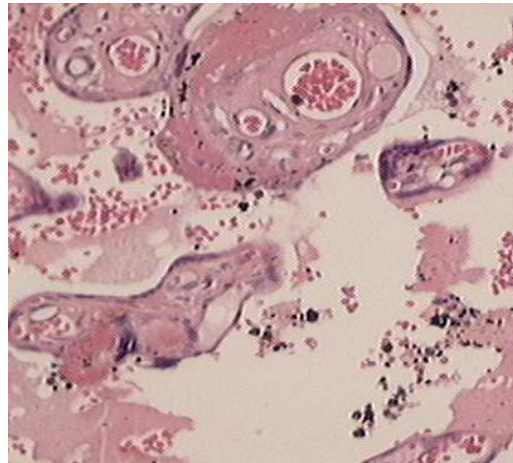


Figura 13 A: Fotomicrografia de corte histológico de placenta da gestante (ERJ) em coloração hematoxilina e eosina (HE) em aumento de 1000X, microscópio óptico - Olympus. Alguns pontos enegrecidos (necróticos) na área de cordão umbilical e vasos hiperêmicos, e perda de massa de tecido conjuntivo.

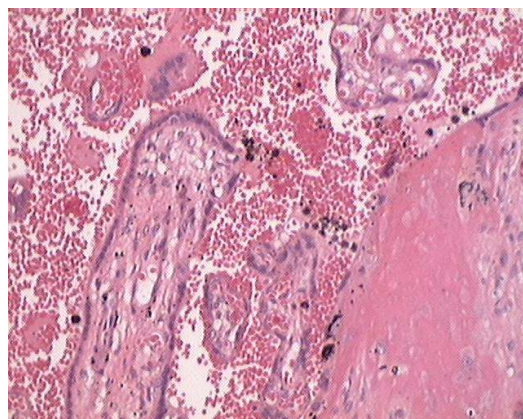


Figura 13 B: Fotomicrografia de corte histológico de placenta da gestante (DAFS) em coloração hematoxilina e eosina (HE) (aumento de 1000X, microscópio óptico - Olympus). Alguns pontos enegrecidos (necróticos) e áreas hiperêmicas.

Cérebro de Camundongos do Tipo Swiss Webster

Foram observados cortes histológicos dos hemisférios cerebrais dos camundongos infectados para pesquisa de cistos e parasitos. As lâminas preparadas para as análises de histopatologia e corados por HE, não revelaram a presença de cistos cerebrais, nem a presença de parasitos no tecido.

Tabela 6 - Avaliação macroscópica e histopatológica de placentas de gestantes com diagnóstico clínico e laboratorial de toxoplasmose

Gestantes n= 13	Placenta / Peso em g	Placenta / Avaliação Macroscópica	Placenta / Exame a Fresco – Presença de Parasitas (Sg/Fluidos)	Placenta / Avaliação Histopatológica (Coloração-HE)	Histopatologia
1- LSL	290	Discóide, SAM Cordão-38cm	++	SAHCS	NOP
2- DAFS	310	Ovoide, Disforme Cordão – 44cm	++	Presença de áreas de necrose (nas lâminas)	NOP
3- YBL	360	Discóide,SAM Cordão – 46cm	+	Poucos pontos enegrecidos, aspecto normal SAHCS	NOP
4- SCSO	310	Discóide,SAM Cordão – 44cm	+		NOP
5- DCO	340	Discóide,SAM Cordão-44 cm	+	com poucos pontos necróticos e característica sangiogências.	NOP
6- CSL	400	Disforme Cordão –58 cm	++	algumas áreas calcificação, aspecto normal	NOP
7- EKSM	760	Discóide,SAM Cordão – 59 cm	++	algumas áreas de calcificação e vasos hiperêmicos	NOP
8- JGG	610	Disforme Cordão – 44 cm	++	algumas áreas de calcificação, índice angiogênico periférico e áreas de necrose e pigmentos de hemosiderina	NOP
9- IS	380	Ovóide,SAM Cordão – 46 cm	+	pontos enegrecidos abundantes junto às hemácias do cordão	NOP
10- ARP	520	Ovóide,SAM Cordão – 31cm	++	áreas com pontos enegrecidos, presença de ponto marrom, diferenciado e circulado	NOP
11- EPS	340	Cordiforme,SAM Cordão – 30 cm	++	SAHCS	NOP
12- KCB	505	Discóide,SAM Cordão – 45 cm	++	alguns poucos pontos negros, (necróticos?)	NOP
13- ERJ	600	Ovoide,SAM Cordão – 55 cm	++	alguns pontos enegrecidos na área de cordão umbilical, vasos hiperêmicos	NOP

cm: centímetros, g: gramas, HE: hematoxilina e Eosina, SAM: sem alterações macroscópicas, Sg: sangue, SAHCS: sem alterações histológicas clinicamente significativas, NOP: não observados parasitos.

DISCUSSÃO

Das 13 amostras de LA somente 3 (23,0%) apresentaram parasitos (forma livre) em suspensão direta, contudo em baixa concentração ($<1 \times 10^2$ parasitos/mL), e 100% das amostras centrifugadas apresentaram formas intracelulares (interior de células de descamação do feto) e extra-celulares (taquizoítos) e a concentração também foi baixa, variando entre $< 1 \times 10^2$ a 1×10^2 .

Amostras de cérebro de camundongo, placenta e fluídos também apresentaram parasitos em formas livres e intracelulares, quando observados a MO. A morfologia dos parasitos observados, em sua maioria, apresentavam-se como taquizoítos, contudo formas *bradizoíto-like*, foram observadas em forma livre e intracelular.

No isolamento em camundongos, os parasitos foram observados, em média, a partir da 10^a. passagem intraperitoneal, sendo que a média de passagens foi 55, e a concentração média de parasitos/mL por passagem foi: 1^a – 10^a (58,9 - *range*: 20 a 180), 11^a a 22^a (88,9 – *range*: 58 a 200), 23^a a 33^a (106,6 – *range*: 82 a 220), 34^a a 44^a (87,5 – *range*: 68 a 180), 45^a. a 50^a (61,2 – *range*: 45 a 100), 51^a a 55^a (42,1 – *range*: 28 a 78).

A baixa concentração de parasitos e o comportamento menos agressivo em primeira observação, e durante as passagens intraperitoneais poderia estar relacionados a uma série de variáveis, como: influência da medicação administrada as gestantes, genótipo do hospederio, influência da imunidade inata

e adaptativa, carga infectante e via de infecção iniciais (Coppens *et al.*, 2001; Dardé, 2004).

Além destes fatores, podem estar envolvidos fatores estressantes físico-químicos, quanto da coleta, armazenamento e processamento da amostra previamente ao isolamento *in vivo*, como: temperatura de conservação (2 – 8°C), ação mecânica para obtenção da amostra, oscilação de pH durante a conservação e processamento, meio de preservação e cultura com fatores potencialmente inibidores do parasito (Visvesvara *et al.*, 2002). Estes fatores possivelmente justifiquem o crescimento lento durante a manutenção das cepas durante as passagens, com pico de crescimento entre a 22^a e 33^a passagem, até o declínio progressivo da contagem de parasitos a partir da 34^a passagem, o que difere da manutenção observada em cepas RH de *T. gondii* descrita em literatura (Dubey *et al.*, 1998).

Os parasitos isolados a partir de camada leucocitária de gestante em fase aguda e não medicada (DAFS), apresentaram morfologia, comportamento e crescimento mais rápido em exsudato peritoneal do que nas cepas isoladas de LA, contudo menos agressivo em relação à cepa referência de *T. gondii* (RH). A concentração de parasitos da amostra de isolado de sangue, apresentou uma variação entre 2×10^3 e $1-2 \times 10^4$ entre a 5^a. e 7^a. passagem IP, e um dos camundongos utilizados nas passagens veio a óbito na 22^a. passagem IP com sinais clínicos de toxoplasmose. Dubey *et al.*, 1998, descreveram que a maioria dos modelos experimentais inoculados com cepas RH, mesmo em passagens IPs em intervalos curtos (48 horas), são agressivas podendo apresentar taxas de

letalidade, com grande multiplicação de parasitos em cerca de 3 a 4 passagens e cerca de 4 a 5 dias para detecção de cistos cerebrais.

O cérebro deste camundongo foi analisado para presença de parasitos em forma livre e cistos contendo bradizoítos. Foram encontrados, por microscopia óptica (MO), acúmulos de parasitos em forma livre em suspensão de cérebro macerado e um único cisto de cerca de 21 μ m. Contudo, alguns pesquisadores descrevem que cepas de *T. gondii* cistogênicas estão relacionadas a casos de toxoplasmose mais brandos, enquanto que as cepas mais virulentas são acistogênicas (Fuentes *et al.*, 2001; Soares, 2004) dados podem variar conforme a cepa de *T.gondii* em uma dada região, em função da característica do próprio parasito (Ajzenberg *et al.*, 2002; Dardé, 2004).

Não foi observado em nenhum dos camundongos infectados com LA de gestantes tratadas a presença de cistos, mas sim de taquizoítos em forma livre. Segundo Soares, 2004, cepas de *T. gondii* mais virulentas são geralmente acistogênicas, como a cepa de genótipo do tipo-I, contudo o comportamento das cepas podem variar, uma vez que a estrutura de população de *T. gondii* e suas variantes por regiões ainda não foi bem elucidada por análises genético-moleculares, em especial populações de *T. gondii* da América do Sul (Dardé, 2004; Soares, 2004, Ajzenberg *et al.*, 2002; Fuentes *et al.*, 2001).

O isolamento *in vitro*, das cepas de *T. gondii*, a partir de amostras de LA apresentou crescimento lento, quando comparado as cepas padrão de *T. gondii* (RH) e de *Neospora caninum* (coccídio do Filo Apicomplexa) com ciclo e morfologia similares ao do *Toxoplasma*. O cultivo celular em células Vero, foi observado em três etapas distintas: isolamento com média de 222 taquizoítos/mL

(média 16,7dias), manutenção com média de 1×10^6 parasitos/mL (5 – 6 meses) e período de multiplicação ocorreu entre 5 a 12 meses após o inóculo inicial com uma concentração média de $6,15 \times 10^7$ parasitos/mL. A cepa de *T. gondii* isolada a partir de sangue de gestante não tratada, apresentou um crescimento mais agressivo em relação às cepas de LA, e a fase de isolamento ocorreu em 9 dias com a concentração de 450 parasitos/mL, a manutenção atingiu a concentração aproximada de 80×10^6 parasitos/mL em cerca de 4 meses, sendo posteriormente diluída (1:2) e criopreservada em nitrogênio líquido.

As cepas RH de *T. gondii* e NC1 de *N. caninum* apresentaram um crescimento rápido (a partir de inóculo de 1×10^6 parasitos/mL) e a concentração observada em cerca de 10 dias após inóculo nas seguintes diluições foi: Cepa RH na diluição 1:2 com concentração em cerca de 80×10^6 parasitos/mL, na diluição 1:5 com concentração de 76×10^6 parasitos/mL, na diluição 1:10 a concentração foi 59×10^6 parasitos/mL, e em diluição 1:20 a concentração $48,5 \times 10^6$ parasitos/mL. As cepas de NC-1 de *Neospora caninum* apresentou (em cerca de 10 dias) nas diluições de 1:5 e 1:10 respectivamente as seguintes concentrações: $7,0$ e $5,8 \times 10^7$ parasitos/mL.

Estes resultados indicam que possivelmente as cepas isoladas de LA tiveram seu comportamento atenuado em função das drogas administradas às gestantes, ou possivelmente pelo estresse induzido pelos procedimentos de passagem e troca de meio, ou ambos (Coppens *et al.*, 2001; Visvesvara *et al.*, 2002).

Outro dado que pode confirmar estes resultados, seria o comportamento da cepa isolada de sangue de gestante sem tratamento instituído, o que poderia

justificar o comportamento mais agressivo da cepa em cultivo celular, mas também observado no isolamento *in vivo*. Esta cepa apresentou-se menos agressiva em relação as cepas padrão RH e NC-1, provavelmente por fatores estressantes (físico-químicos) ou a fatores genéticos (linhagem variante) (Visvesvara *et al.*, 2002; Dardé, 2004; Soares, 2004). De qualquer forma, ficou claro que algum fator inibidor alterou o comportamento das cepas isoladas de LA, independentemente da informação que alguns autores descrevem quanto a atenuação progressiva que cepas de *T. gondii* desenvolvem ao longo das passagens em cultivo celular (Coppens *et al.*, 2002; Visvesvara *et al.*, 2002, Dardé, 2004, Soares 2004)

Este dados são importantes para a avaliação da relação das cepas isoladas e da influência da terapia instituída em relação a toxoplasmose em gestantes e possíveis conseqüências clínicas. Com o estabelecimento dos cultivos celulares, foi também observado o comportamento dos parasitos em relação ao tapete celular, e os resultados confirmaram que o efeito citopático assim como a destruição celular e a invasão progressiva de novas células, foi notavelmente mais agressivo e rápido nos cultivos de cepas padrão (RH-*T. gondii* e NC-1 de *N. caninum*) do que em amostras de LA. Novamente, o comportamento da cepa isolada de sangue de gestante sem tratamento, apresentou crescimento rápido e intermediário em relação as cepas de LA e as cepas referência, confirmando os dados observados no isolamento *in vivo*.

As placentas (e fluídos) das 13 gestantes foram analisadas para presença de parasitos e cistos a fresco. Em todas as amostras (100%) foi encontrado

taquizoítos em forma livre e intracelular. Não foram observados cistos nas amostras de tecido de placenta em microscopia óptica.

Em duas gestantes (EPS e KCB) foi possível a coleta de amostra de sangue de cordão, onde foi constatado a presença de parasitos, o que foi observado em trabalhos que tratam de mobilidade de cepas de *T. gondii* em tecidos trofoblásticos. Estes autores relacionam o genótipo mais agressivo de cepas de *T. gondii* com a mobilidade do parasito pela via hematogênica até o tecido da placenta e do feto (Abbasi *et al.*, 2003; Barragan & Sibley, 2003, Sibley, 2004).

O tempo de desenvolvimento de cistos em camundongos infectados com sangue foi 12 a 14 meses. Não foram observadas manifestações clínicas, nem óbitos associados a toxoplasmose. Nenhuma das amostras de cérebro processado apresentaram cistos, nem em análise parasitológica como em análise histopatológicas. Contudo em 100% das amostras foi observado a presença de parasitos e acúmulo de taquizoítos. Estes dados confirmam observações de outros autores que estabelecem uma relação entre cepas acistogênicas como mais virulentas (Soares, 2004).

As análises histopatológicas (coloração HE) em placenta não revelaram lesões ou alterações clinicamente significativas, contudo em 8 amostras (61,5%) foram observadas as seguintes características: pontos de necróticos, áreas de calcificação, índices angiogênicos periféricos e vasos hiperêmicos, deposição de pigmentos de hemosiderina. Possivelmente estas alterações possam ser decorrentes de processos apoptóticos induzidos pela ação de citocinas (IFN- γ , TNF- α , entre outras citocinas pró-inflamatórias) liberadas em sinalização frente

aos antígenos expressos pelos parasitos. Todavia, infecções por cepas de *T. gondii* em tecido placentário podem expressar alterações macro e microscópicas variadas, e o mecanismo imune associado ainda não está bem elucidado (Coppens *et al.*, 2001).

Os resultados obtidos neste estudo revelaram vantagens e desvantagens das técnicas empregadas. Os isolamentos *in vivo* como *in vitro* apresentaram-se com sensibilidade similar quanto à detecção do *T. gondii*, apesar da baixa concentração inicial de parasitos nas amostras de LA. Fatores estressantes ou inibidores podem influenciar a expressão de resultados FN tanto no cultivo *in vivo* como *in vitro*.

O tempo dispendido, custo e a necessidade de mão de obra especializada e a infraestrutura necessárias a realização destas técnicas, praticamente inviabilizam a implantação em serviços privados, assim como públicos, a menos que haja a interação com centros de pesquisa em institutos ou universidades.

Os exames histopatológicos não permitem avaliar a presença de parasitos, mas podem indicar possíveis alterações no tecido infectado provavelmente por ação de mecanismos imunológicos, contudo placentas infectadas podem não apresentar resultados clinicamente significativos.

A confirmação de resultados sorológicos pode ser complementada por estas metodologias, quando o resultado for inconclusivo, contudo publicações mais recentes demonstram que a confirmação do diagnóstico sorológico é melhor complementada com técnicas moleculares como a PCR, desde que haja uma otimização e padronização da mesma. Este tópico está abordado no Capítulo IV.

A vantagem das técnicas de isolamento do parasito é a possibilidade de estudar a variabilidade genética intra-específica e melhor conhecer a epidemiologia (fonte de infecção, distribuição geográfica dos diferentes genótipos).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ajzenberg, D.; Cogné, N.; Paris, L.; Bessières, M. H.; Thulliez, P.; Filisetti, D.; Pelloux, H.; Marty P.; Dardé, M. L. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* Isolates Associated with Human Congenital Toxoplasmosis, and Correlation with Clinical Findings. **J Infect Dis.** v. 186, n. 5, p. 684 - 689, 2002.

Abbasi, M.; Kowalewska-Grochowska, K.; Bahar, M.A.; Kilani, R.T.; Winkler-Lowen, B. and Guilbert, L.J. Infection of Placental Trophoblasts by *Toxoplasma gondii*. **J Infect Dis.** v. 188, p. 608 – 616, 2003.

Barragan, A., Sibley, L.D. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. **Trends Microbiol.** v. 11, n. 9, p. 426 – 430, 2003.

Campana, S.G.; Chavez, J.H.; Haas, P. Diagnóstico laboratorial do líquido amniótico. **J Bras Patol Med Lab.** v. 39, n. 3, p. 215 – 218, 2003.

Coppens, I.; Joiner, K.A. Parasite-host cell interactions in toxoplasmosis: new avenues for intervention? **Expert Rev Mol Med.** Cambridge University Press (CUP), v. 15, 2001.

Dardé M L. Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. **Ann Ist Sanita.** v. 40, n. 1, p. 57 – 63, 2004.

Derouin F, Chastang C. Enzyme immunoassay to assess effect of antimicrobial agents on *Toxoplasma gondii* in tissue culture. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 32, n. 3, p. 303 – 330, 1988.

Daffos F, Forestier F, Capella-Pavlovsky M, Thulliez P, Aufrant V, Valenti D, Cox WL. Prenatal management of 746 pregnancies at risk for congenital toxoplasmosis. **N Engl J Med.** v. 318, n. 5, p. 271 – 275, 1988.

Dubey, J.P.; Lindsay, D.S.; Speer, C.A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology development of tissue cysts. **Clin Microbiol Rev.** v. 11, n. 2, p. 267 – 299, 1998.

Engstrom, R. E.; Holland, G. N.; Nussenblatt, R. B.; Jabs, D. A. Current practice in the management of ocular toxoplasmosis. **Am J Ophthalmol.** v. 111, n. 5, p. 601 - 611, 1991.

Filisetti, D.; Pernot-Marino, E.; Villard, O. and Candolfi, E. Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis: Comparison of Targets for Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR. **J Clin Microbiol.** v. 41, n. 10, p. 4826 – 4828, 2003.

Fuentes, I., Rubio, J.M., Ramirez, C. and Alvar, J. Genotypic Characterization of *Toxoplasma gondii* Strains Associated with Human Toxoplasmosis in Spain: Direct Analysis from Clinical Samples. **Journal of Clinical Microbiology.** v. 39, n. 4, p. 1566 -1570, 2001

Garcia, A. Aspectos morfológicos feto-placentários na infecção congênita pelo *Toxoplasma gondii*. **Am Acad Nac Med.** v. 155, p. 229 – 231, 1995.

Grigg, M.E. & Suzuki, Y. Sexual recombination and clonal evolution of virulence in *Toxoplasma*. **Microbes Infect.** v. 5, n. 7, p. 685 – 690, 2003.

Howe, D.K., Sibley, L.D. Development of molecular genetics for *Neospora caninum*: A complementary system to *Toxoplasma gondii*. **Methods.** v.13, n. 2, p. 123 – 133, 1997.

Junqueira, CU; Carneiro, J. **Histologia Básica.** Ed. Guanabara Koogan, 10^a. Edição, 2004.

Lopez A, Dietz VJ, Wilson M, Navin TR, Jones JL. Preventing Congenital Toxoplasmosis. **MMWR– Recommendations and Reports.** v. 49, p. 57 – 75, 2000.

Montoya, J.G. Laboratory Diagnosis of *Toxoplasma gondii* Infection and Toxoplasmosis. **J Infect Dis.** v. 185, S73-S82, 2002.

Montoya, J.G.; Liesenfeld, O. Toxoplasmosis. **Lancet.** v.12, n. 363, p. 1965 – 1976, 2004.

Montoya, J.G.; Rosso, F. Diagnosis and management of toxoplasmosis. **Clin Perinatol.** v. 32, n. 3, p. 705 – 726, 2005.

Remington, J.S.; McLeod, R.; Thulliez, P.; Desmonts, G. Toxoplasmosis. *In*: Remington JS, Klein J, eds. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, p. 205 – 346, 2001.

Rey, L. Bases da Parasitologia Médica. Ed. Guanabara Koogan, 2^a. Ed., 410 p., 2002.

Pelloux H. ; Weiss J.; Simon J.; Muet F.; Fricker-Hidalgo H.; Goultier-Fleuret A.; Ambroise Thomas P. . A new set of primers for the detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid using polymerase chain reaction. **FEMS Microbiol Lett.** v. 138, p. 11 – 15, 1996.

Pelloux H.; Guy E.; Angelici M.C.; Aspöck H.; Bessiéres M.H.;Blatz R.; Pezzo M.D.; Girault V. ; Gratzl R. ; Petersen M.H.; Johnson J.; Krürger D. ; Lappalainen M.; Naessens A. ; Olsson M. A second European collaborative study on polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii*, involving 15 teams.**FEMS Microbiol Lett.** p. 231 – 237, 1998

Petersen, E.; Borobio, M.V.; Guy, E.; Liesenfeld, O.; Meroni, V.; Naessens, A.; Spranzi, E. and Thulliez, P. European Multicenter Study of the LIAISON Automated Diagnostic System for Determination of *Toxoplasma gondii*-Specific Immunoglobulin G (IgG) and IgM and the IgG Avidity Index. **J Clin Microbiol.** v. 43, n. 4, p. 1570 – 1574, 2005.

Peyron, F., Wallon, M., Liou, C., Garner, C. Treatments for toxoplasmosis in pregnancy (Cochrane Review). **The Cochrane Database of Systematic Reviews** Issue n. 3. Art. No.: CD001684. DOI: 10.1002/14651858.CD001684, 1999.

Pinon, J.M.; Chemla, C.; Franck, J.; Petersen, E.; Lebech, M.; Zufferey, J.; Bessieres, M.H.; Marty, P.; Holliman, R.; Johnson, J.; Luyasu, V.; Lecolier, B.; Guy, E.; Joynson, D.H.M.; Decoster, A.; Enders, G.; Pelloux, H. and Candolfi, E. Strategy for Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis: Evaluation of Methods Comparing Mothers and Newborns and Standard Methods for Postnatal Detection of Immunoglobulin G, M, and A Antibodies. **J Clin Microbiol.** v. 39, n. 6, p. 2267 – 2271, 2001.

Sibley, L.D. Intracellular parasite invasion strategies. **Science.** v. 304, n. 5668, p. 248 – 252, 2004.

Soares, R.M. Caracterização Molecular de *Toxoplasma gondii*. **Rev Bras Parasitol Vet.** v. 13, supl. 1. XIII Congresso Brasileiro de parasitologia Veterinária & I Simpósio Latino-Americano de Ricketisioses, Ouro Preto, MG, 2004.

Spalding SM, Amendoeira MRR, Klein CH, Ribeiro LC. Serological screening and toxoplasmosis exposure factors among pregnant women in South of Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop.** v.38, n. 2, sn, 2005.

Visvesvara, G.; Garcia, L. Culture of Protozoan Parasites. **Clin Microbiol Rev.** v. 15, n. 3, p. 327-328, 2002.

Wilson, M.; Remington, J.S.; Clavet, C.; Varney, G.; Press, C.; Ware, D. and The FDA Toxoplasmosis Ad Hoc Working Group. Evaluation of Six Commercial Kits for Detection of Human Immunoglobulin M Antibodies to *Toxoplasma gondii*. **J Clin Microb.** v. 35, n. 12, p. 3112 – 3115, 1997.

CAPÍTULO IV

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DE *Toxoplasma gondii* DE GESTANTES COM INDICAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL DE TOXOPLASMOSE CONGÊNITA.

RESUMO

A toxoplasmose é uma das infecções parasitárias mais disseminadas em todo mundo. Em indivíduos imunocompetentes é geralmente assintomática. Todavia, em pacientes com graus variados de imunocomprometimento e em gestantes pode causar seqüelas severas, chegando mesmo ser fatal. Em gestantes o diagnóstico pré-natal deve ser o mais precoce possível, para que haja a intervenção de terapia protocolar para reduzir a parasitemia e evitar a infecção transplacentária. O propósito deste estudo foi detectar DNA de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* pela amplificação para o gene *B1* (primers JW58 e JW59) pela reação em cadeia da polimerase como protocolo rápido, sensível e específico aplicado em amostras de líquido amniótico e sangue de gestantes, e também caracterizar molecularmente estas cepas isoladas pela amplificação das porções terminais 5' e 3' do *locus* do gene *SAG2* do *T. gondii* e estabelecer a definição do genótipo (I,II,III) pela digestão por endonucleases. Três cepas referências foram utilizadas para a definição dos genótipos: tipo-I (cepa RH), do tipo-II (cepa Me49) e do tipo-III (cepa C56). Procedimentos de controle de qualidade foram adotados para minimizar interferências ou inibições de amplificação, como: uso de UNG previamente a amplificação, controles positivo e negativo e de água, uso de DNA com isenção de resíduos químico-protéicos. As amostras que amplificaram e expressaram bandas tanto pela PCR para o gene *B1*, como para o *SAG2* foram de DNA extraído por método *Salting out*, pois amostras de DNA extraídas por fenol / clorofórmio e etanol, não reproduziram resultados satisfatórios. A genotipagem revelou a prevalência do genótipo do tipo-I tanto para as amostras de líquido amniótico (n= 13), como para a amostra de DNA de sangue. Não foi possível estabelecer uma correlação clara entre a persistência dos parasitas e manifestações clínicas no pré e pós-natal.

Palavras Chave: Toxoplasmose congênita, PCR, Líquido Amniótico, gene *B1*, *SAG2*, Genotipagem

ABSTRACT

Toxoplasmosis is one of the most disseminated infections throughout the world, and generally asymptomatic in immunocompetent individuals, except in patients with certain degrees of immunodeficiency and in pregnant women, and depending of the pregnancy trimester, parasitic burden and *T. gondii* strain, can lead to severe sequelae to the foetus. Early antenatal diagnosis is of outmost importance in order to establish anti-parasitic therapy to avoid and minimize parasitemia and transplacental infection. The purpose of this study was to detect DNA from tachyzoites of *Toxoplasma gondii* with amplification protocol to *B1* gene by polymerase chain reaction (primers JW58 and JW59) due to its sensitivity, specificity and as a rapid and easy to perform method, by using amniotic fluid samples obtained from pregnant women previously diagnosed with toxoplasmosis and also treated with anti-parasitic therapy with spiramicyne, pyrimethamine, sulfadiazine and folinic acid. A blood DNA sample extracted from a pregnant woman with acute immune status (IgM+ / IgG-) was also submitted to amplification. All the samples were also submitted to molecular characterization by amplification of terminal ends 5' and 3' from the *locus* of the gene *SAG2* and establish and define the genotype (I, II, III) by endonuclease digestion. Three standard *T. gondii* strains were used to define the clonal lineages: type-I (RH), type-II (Me49), type-III (C56). Quality control procedures were adopted to minimize interferences and inhibitions to the amplification protocols as: UNG previous to amplification cycle, positive and negative controls, contamination control (water), DNA with minimal residual protein and chemical traces. The DNA samples that were successfully amplified by PCR to the *B1* and *SAG2* genes were obtained by the Salting out extraction protocol (100%), rather than the classical extraction protocol (phenol, chloroform and ethanol), that did not reproduce acceptable results. The prevalent genotype showed throughout molecular characterization was type-I, in all samples (n= 13), including the blood DNA sample. Such results does not establish a clear relationship between parasite persistence and clinical manifestations at antenatal and postnatal periods.

Key Words: Toxoplasmosis in Pregnancy, PCR, Amniotic fluid, B1 gene, SAG2, Genotyping

INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma infecção muito freqüente na população humana sendo descritas taxas de prevalência, variável de 20 a 90% da população adulta mundial. A soroprevalência varia conforme as regiões, sobretudo quando relacionadas a condições sanitárias e índices sócio-econômicos (Hill & Dubey, 2002; Spalding *et al.* 2003).

A gravidade da infecção causada pelo *T. gondii* pode variar conforme a condição imunológica humoral e celular do indivíduo, indo de sintomas muito brandos (similar a uma gripe) ou ausentes, a formas clínicas exuberantes. As formas clínicas graves geralmente ocorrem em indivíduos imunocomprometidos e em gestantes.

Indivíduos imunocomprometidos (HIV+, oncológicos, transplantados ou com imunodeficiências genéticas e diabetes), podem apresentar elevados índices de morbidade e mortalidade (Ho-Yen, 1992; Israelski & Remington, 1993; Lewden *et al.*, 2005; Khurana *et al.*, 2005). Em caso de infecção, nestes indivíduos, o parasito tem tropismo pelo sistema nervoso. A doença se manifesta mais freqüentemente por quadros neurológicos e pode ser fatal em caso de atraso na instituição do tratamento.

A transmissão transplacentária pode ocorrer por infecção primária ao longo dos três trimestres da gestação (Pelloux *et al.*, 2002; Remington *et al.*, 2001). Se a infecção é adquirida durante a gestação o parasito pode se alojar na placenta e aí se desenvolver pelo resto da gestação. Em um grande número de casos pode atingir o feto. A gravidade das lesões está relacionada à fase gestacional e

conseqüências podem ser maiores quanto mais jovem for o feto, podendo ocorrer abortamento, nati-mortos ou hidrocefalia. Se a infecção for mais tardia poderá haver distúrbios visuais, auditivos ou retardamentos mentais.

Métodos imunoenzimáticos permitem avaliar o perfil imune humoral da gestante e estabelecer o risco da infecção conforme a idade gestacional (IG) e possibilitam a inclusão da gestante em protocolos terapêuticos que visam inibir a parasitemia (Pinon, 2001; Remington, 2004).

A combinação de drogas tóxicas antiparasitárias, como a pirimetamina e a espiramicina, nem sempre impede a transmissão, nem garante a eliminação total de taquizoítos (Peyron *et al.*, 2001; Binquet, 2004). Métodos moleculares, como a PCR qualitativa para o gene *B1* (que se encontra repetido 35 vezes no genoma do *T. gondii*) são utilizados para avaliar a eficácia do tratamento em amostras clínicas como: líquido amniótico, sangue de cordão, placenta, humor aquoso e em tecidos diversos infectados pelo *T.gondii* (Burg *et al.*, 1989; Grover *et al.*, 1990; Hohfeld *et al.*, 1994; Pelloux *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 2000; Spalding *et al.*, 2002; Remington *et al.*, 2004).

A persistência de parasitas em amostras biológicas de gestantes tratadas pode indicar a refratariedade do parasita as drogas, possivelmente por diferenças genéticas entre as cepas de *Toxoplasma gondii* isoladas (Ajzenberg *et al.*, 2002; Dardé *et al.*, 2004).

A caracterização molecular das cepas de *Toxoplasma gondii*, por técnicas como: análises isoenzimáticas, polimorfismo de fragmentos de DNA por restrição enzimática (RFLP-PCR), seqüenciamento automatizado, DNA polimórfico amplificado de forma randômica (RAPD), permite estabelecer uma relação entre o

genótipo e virulência da cepa isolada, além da correlação das cepas e refratariedade às drogas utilizadas no tratamento da infecção (Sibley *et al.*, 1992; Dardé *et al.*, 1992; Cristina *et al.*, 1995; Guo *et al.*, 1995; Howe *et al.*, 1997; Dardé *et al.*, 2004).

As linhagens clonais identificadas por estas técnicas são dos tipos: I, II e III, e estão relacionadas ao gene *SAG2* do *T.gondii*, sendo encontradas em cepas isoladas em humanos e animais (Sibley *et al.*, 1992; Fuentes, 2001).

Filogeneticamente, os genótipos dos Tipos II e III pertencem ao mesmo grupo, contudo o genótipo do tipo II é mais prevalente em camundongos e em cepas mantidas em cultivo celular. O genótipo do tipo I, está mais associado a Toxoplasmose congênita (Fuentes *et al.*, 2001; Ajzenberg *et al.*, 2002).

No Brasil, existem estudos que demonstram variações da prevalência da Toxoplasmose na população adulta imunocompetente, e na população de gestantes, assim como da relação e comparação de métodos de diagnóstico diversos (imunológicos e parasitológicos), incluindo métodos de detecção do DNA do *T. gondii* em amostras clínicas diversas. Poucos grupos de pesquisa publicaram artigos que tratam da relação entre genótipos isolados, drogas protocolares utilizadas e persistência de parasitos e severidade associada a infecções na gestação (Jaquier, 1995; Camargo *et al.*, 1996; Cantos, 2000; Lopez *et al.*, 2000; Coppens *et al.*, 2001; Spalding & Amendoeira, 2003).

Os objetivos deste estudo foram: 1. otimizar protocolos de extração de DNA de *Toxoplasma gondii*, 2. padronizar e otimizar o protocolo técnico da PCR para o gene *B1*, em amostras de líquido amniótico de gestantes, 3. caracterizar molecularmente cepas de *T. gondii* isoladas e utilizar o protocolo de amplificação

para o gene do *locus SAG-2* e restrição enzimática, a fim de conhecer a variabilidade e expressão de genótipos e sua correlação clínico-laboratorial.

MATERIAL E MÉTODOS

PACIENTES E AMOSTRAS

Pacientes

Para o desenvolvimento deste estudo, selecionou-se 13 gestantes (7,83%), de 166 pacientes que apresentaram resultados sorológicos para toxoplasmose (IgM+ e IgG+) e que foram submetidas ao teste de avididade para confirmar ou infirmar se estavam em fase aguda da doença. A média de idade era de 21 anos de idade ($\sigma \pm 5,9$) variando entre 15 e 35 anos, e que foram previamente assistidas pelo Projeto Mãe Curitibana da Secretaria Municipal de Saúde de Curitiba (PMC-SMS) e pelo Serviço de Atendimento Pré-natal do HC-UFPR no período de 01 de abril de 2003 a 31 de julho de 2004 e que apresentaram histórico clínico e laboratorial de toxoplasmose. A colheita de material foi feita após o consentimento em participar da pesquisa e assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Anexo 3). Este estudo foi previamente aprovado por dois conselhos de ética e pesquisa (CES-SMS-PMC e CEP-HC-UFPR), que autorizaram o uso de amostras e dados clínico-laboratoriais destas gestantes.

Todas as gestantes participantes receberam tratamento terapêutico protocolar com espiramicina, pirimetamina e ácido fólico no momento da

confirmação sorodiológica de toxoplasmose, junto a US em que estavam cadastradas ou diretamente em consulta no HC-UFPR.

As gestantes foram monitoradas pelo pesquisador e equipe médica do HC-UFPR ao longo da gestação, e após avaliação individual foi definida a data da amniocentese e acompanhamento ecográfico, e subsequente coleta de líquido amniótico (Vide POP de coleta de LA Anexo 4). O material colhido foi dividido em alíquotas para realização dos protocolos de isolamento *in vivo* e *in vitro* (conforme descrito no Capítulo III), PCR para o gene *B1* em amostras de LA e de cultivo celular (controles) e a caracterização molecular pela RFLP-PCR para definição dos genótipos das cepas isoladas.

AMOSTRAS CLÍNICAS

Para a realização da PCR qualitativa para o gene *B1* e posteriormente para a definição dos genótipos do *T.gondii*, foram utilizadas amostras colhidas de LA. Cerca de 5 – 10ml de LA foram colhidos na amniocentese guiada por ecografia e acondicionados em tubo de polipropileno de fundo cônico estéril, ao abrigo de luz, entre 2 – 8°C. O LA foi examinado a fresco entre lâmina e lamínula em microscopia óptica (MO) nos aumentos com objetivas de 100 e 400X, para observação da presença de taquizoítos em suspensão. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 2.100 rpm (rotações por minuto) por 10 minutos para observar a presença e quantificação de parasitas no sedimento formado (Capítulo III).

Do volume total de LA, cerca de 1 – 2mL foram destinados para extração de DNA, cerca de 1 - 2 mL para isolamento do parasito em cultivo celular e cerca de

1,0mL para inoculação por via IP em camundongos Swiss Webster (não isogênico) (Vide Capítulo III).

CEPAS REFERÊNCIA

Como controles para os protocolos da PCR, foram utilizados: cepa referência – RH de *T. gondii* (Nguyen *et al.*, 1996, Literak & Rychlik 1999; Jong – Yil *et al.*, 2003). Além desta cepa, foi utilizada a cepa referência de *N. caninum* - NC-1, para avaliação de especificidade da PCR. Para a caracterização molecular, pela técnica de RFLP-PCR, foram utilizadas como controles cepas de *T. gondii* dos genótipos dos tipos I (RH), II (Me49) e III (C56), cedidas pelo Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares da FMVZ, USP.

MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA

Para a realização deste trabalho foram escolhidos dois métodos de extração de DNA: método *Salting Out* (NaCl 6M) segundo Buffone *et al.* (1985); Miller *et al.* (1988); Persing *et al.* (1993) e método clássico (Fenol / Clorofórmio / Etanol) segundo Davis *et al.* (1986); Sambrook *et al.* (1989); Jackson *et al.* (1990); Gross *et al.* (1992).

EXTRAÇÃO DE DNA PELO MÉTODO *SALTING – OUT (SO)*

As amostras utilizadas para extração de DNA por SO foram: Cepa RH de *T. gondii*, Cepa NC-1 de *Neospora caninum* (obtidas de Cultivo Celular – Células Vero), e cepas de *T. gondii* isoladas de amostras clínicas (n=13). Cada amostra foi processada conforme protocolo específico (cultivo celular, LA).

Amostras de cultivo celular foram centrifugadas em um tubo tipo *ependorf* de 1,5mL à 10.000 rpm 10 minutos para obter um sedimento de células e parasitos numa concentração média de $1 - 2 \times 10^6$ a 10^8 taquizoítos.

As amostras de LA foram centrifugadas em tubos tipo *ependorf* de 1,5mL a 10.000 rpm por cerca de 10 minutos, o sobrenadante foi decantado, e o *pellet* (precipitado) de células e parasitos foi utilizado para a extração de DNA.

Em uma fase anterior, a extração de DNA, os *pellets* obtidos de amostras de LA e de cultivo celular passaram por uma fase de lise onde os reagentes utilizados para solução de lise foram: TRIS-HCl 2 M, EDTA 0,5M, SDS 10%, Proteinase K (10 mg /mL) e água mili – Q[®] (ultrapura).

Esta solução ficou em contato com os *pellets* por cerca de 37°C / 12 horas ou 56°C / 2 – 3 horas, em bloco térmico seco. Após a fase de lise celular, adicionou-se volume/volume de solução salina saturada (NaCl 6M) para precipitar proteínas e *debris* celulares, expondo o DNA em fase aquosa após centrifugação a 10.000 rpm /10 minutos. O DNA da fase aquosa foi precipitado pela adição de cerca de 450µL de etanol absoluto PA (-20°C), com lavagens subseqüentes de

álcool hidratado (70%) para remover traços de sais e purificar e isolar o DNA. A recuperação do *pellet* seco de DNA purificado foi feita pela solubilização com cerca de 100 μ L de água ultrapura ou com solução TE 1X (TRIS-HCl 1M pH 7,5, 0.5M EDTA).

EXTRAÇÃO DE DNA PELO MÉTODO CLÁSSICO: FENOL/CLOROFÓRMIO E ETANOL

As amostras utilizadas para extração de DNA foram de amostras de LA, e de cultivo celular (controles). Após o processamento das amostras para obtenção do sedimento celular e de parasitos, o *pellet* formado passou por uma fase de lise onde os reagentes utilizados foram os mesmos do método de extração por SO.

Após a fase de lise celular prosseguiu-se com a fase de extração química, onde foi adicionado volume/volume (v/v) uma solução de fenol PA (C_6H_5OH , ácido carbólico da MERCK) tamponado com TRIS-HCl 500 mM (pH= 8) e 0,2% β -mercaptoetanol. O tubo foi centrifugado a 10.000 rpm /10 minutos, originando três fases: uma fase mais densa ou “fenólica”, uma fase intermediária rica em proteínas desnaturadas e a fase superior ou “aquosa” rica em ácidos nucleicos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo de 1,5mL.

Após a fase de extração fenólica, prosseguiu-se com a fase de extração com clorofórmio PA ($CHCl_3$, triclorometano da MERCK) com o mesmo procedimento, e em seguida precipitou-se o DNA com etanol absoluto v/v a baixa temperatura (-20°C). Após centrifugação 10.000 rpm/10 minutos, decantou-se o

etanol obtendo-se um *pellet* seco de DNA. Adicionou-se cerca de 1,0mL de solução de álcool hidratado – 70% para remover resíduos químicos. Após centrifugação, decantou-se o álcool, obtendo-se um *pellet* seco de DNA, que foi hidratado com cerca de 100 μ L de água ultrapura ou com solução TE 1X (TRIS-HCl 1M pH= 7,5 e 0.5M EDTA).

QUANTIFICAÇÃO DE DNA POR MÉTODO ELETROFORÉTICO

O DNA extraído pelos dois métodos foi visualizado sob forma de bandas que correspondem a uma concentração específica quando comparado com bandas de concentração padrão (1 μ g/ μ L e 2 μ g/ μ L), observados em gel de agarose sódica (0,8- 1,0 %) corada com brometo de etídio (10mg/mL) em solução diluída 1:10.000 e exposta para a visualização em fonte de U.V (transiluminador U.V – LKB-Bromma-Suécia).

As bandas foram registradas para elaboração de planilha de comparação com dados de quantificação por espectrofotometria.

QUANTIFICAÇÃO DO DNA POR ESPECTROFOTOMETRIA

Foi utilizado um método automatizado de leitura imediata, baseado em espectrofotometria (Fotômetro UV 1101 – WPA Cambridge UK), e por sua precisão e exatidão relacionado a concentração e grau de pureza de ácidos nucléicos. O espectrofotômetro mensurou concentrações de ácidos nucléicos extraídos por SO e método clássico e também indicou grau de pureza da amostra em função da razão: A_{260nm} (concentração máxima de DNA) / A_{280nm}

(concentração máxima de proteínas e resíduos químicos). Concentrações ideais foram obtidas a partir de leituras: > 250 µg / mL e grau de pureza (GP: A260/280) entre 1,0 a 1,6. Como referências para calibração e ajuste prévio a leitura foram utilizados: H₂O ultrapura (18 MΩ.cm pH= 5,0) para zerar leitura em dois tipos de filtros UV (ultra violeta): 260nm, 280nm, e um filtro de 595nm. O preparo das amostras foi feito através da diluição 1:100 (5µl amostra/ 495µl H₂O ultrapura).

CRIOPRESERVAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS (-80°C)

O DNA isolado, purificado e de concentração conhecida foi criopreservado em DNAteca para este estudo, em solução alcoólica (etanol absoluto/ etanol 90%). O DNA que foi estocado nessas condições permanece viável por período indefinido, com risco mínimo de fragmentação.

DETECÇÃO DO DNA DO *T. gondii* PELA PCR PARA O GENE *B1*

As amostras de DNA de LA, cultivo celular (controles) foram inicialmente confirmadas por amplificação com *primers* para o gene *B1* (Pelloux *et al.*, 1996), nas seqüências seguintes, JW 58 – 23 mer: 5´ - AAG GGC TGA CTC GAA CCA GAT GT – 3´ e JW59 – 21 mer: 5´- GGG CGG ACC TCT CTT GTC TCG- 3´.

O *cocktail* (*Master Mix*) de amplificação foi composto de: Tampão de Amplificação 1 X [TRIS-HCl 670mM, pH =8.8; (NH₄)₂SO₄ 160mM; Tween 20 a 0,1%], 100µM dNTP (cada nucleosídeo: dATP,dCTP,dGTP), 200µM de dUTP (no lugar de dTTP), 10 µM de cada *primer*, 1,25U de *Taq* Polimerase (DNA polimerase – Amershan Pharmacia Biotech), 0,2 U de Uracil-*N*-Glicosilase da SIGMA-Aldrich

(UNG), $MgCl_2$ 2 – 1,5mM, 10 μ L da amostra de DNA extraído e purificado e água ultrapura para volume final de 50 μ L.

Não foi utilizado o controle interno (plasmídeo: pSYC44) de amplificação para evitar resultados Falso-negativos (Pelloux & Weiss, 1996).

Para evitar inibição de amplificação, foi realizado o controle de qualidade para amostras de DNA extraídos por espectrofotometria, para verificação de ausência de resíduos protéicos e químicos (sais e fenólicos). As condições de amplificação foram: 50°C / 3 minutos (temperatura ótima para a enzima UNG clivar produtos de amplificação ricos em uracila e evitar resultados Falso-positivos).

A reação prosseguiu com um estágio de 95°C/ 5minutos (inativando a ação da UNG), e 40 ciclos de 95°C / 30 segundos, 70°C / 30 segundos, 72°C / 60 segundos e um período (HOLD) 72°C / 5 minutos.

O Termociclador utilizado foi Eppendorf[®] - 2400 (96 X Wells). Após amplificação, os amplicons foram observados em gel de agarose sódica (1,0-1,5%) corada com Brometo de Etídio (1:10.000) em cuba minigel e fonte ajustada para 80V por cerca de 35 minutos. As bandas foram visualizadas em UV e comparadas com um marcador de massa molecular (MMM) – DNA λ *Ladder* (1Kb/100bp – Amersham Pharmacia Biotech), com os controles: positivo - RH de *T. gondii*, de especificidade - NC-1 de *N. caninum*, controle de contaminação (água), controle negativo (de cultivo celular isento de *T. gondii*).

As bandas foram registradas através de foto documentação digital, e alinhadas através de um software específico (sistema de fotodocumentação – *Vilbert Lourmat* – UFPR e CDME-PR). Um perfil eletroforético de 301bp, para amostras e controles positivos, foi esperado.

GENOTIPAGEM PELA RFPL-PCR

A determinação dos genótipos de *T.gondii* isolados das amostras de LA e dos controles, foram determinados por restrição enzimática dos produtos de amplificação do gene SAG2 (Fuentes *et al.*, 2001), obtidos através de ampliações em Nested-PCR para as regiões terminais 5' e 3' deste gene.

O *cocktail* de amplificação (*Master Mix*) para as reações aninhadas (*nested*) foram: TRIS-HCl 75mM (pH = 9,0), KCl 50mM, (NH₄)₂SO₄ 20mM, MgCl₂ 2mM, BSA 0.001%, 200 μ M dNTP (cada nucleosídeo), 0.5pMol de cada primer, 1U de Taq Polimerase (DNA polimerase – Amersham Pharmacia Biotech), 10 μ L de DNA extraído e purificado – para as primeiras reações de amplificação. Para as seqüências posteriores de amplificação, 5 μ L a partir de uma diluição de 1:100 dos amplicons da primeira reação.

O volume final de amplificação (para a primeira e segunda reações) foi de 50 μ L. O termoamplificador utilizado foi da Eppendorf® - 2400 (96X *wells*), e as condições de amplificação formam: desnaturação 94°C / 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 94°C / 45 segundos, 45 segundos (na temperatura de hibridização do par de *primers* específico de 1ª (60°C) e 2ª (58°C) amplificação) e 72°C / 60 segundos, e uma etapa final de extensão de 72°C / 10 minutos.

Para a amplificação da região terminal 5' a seqüência de *primers* foi: SAG2F4 – 18 mer (5'-GAC CTC GAA CAG GAA CAC-3') e SAG2R4 – 20 mer (5'-GCA TCA ACA GTC TTC GT TGC-3'), para a primeira amplificação com temperatura de hibridização de 60°C.

Para a segunda amplificação, os *primers* internos utilizados foram: SAG2F – 20 mer (5'-GAA ATG TTT CAG GTT GCT GC-3') e SAG2R2 – 20 mer (5'-GCA AGA GCG AAC TTG AAC AC-39) com temperatura de hibridização de 58°C.

Para a amplificação da região terminal 3' foi realizada com os *primers* SAG2F3 – 21 mer (5'-TCT GTT CTC CGA AGT GAC TCC-3') e SAG2R3 – 19 mer (5'-TCA AAG CGT GCA TTA TCG C-3') para a primeira amplificação, com temperatura de hibridização de 58°, e para segunda amplificação com *primers* internos SAG2F2 -19 mer (5'-ATT CTC ATG CCT CCG CTT C-3') e SAG2R – 20 mer (5'-AAC GTT TCA CGA AGG CAC AC-3'), e com temperatura de hibridização de 55°C.

O produto esperado de amplificação da região terminal 5' foi de 241bp (pares de bases), e o perfil eletroforético do produto de amplificação da região terminal 3' foi de 221 bp. Para a diferenciação dos genótipos, foram realizadas restrições enzimáticas com *Sau-3AI* para os amplicons da região 5', e com *Hha-I* para os amplicons da região 3'.

A visualização dos produtos de amplificação foram possíveis através de eletroforese em gel de agarose sódica (1,5 – 2,0%) corada com Brometo de Etídio (1:10.000) e visualizada em transiluminador-UV (LKB-Bromma- Suécia).

As imagens foram digitalizadas / fotodocumentadas por *software* específico (sistema de fotodocumentação – *Vilbert Lourmat* – FMVZ-USP).

RESULTADOS

MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA

As amostras extraídas por método clássico revelaram bandas com variação de concentração entre 1,2 e 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (média 1,8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de DNA genômico, quando comparadas com amostras referências (1 e 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) após eletroforese e exposição a irradiação UV em transiluminador. As amostras de DNA extraídas pelo método de *Salting Out*, revelaram bandas após corrida eletroforética e exposição a radiação UV (transiluminador) com uma variação de concentração entre média entre 1,0 e 2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Tabelas 1 e 2)

Tabela 1: Quantificação de DNA de *Toxoplasma gondii* extraído pelos métodos – Clássico (Fenol/Clorofórmio/Etanol) e *Salting Out* (NaCl 6M) e concentração e perfil eletroforético no gel.

Amostras – DNA (LA)	Quantificação – DNA/ Método- Clássico(µg/µL)	Expressão das bandas no gel	Quantificação – DNA/ Método- <i>Salting Out</i> (µg/µL)	Expressão das bandas no gel
1- LSL	1.5	Visível/Rastro	1.0	Visível/Definida
2- DAFS	2.5	Visível/Rastro	2.0	Visível/Definida
3- YBL	1.5	Visível/Rastro	1.0	Visível/Definida
4- SCSO	1.8	Visível/Rastro	1.5	Visível/Definida
5- DCO	1.5	Visível/Rastro	1.0	Visível/Definida
6- CSL	1.5	Visível/Rastro	1.0	Visível/Definida
7- EKSM	2.5	Visível/Rastro	2.0	Visível/Definida
8- JGG	1.8	Visível/Rastro	1.5	Visível/Definida
9- IS	1.2	Visível/Rastro	1.0	Visível/Definida
10- ARP	2.0	Visível/Rastro	1.5	Visível/Definida
11- EPS	1.5	Visível/Rastro	1.0	Visível/Definida
12- KCB	1.8	Visível/Rastro	1.5	Visível/Definida
13- ERJ	2.5	Visível/Rastro	2.0	Visível/Definida
Observações	[] Média: 1,8 µg/µL	Presença de Rastros	[] Média: 1,4 µg/µL	Ausência de Rastros

LA-líquido amniótico, [] – concentração

Tabela 2: Parâmetros relacionados à extração de DNA pelos métodos: Clássico e *Salting Out* e padrão de bandas observadas por eletroforese em gel de agarose.

Etapas de Extração	Método Clássico	<i>Salting Out</i>
Lise Celular	TRIS, SDS, EDTA, Proteinase K, água mili-Q® (ultra pura)	TRIS, SDS, EDTA, Proteinase K, água mili-Q® (ultra pura)
Extração Química	Fenol, Clorofórmio, Etanol	Precipitação Protéica com NaCl 6M
Precipitação Alcoólica	A precipitação do DNA ocorre com álcool - 20°C	A precipitação do DNA ocorre com álcool -20°C
Qualidade do DNA Extraído	Bandas com rastros no gel. (Possível ocorrência de resíduos protéicos e químicos)	Bandas de DNA isentas de rastros ao longo do gel
Concentração do DNA extraído	Recuperou DNA com concentração média de 1,8 µg/µL (range: 1,2 a 2,5 8 µg/µL)	Recuperou DNA com concentração média de 1,4 µg/µL (range: 1,0 a 2,08 µg/µL)

O tempo despendido por cada procedimento de extração de DNA para a obtenção dos resultados acima está descrito na Tabela 3.

Tabela 3: Tempo de execução para cada etapa de cada método de extração de DNA até a quantificação por eletroforese em gel de agarose.

Etapas de Extração	Método Clássico	Salting Out
Lise Celular	3 horas / 56°C	2 horas / 56°C
Extração Química	1h 15 min	20 minutos
Eletroforese	1 hora	1 hora
TOTAL	5 horas e 15 min	3 horas e 20 min

As amostras de DNA (LA) quantificadas pelo método clássico foram utilizadas para a amplificação para o gene *B1*, utilizando o par de *primers* JW58 e JW59. Das 13 amostras de DNA extraídas pelo método clássico, nove amplificaram (69,2%) expressando bandas visíveis, uma amostra (11,1%) entre as nove bandas visíveis (amostra - KCB) expressou “*fading band*” (banda evanescente). As amostras amplificadas apresentaram um produto de amplificação de 301bp, compatíveis com perfil eletroforético de controle positivo (RH-*T. gondii*). As bandas observadas apresentaram um rastro ao longo do gel (arraste ou *rocket tail*), podendo estar relacionado a qualidade do DNA extraído e o método de extração (Tabela 4, Figura 1).

Tabela 4- Amplificação pela reação em cadeia da polimerase (*primers* JW58 e JW 59) das amostras de DNA extraídas pelo método clássico e expressão de bandas no gel.

Amostras – DNA (LA) Extraídas por método clássico	PCR (JW58 e JW59) Expressão de Bandas
1- LSL	B
2- DAFS	B
3- YBL	B
4- SCSO	B
5- DCO	S/B
6- CSL	S/B
7- EKSM	S/B
8- JGG	B
9- IS	B
10- ARP	B
11- EPS	B
12- KCB	B
13- ERJ	B (<i>Fading</i>)

LA- líquido amniótico, B- banda, S/B- sem banda visível

Não foram observadas bandas nas amostras de água (controle de contaminação), nem nas amostras de controle negativo (Células Vero isentas de parasitos) e de especificidade (NC-1, *Neospora caninum*). Das 13 amostras clínicas de DNA (LA) extraído pelo método clássico, 04 (30,7%) não expressaram bandas visíveis DCO, CSL, EKSM e ERJ (posições não visíveis no gel: 15, 16, 17, 18).

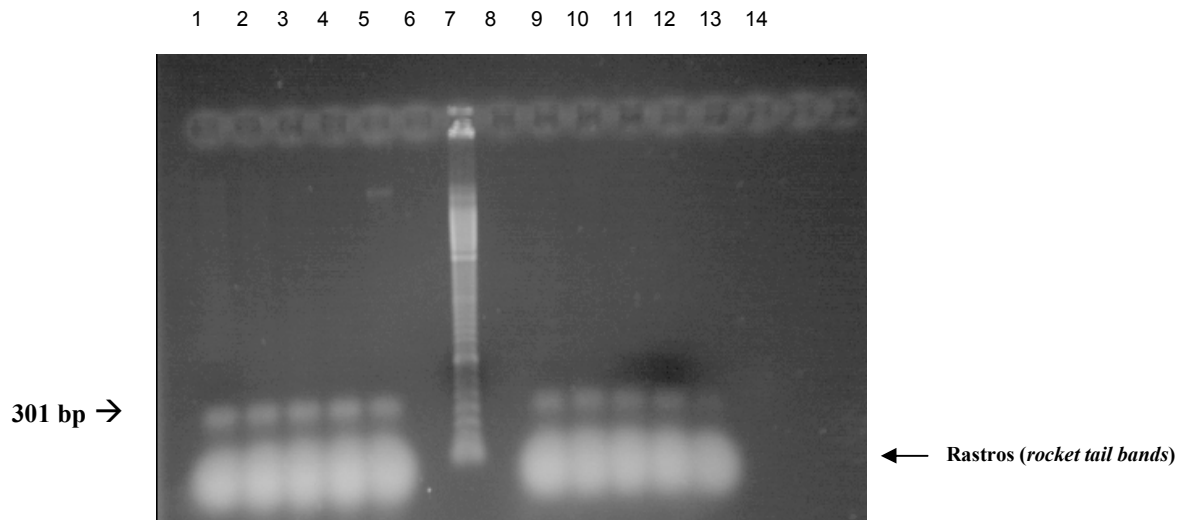


Figura 1: Amplificação do DNA extraído pelo método clássico (presença de rastros no gel), com os primers JW58 e 59 (gene *B1*). Posições das Bandas: 1(LSL), 2(DAFS), 3(YBL), 4(SCSO), 5(Controle Positivo / RH-*T. gondii*), 6(Controle de Água), 7(Marcador de Massa Molecular - múltiplos de 100pb), 8(Controle Negativo – Cultivo Células Vero), 9(JGG),10(IS), 11(ARP), 12(EPS), 13(KCB), 14(NC-1- *N. caninum*). Amostras não amplificadas: 15(DCO), 16(CSL),17(EKSM), 18(ERJ). Perfil de banda Positiva: 301bp. Pente Plástico (22 poços).

As quatro amostras de DNA extraídas pelo método clássico (DCO, CSL, EKSM e ERJ) que não expressaram bandas, foram novamente submetidas a PCR (primers JW58 e JW59), contudo com DNA obtido por extração pelo método *Salting Out*. As amostras expressaram bandas visíveis e bem definidas sem rastros no gel, após visualização no transiluminador (UV) (Tabela 5 e Figura 2).

Tabela 5: Amplificação pela reação em cadeia da polimerase (com *primers* JW58 e 59) de amostras de DNA de taquizóitos de *T. gondii* em líquido amniótico, extraídas pelo método *Salting Out* e expressão de bandas amplificadas no gel.

Amostras – DNA (LA) Extraídas por método <i>Salting Out</i> (Posição no Gel)	PCR (<i>primers</i> JW58 e JW59) Expressão de bandas no gel pós- eletroforese
1- DCO	B
2- CSL	B
3- EKSM	B
6- ERJ	B

LA- líquido amniótico, B – banda visível

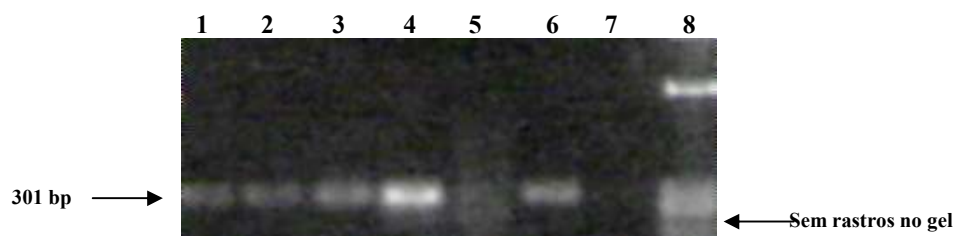


Figura 2: Bandas visíveis e definidas (ausência de rastro no gel) após amplificação pela PCR (JW58 e JW59). Amostras extraídas pelo método *Salting Out*. (Foto digitalizada). Posições: 1(DCO), 2(CSL), 3(EKSM), 4-Controle Positivo (RH-*T. gondii*), 5 Controle Negativo (Cultivo Celular), 6(ERJ), 7(Controle de Água), 8(Marcador de Massa Molecular- múltiplos de 100pb). Perfil eletroforético: 301 bp.

As amostras de DNA extraídas pelo método clássico e que foram amplificadas expressando bandas (Figura 1), foram re-extraídas pelo método *Salting Out*, e amplificadas pela PCR com os primers JW58 e JW59, e expressaram bandas sem a presença de rastros no gel, mais definidas, mas menos evidentes (Figura 3).

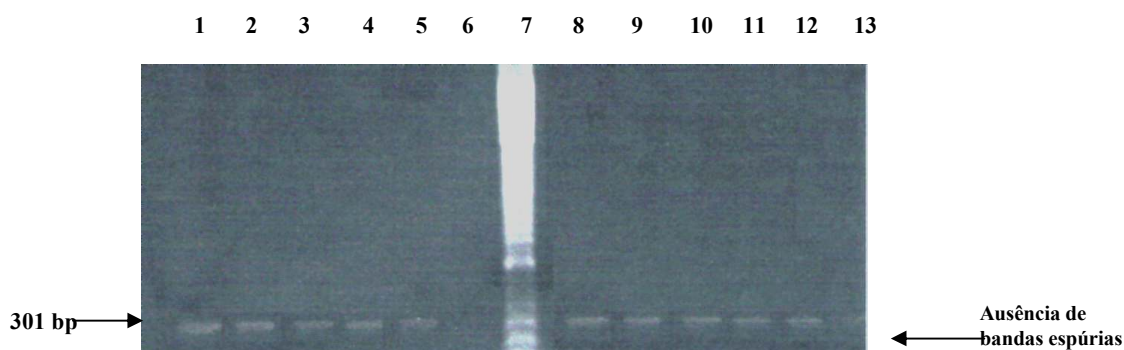


Figura 3: Amplificação do DNA (extraído por *Salting Out*), com os *primers* JW58 e 59 (gene *B1*). Posições das Bandas: 1(LSL), 2 (DAFS), 3 (YBL), 4 (SCSO), 5 (Controle Positivo / RH-*T. gondii*), 6 (Control Negativo), 7 (Marcador de Massa Molecular - múltiplos de 100pb), 8 (JGG), 9 (IS), 10 (ARP), 11 (EPS), 12 (KCB), 13 (Água). Perfil eletroforético – 301bp.

As amostras de DNA extraídas pelo método clássico foram utilizadas para a amplificação das porções terminais 5' e 3' do gene *SAG2* do *T. gondii* pela técnica de Nested-PCR e restrição enzimática com as enzimas *Sau3AI* e *HhaI*.

Do total de amostras de DNA utilizadas para a amplificação, somente oito (61,5%) resultaram em bandas observáveis, mas sem possibilidade de realização de restrição enzimática e 5 (38,5%) não expressaram bandas (Tabela 6). Em nenhuma amostra foi realizado método de restrição enzimática.

Tabela 6: Amplificação das porções terminais 5' e 3' do gene *SAG2* pela técnica de “*restriction fragment length polymorphisms*” (RFLP-PCR), com de DNA de *T. gondii* obtido em amostras de líquido amniótico extraídas pelo método clássico.

Amostras – DNA (LA)	Expressão de Bandas
Método Clássico	
LSL	S/B
DAFS	S/B
YBL	FB
SCSO	S/B
DCO	FB
CSL	S/B
EKSM	S/B
JGG	FB
IS	FB
ARP	FB
EPS	FB
KCB	FB
ERJ	FB

LA- líquido amniótico, S/B- sem banda, FB- *fading band* (evanescente)

Todas as amostras de DNA foram submetidas a uma nova extração pelo método *Salting Out* (SO). Após a extração, o método utilizado para quantificação foi espectrofotometria, onde se comparou as concentrações dos DNAs extraídos por SO e pelo método clássico. Avaliou-se também o grau de pureza das amostras, pela relação A260/A280. Os parâmetros de avaliação de concentração e grau de pureza estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7: Análise espectrofométrica de concentração e grau de pureza das amostras de DNA (*T. gondii*) obtidas de líquido amniótico de gestantes, e extraídas pelos métodos Clássico e *Salting Out*.

Espectrofotometria – [] de DNA extraído por método clássico (µg/mL)	Grau de Pureza – Razão: A260/280 (1.000 – 1.5000)	Espectrofotometria – [] de DNA extraído por método SO (µg/mL)	Grau de Pureza – Razão: A260/280 (1.000 – 1.5000)
185	0.989	165	1.501
280	0.899	248	1.448
180	0.910	158	1.489
220	0.960	180	1.490
180	0.800	155	1.406
182	0.820	158	1.410
295	0.822	249	1.430
225	0.889	185	1.480
160	0.870	148	1.449
195	0.940	169	1.504
185	0.935	158	1.480
222	0.950	199	1.499
298	0.799	249	1.409
[] Média : 215,9 µg/mL	Média: 0.929	[] Média: 186.2 µg/mL	Média: 1.461

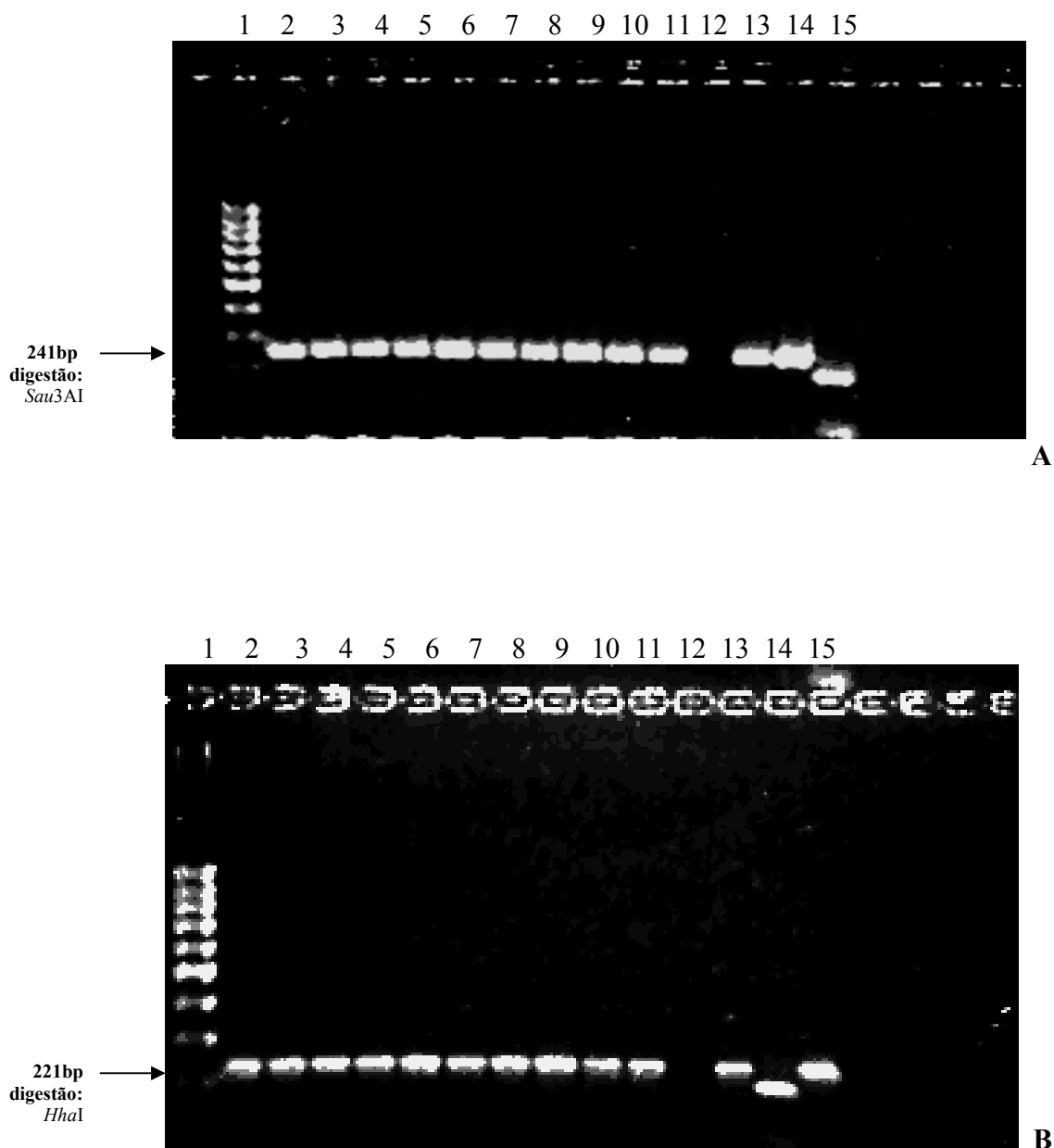
As amostras de DNA extraídas por SO, foram novamente amplificadas para o gene *SAG2*. Todas as amostras revelaram a expressão de bandas após corrida eletroforética e restrição enzimática, quando comparadas às amostras controle dos genótipos I (RH), II (Me49) e III (C56) de *T. gondii*. As bandas expressas, não

apresentaram bandas espúrias, nem rastros ao longo do gel (Figuras 4 A e B, 5 A e B). Todas as amostras (100%) revelaram a prevalência do genótipo I, após a restrição enzimática (com as enzimas *Sau3AI* e *HhaI*) (Tabela 8).

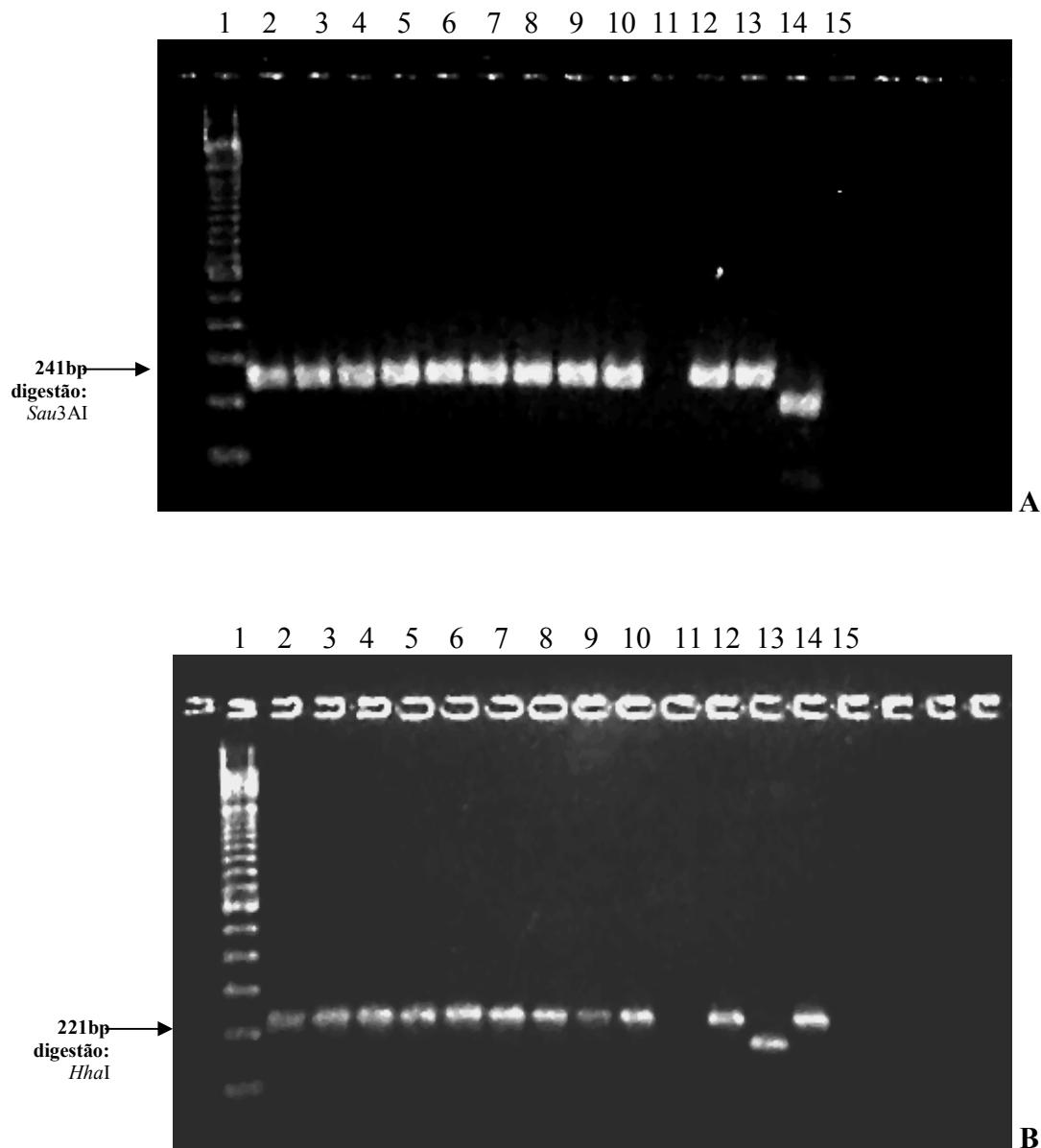
Tabela 8: Genotipagem pela técnica de “*restriction fragment length polymorphisms*” (RFLP-PCR) e restrição enzimática em 13 amostras de DNA (*T. gondii*) obtidas de líquido amniótico e de camada leucocitária (sg) de gestantes, e extraídos pelo método *Salting Out* e expressão de bandas no gel.

Amostras de DNA (SO)	RFLP-PCR porção 5´ (Bandas)	Genótipo I,II,III (restrição enzimática)	RFLP-PCR porção 3´ (Bandas)	Genótipo I,II,III (restrição enzimática)
1- LSL (LA)	B	I	B	I
2- DAFS (LA)	B	I	B	I
3- YBL (LA)	B	I	B	I
4- SCSO (LA)	B	I	B	I
5- DCO (LA)	B	I	B	I
6- CSL (LA)	B	I	B	I
7- EKSM (LA)	B	I	B	I
8- JGG (LA)	B	I	B	I
9- IS (LA)	B	I	B	I
10- ARP (LA)	B	I	B	I
11- EPS (LA)	B	I	B	I
12- KCB (LA)	B	I	B	I
13- ERJ (LA)	B	I	B	I
2- DAFS (Sg)	B	I	B	I

13 amostras de LA e 1 de camada Leucocitária (Sg) , Genótipo-I em 100% das amostras.



Figuras 4: Produtos da reação em cadeia da polimerase da porção terminal 5' do *locus SAG2* (A) e 3' do mesmo *locus* (B) Posições no Gel: 1. Marcador de Massa Molecular – múltiplos de 100pb, 2. LSL, 3. DAFS-LA, 4. YBL, 5. SCSO, 6. DCO, 7. CSL, 8. EKSM, 9. JGG, 10. Controle positivo de extração – amostra RH, 11. Controle positivo de amplificação – amostra RH, 12. canaleta vazia, 13. Cepa referência – genótipo I, 14. Cepa referência – genótipo II, 15. Cepa referência genótipo III. Perfil eletroforético para a porção 5' do *locus SAG2*: 241pb e digestão pela *Sau3AI*. Perfil eletroforético para a porção 3' do *locus SAG2*: 221pb e digestão pela *HhaI*.



Figuras 5: Produtos de PCR da porção terminal 5' do *locus SAG2* (A) e e 3' do mesmo *locus* (B) Posições no Gel: 1. Marcador de Massa Molecular – múltiplos de 100pb, 2. IS, 3. ARP, 4. EPS, 5. KCB, 6. ERJ, 7. DAFS-Sg, 8. Controle positivo de extração – amostra RH, 9. Controle positivo de amplificação – amostra RH, 10. Controle Positivo – Nested PCR, 11. Canaleta vazia, 12. Cepa referência – genótipo I, 13. Cepa referência – genótipo II, 14. Cepa referência genótipo III. Perfil eletroforético para a porção 5' do *locus SAG2*: 241pb e digestão pela *Sau3AI*. Perfil eletroforético para a porção 3' do *locus SAG2*: 221pb e digestão pela *HhaI*.

DISCUSSÃO

O diagnóstico pré-natal de toxoplasmose é uma importante ferramenta clínica para monitorar mulheres gestantes ao longo dos trimestres gestacionais, visando minimizar potenciais seqüelas advindas desta infecção. Neste estudo, foram analisadas amostras biológicas (13 de LA e 1 de sangue) de 13 gestantes com diagnóstico sorológico prévio de toxoplasmose aguda (IgM+/IgG-).

As amostras de LA foram também processadas para o isolamento *in vivo* e *in vitro*. Contudo estas técnicas de isolamento em cultivo celular e em camundongos são de uso mais limitado, e mais restritas a laboratórios de Institutos de pesquisa ou em Universidades, do que para uso em rotina laboratorial.

O uso da PCR-*in house* para o gene *B1*, dado a sua facilidade de execução e rapidez na obtenção de resultados, independentemente do isolamento *in vivo* e *in vitro*, deve preceder o *Nested-PCR* para o *locus* do gene *SAG2*. Este protocolo obteve bons resultados relacionados a amostras de LA, e poderia ser viabilizado para implantação em rotina laboratorial em serviços públicos.

Assim, este trabalho pretendeu detectar o DNA do *T. gondii* em amostras de LA obtidas por AM de gestantes com indicação diagnóstica de toxoplasmose aguda e recente, buscando desta forma avaliar a persistência dos parasitas, apesar da terapia instituída.

Após a verificação inicial pela PCR-*In house* com *primers* para o gene *B1* (Pelloux *et al.*, 1996) nas referidas amostras, foi realizada a caracterização

molecular das cepas isoladas por *Nested*-PCR para as regiões terminais 5' e 3' do *locus* do gene *SAG2*, seguido de restrição enzimática para estas regiões com as endonucleases : *Sau* 3AI e *Hha*I (Fuentes *et al.* 2001).

Os resultados obtidos a partir da amplificação inicial com os *primers* JW58 e JW59 (gene *B1*) revelaram que das 13 amostras clínicas de DNA genômico de amostras de LA, 04 (30,7%) não expressaram bandas visíveis, correspondendo a amostras das pacientes: DCO, CSL, EKSM e ERJ, e 9 amostras amplificaram (69,2%) expressando bandas visíveis (LSL, DAFS, YBL, SCSO, JGG, IS, ARP, EPS, KCB), uma amostra (11,1%) entre as nove bandas visíveis (amostra – KCB) expressou “*fading band*” (banda evanescente). O perfil eletroforético foi compatível produto de amplificação de 301bp, na mesma posição do controle positivo (RH-*T. gondii*).

Quando observadas em UV, os produtos de amplificação apresentaram um rastro ao longo do gel (arraste ou *rocket tail*), demonstrando possivelmente relação com a qualidade do DNA extraído e o método de extração (método clássico: fenol/clorofórmio/etanol) (Hirata, 2002, Raggi *et al.*, 2003). Alíquotas de sedimento foram usadas para extração de DNA por outro método (*Salting out*), e a amplificação pelos mesmos *primers* revelaram que amostras expressaram bandas com 301 bp, visíveis e bem definidas.

As nove amostras que expressaram bandas (degradadas) na primeira amplificação foram re-extraídas pelo método *Salting Out* e amplificadas pela PCR com os *primers* (JW58 e 59), e expressaram bandas mais definidas com ausência de rastros. Contudo, menos evidentes quando exposta a radiação UV. O possível motivo seria a re-extração direta a partir do DNA extraído por outro método, e não

de alíquotas a partir da amostra original (LA). Para avaliar uma outra variável, as amostras extraídas pelo método inicial (clássico), foram submetidas a amplificação para as porções terminais 5'e 3'do *locus* do gene *SAG2*, e o resultado, já esperado, demonstrou que do total de amostras de DNA utilizadas para a amplificação, somente 8 (61,5%) resultaram em bandas observáveis (*fading bands*), mas sem possibilidade de realização de restrição enzimática, e 5 amostras (38,5%) não expressaram bandas.

Ficou evidente, que as amostras extraídas pelo método clássico estariam interferindo ou inibindo a amplificação dos produtos de PCR, não somente para os *primers* JW58 e JW59, mas também na amplificação com os *primers* para *SAG2*.

A causa mais provável seria resíduos protéicos ou traços fenólicos comuns em extração químicas agressivas, como o método clássico (Hirata, 2002). A escolha do método de extração e qualidade do DNA purificado para amostras como LA (fluido podendo conter parasitas e células de descamação do feto em baixa concentração) foi uma etapa crítica para a otimização do protocolo de amplificação, tanto para o gene *B1* como para o *SAG2*. Para confirmar se a interferência na amplificação, ou mesmo inibição da amplificação estaria relacionada a qualidade do DNA por método de extração, as amostras extraídas por ambos métodos foram submetidas a espectrofotometria (pela relação A260/A280nm) para verificar a presença ou não de traços protéicos, resíduos químicos ou resíduos de sal.

Nas análises espectrofotométricas, a média da concentração de DNA recuperado pelo método clássico foi 215 µg/mL, enquanto que pelo método SO foi 186.2 µg/mL. Embora a concentração média de DNA recuperado da amostra pelo

método clássico tenha sido maior em relação ao método de SO, a melhor média associada a grau de pureza (GP) foi das amostras extraídas pelo SO. O (GP) foi estabelecido pela razão A_{260}/A_{280nm} , e o GP médio das amostras de DNA extraídas pelo método de SO foi 1.461 (*range* 1,409 a 1,504), e das amostras pelo método clássico o GP foi 0.929 (*range* 0.799 a 0.989), indicando que o DNA com maior grau de impurezas protéico-químicas foram das amostras extraídas pelo método clássico.

Estes dados corroboram os resultados encontrados por Pelloux *et al.*, 1998 e do grupo BIOMED-2 da UE, em estudo multicêntrico (15 laboratórios de referência da UE) para avaliar métodos e protocolos relacionados a PCR para o *T. gondii*. Raggi *et al.* (2003) também demonstraram a correlação entre a qualidade do DNA extraído e a otimização de protocolos moleculares.

O tempo gasto para extrair DNA por SO foi 3h e 20 min. e para o método clássico 5h e 15 min, indicando um aspecto favorável quanto a relação operacional por tempo despendido.

Quanto a biossegurança e custo-benefício técnico-administrativo associados aos protocolos de extração, como: necessidade de uso de equipamentos de proteção individual e coletivo (EPIs e EPCs), dado a toxicidade dos reagentes empregados no método clássico (fenol e clorofórmio), enquanto que o método SO, por não usar reagentes tóxicos, o uso de EPIs e EPCs foi mais limitado, além da menor quantidade de uso de reagentes, implicando diretamente no custo operacional do procedimento.

Os protocolos de extração passam a ter importância quando serviços públicos pretendem viabilizar o uso de ferramentas moleculares para rotina

laboratorial, e as técnicas moleculares ainda são referidas como necessárias, porém, de alto custo.

Para a implantação do diagnóstico molecular no serviço público três parâmetros devem ser avaliados: científico, técnico e administrativo pois estes podem influenciar na qualidade dos exames, e na segurança de resultados e em sua viabilidade operacional (Pelloux *et al.*, 1998; Raggi *et al.*, 2003).

Para a caracterização molecular por RFLP-PCR, foram utilizadas as mesmas amostras de DNA de LA (13) e Sangue (1) extraídas por SO, e os resultados obtidos foram confirmados pela amplificação de todas as amostras e controles (100%), além da qualidade das bandas observadas em todas as etapas de dupla amplificação para as porções terminais 5' e 3' do *locus* do gene *SAG2*, até a digestão enzimática para a determinação do genótipos.

Os genótipos encontrados nas cepas isoladas foram 100% do tipo-I. Estes resultados são similares aos obtidos por Fuentes *et al.*, 2001, e referendado em publicação de Soares, 2004. A amplificação pela PCR seguido de caracterização molecular e digestão enzimática para definição do genótipo do parasita isolado, deve ser preferencialmente utilizada a partir de amostras originais, uma vez que amostras isoladas *in vitro* ou *in vivo* podem apresentar diferenças genotípicas induzidas por diferenciação e seleção ao longo das passagens nos cultivos celulares e durante as passagens IP em camundongos (Fuentes *et al.*, 2001; Soares, 2004).

Os genótipos de *T. gondii* mais prevalentes e relacionados a toxoplasmose em gestantes é do tipo-II, contudo estes resultados encontram-se relacionados à

análises moleculares a partir de material obtido de isolamento *in vivo* ou *in vitro* (Literák & Rychlík, 1999; Dardé, 2004).

O genótipo do tipo-I é mais prevalente em casos de TC quando a amostra utilizada para amplificação e genotipagem é a partir de alíquotas originais (Fuentes *et al.*, 2001; Terry *et al.*, 2001; Soares, 2004). O genótipo mais prevalente em humanos é do tipo-II, contudo em pacientes com alguma forma de imunocomprometimento (pacientes com AIDS) (Howe *et al.*, 1997; Honoré *et al.*, 2000; Ajszenberg *et al.*, 2002). Fuentes *et al.*, 2001, observaram uma prevalência de genótipo do tipo-II em pacientes transplantados (imunossupressão medicamentosa). Estes autores realizaram a caracterização molecular a partir de amostras clínicas originais, sem o uso prévio de amostras oriundas de isolados de cultivo celular ou de camundongo.

Os genótipos do tipo II e III são mais encontrados em animais (Dardé, 2004, Soares, 2004). Esta informação pode evidenciar a hipótese de que o processo de obtenção de amostras de DNA de *Toxoplasma gondii*, através de isolamento em camundongos possa selecionar determinadas linhagens do parasito (Soares, 2004).

Assim, a forma como foi conduzida a organização deste estudo, quanto a obtenção, processamento de amostras, realização de amplificação e genotipagem, a partir de amostras clínicas originais (LA e Sangue) condizem com as publicações acima citadas.

A limitação do número de gestantes incluídas neste estudo (n= 13), ocorreu principalmente em função dos riscos associados à amniocentese, além da dificuldade associada ao contato e esclarecimento às gestantes com indicação

clínica e sorológica de toxoplasmose durante o atendimento pré-natal nas US ou nas dependências do HC-UFPR. Não havia garantia de que as gestantes (com perfil sorológico de toxoplasmose), mesmo após a consulta informativa, retornariam para a próxima consulta, ou mesmo participar da entrevista com o pesquisador responsável pelo estudo.

Outro fator relevante associado a esta casuísta, foi a limitação recomendada pelo CEP-HC-UFPR quanto ao número de gestantes incluídas no estudo e que seriam submetidas a procedimentos invasivos. Assim, o todo o projeto deveria ser novamente submetido a aprovação do CEP, caso o número de gestantes estivesse próximo de 20.

O estabelecer uma clara correlação entre possíveis manifestações clínicas e o genótipo prevalente.

Os resultados deste estudo demonstram a clara necessidade do uso de ferramentas moleculares para a confirmação de infecção no período pré-natal, em gestantes com indicação clínica e laboratorial de toxoplasmose nas fases aguda e recente da infecção, e avaliar as cepas de *Toxoplasma gondii* persistentes e presentes em amostras de LA e em células de descamação do feto.

Foi observado que para o estabelecimento de uma correlação entre os genótipos de parasitas isolados e caracterizados molecularmente e as drogas administradas ao longo dos trimestres gestacionais, seria necessário o acompanhamento da gestante e do RN por um intervalo entre seis meses a um ano, para verificar possíveis manifestações clínicas dentro deste período.

Quanto ao controle de qualidade, ficou evidente a necessidade de utilização de amostras de DNA genômico com bom grau de pureza, para evitar possíveis

interferências durante a amplificação pela PCR e conseqüentemente inviabilizar a determinação do genótipo por RFLP-PCR. Para o protocolo de amplificação, foram também utilizados controles de contaminação para evitar resultados FP, como o uso da UNG em ciclo pré-amplificação, além de controles de negativos e de água, contudo não foi possível o uso do controle interno de amplificação (pSYC44, de plasmídeo) para evitar resultados FN, como descrito por Pelloux *et al.*, 1996.

A experiência européia com padronizações e controles de qualidades interlaboratórios, permitiu avaliar a necessidade de implantação nos serviços de assistência pública (e também privada) a gestantes, de controles internos e externos relacionados ao diagnóstico da toxoplasmose (Pelloux *et al.*, 1996; Raggi *et al.*, 2003).

Quanto aos estudos relacionados à determinação de genótipos de *T. gondii* em nossa região (e no país), são de extrema significância para a compreensão dos mecanismos de uso das drogas protocolares com as cepas prevalentes.

Contudo, a maioria das Informações sobre a estrutura de populações de *T. gondii*, são observadas em publicações européias (a maioria da França), e América do Norte (Howe & Sibley, 1995; Ajzenberg *et al.*, 2002, Dardé, 2004), enquanto que formas isoladas deste parasito em outras regiões, como em países latinos americanos, incluindo o Brasil, ainda precisam ser mapeadas e analisadas, e estas cepas podem apresentar diferentes linhagens, isto em função da característica do próprio parasita.

Grigg *et al.* (2001) observaram que muitos *loci* exibem somente 2 alelos, e por hipótese a população estudada de *T. gondii* poderia possuir dois ancestrais distintos, e que as 3 linhagens observadas até então, seriam o resultado de

recombinação entre essas linhagens ancestrais. A atual população clonal não descarta a possibilidade de recombinação entre os três tipos de genótipos (I,II,III) (Soares, 2004, Dardé, 2004). Assim, cepas isoladas em regiões distintas podem apresentar aspectos de patogenicidade também distintos.

As amostras isoladas neste estudo foram criopreservadas para estudos posteriores com outros marcadores para determinar graus de polimorfismo existente entre os isolados. Há muito que ser esclarecido em termos da relação fisiopatológica e de comportamento das cepas de *T. gondii* por regiões, e o uso de drogas antiparasitárias, uma vez que não há garantia de eliminação do parasita mesmo com o uso desta drogas. Este estudo poderá fornecer bases técnicas e científicas necessárias a compreensão de epidemiologia da associação entre o parasita e o genótipo com a toxoplasmose em gestantes, e as conseqüências clínicas decorrentes. A continuidade deste estudo permitirá novas avaliações sobre o genótipo prevalente, ou genótipos associados, na população de gestantes da Cidade de Curitiba, assim como de outras regiões do Brasil, e direcionar novos estudos relacionados a virulência das cepas em relação as drogas utilizadas no tratamento protocolar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ajzenberg, D.; Cogné, N.; Paris, L.; Bessièrès, M. H.; Thulliez, P.; Filisetti, D.; Pelloux, H.; Marty P.; Dardé, M. L. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* Isolates Associated with Human Congenital Toxoplasmosis, and Correlation with Clinical Findings. **J Infect Dis.** v. 186, n. 5, p. 684 - 689, 2002.

Binquet, C.; Wallon, M.; Metral, P.; Gadreau, M.; Quantin, C.; Peyron, F. Toxoplasmosis seroconversion in pregnant women. The differing attitudes in France. **Presse Med.** v. 33, n. 12, p. 775 – 779, 2004.

Buffone, G.J. and Darlington, G.J. Isolation of DNA from Biological Specimens without Extraction with Phenol. **Clin Chem.** v. 31, n. 1, p. 164 – 165, 1985.

Burg, J.I.; Grover, G.M.; Pouletty, P. *et al.* Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii* by polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol.** v. 8, n. 27, p. 1787 – 1792, 1989.

Camargo ME. **Toxoplasmosis.** In: Ferreira A.W, Ávila SLM (Eds.) Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes, Ed. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, p. 165-174, 1996.

Cantos, G.A.A.; Prando, M.D.; Siqueira, M.V.; Teixeira, R.M. Toxoplasmose: ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e diagnóstico. **Rev da Assoc Med Bras.** v. 46, n. 4, p. 335 - 341, 2000.

Cristina, N.; Dardé, M.L.; Boudin, C.; Tavernier, G.; Pestre-Alexandre, M. and Ambroise-Thomas, P. A DNA fingerprinting method for individual characterization of *Toxoplasma gondii* strains: combination with isoenzymatic characters for determination of linkage groups. **Parasitol.** v. 81, n. 1, p. 32 –33, 1995.

Dardé, M.L., Bouteille, and M. Pestre-Alexandre. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. **J Parasitol.** v. 78, n. 5, p. 786 – 794, 1992.

Dardé M L. Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. **Ann Ist Super Sanita.** v. 40, n. 1, p. 57 - 63, 2004.

Davis L,G.*et al.* **Basic Methods in Molecular Biology.** Agarose Gel Electrophoresis. Elsevier, 1986.

Dubey, J.P. & Beattie, C.P. Toxoplasmose of animals and man. Boca Raton. **CRC Press.** p. 1- 220, 1988.

Fillisetti, D.; Gorcii, M.; Pernot-marino, E.; Villard, O. and Candolfi, E. Diagnosis of congenital toxoplasmosis: comparison of targets for detection of *Toxoplasma gondii* by PCR. **J Clin Microbiol.** v. 41, n. 10, p. 4826 - 4828, 2003.

Fuentes, I., Rubio, J.M., Ramirez, C. and Alvar, J. Genotypic Characterization of *Toxoplasma gondii* Strains Associated with Human Toxoplasmosis in Spain: Direct Analysis from Clinical Samples. **J Clin Microbiol.** v. 39, n. 4, p. 1566 -1570, 2001

Gross, U.; Roggenkamp, A.; Janitschke, K.; Heesemann, J. Improved sensitivity of the polymerase chain reaction for detection of *Toxoplasma gondii* in biological and human clinical specimens. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** v. 11, n. 1, p. 33 – 39, 1992.

Grover, C. M.; Thulliez, P.; Remington, J. S.; Boothroyd, J. C.. Rapid prenatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid. **J Clin Microbiol.** v. 28, n. 10, p. 2297 - 2301, 1990.

Guo, Z.G. and Johnson, A.M. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* strain by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. **Parasitol.** v. 111, (parte 2), p. 127–132, 1995.

Hill, D., Dubey, J.P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clin Microbiol Infec.** v. 8, n. 10, p. 634 – 640, 2002.

Hirata, M.H. **Manual de Biossegurança.** Ed. Manole, 1ª. Ed., São Paulo, 2002.

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 Engl J Med.** v. 331, n. 11, p. 695 - 699, 1994.

Honoré, S.; Couvelard, A.; Garin, Y.J.F.; Bedel, C.; Hénin, D.; Daré, M.L.; Derouin, F. Génotypage des souches de *Toxoplasma gondii* chez des patients immunodéprimés. **Pathol Biol.** v. 48, n. 6, p. 541 – 547, 2000.

Howe, D.K.; Honore, S.; Derouin, F.; Sibley, L.D. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. **J Clin Microbiol.** v. 35, n. 6, p. 1411 - 1414, 1997.

Ho-Yen, D. O.; Joss A.W.; Balfour, A.H.; Smyth, E.T.; Baird, D.; Chatterton, J.M. Use of the polymerase chain reaction to detect *Toxoplasma gondii* in human blood samples. **J Clin Pathol.** v. 45, n. 10, p. 910 - 913, 1992.

Israelski, D.M. & Remington, J.S. Toxoplasmosis in patients with cancer. **Clin Infect Dis.** 1993, v. 17, n. 2, p. 423 - 435, 1993.

Jackson, D.P.; Lewis, F.A.; Taylor, G.R. *et al.* Tissue extraction of DNA and RNA analysis by polymerase chain reaction. **J Clin Pathol.** v. 43, n. 3, p. 499 - 504, 1990.

Jacquier, P.; Nadal, D.; Zuber, P.; Eckert, J. The status of infection with *Toxoplasma gondii* in the Swiss population: contribution of a seroepidemiologic study from the Zurich canton. **Schweiz Med Wochenschr Suppl.** v. 65, suppl. 23 S- 28S, 1995.

Jones, C.D.; Okhravi, N.; Adamson, P.; Tasker, S. and Susan Lightman. Comparison of PCR Detection Methods for B1, P30, and 18S rDNA Genes of *T. gondii* in Aqueous Humor. **Invest Ophthal & Vis Science.** v. 41, n. 3, 2000.

Khurana, S., Dubey, M.L., Malla N. Association of Parasitic Infections and Cancers. **Ind J Med Microbiol.** v. 23, n. 2, p. 74 - 79, 2005.

Lewden, C.; Salmon, D.; Morlat, P.; Bévilacqua, S.; Jouglu, E.; Bonnet, F.; Héripret, L.; Costagliola, D.; May, T.; Chêne, G. and the Mortality 2000 study group. Infectious Diseases. Causes of death among human immunodeficiency virus (HIV)-infected adults in the era of potent antiretroviral therapy: emerging role of hepatitis and cancers, persistent role of AIDS. **Intl J Epidemiol.** v. 34, n. 1, p. 121–130, 2005.

Literák, I.; Rychlík, I. Genome Changes in the *Toxoplasma gondii* Strains During Laboratory Passages in Mice. **Acta Vet Brno.** v. 68, n. 3, p. 203 – 208, 1999.

Lopez, A, Dietz VJ, Wilson M, Navin TR, Jones J.L. Preventing Congenital Toxoplasmosis. **M M W R – Recommendations and Reports.** v. 49, (RR02), p. 57-75, 2000.

Miller, S.A.; Dykes, D.D.; Polesky, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucl Acids Res.** v.16, n. 3, p. 1215, 1988.

Pelloux, H.; Weiss J.; Simon, J.; Muet, F.; Fricker-Hidalgo, H.; Goultier-Fleuret, A.; Ambroise Thomas, P. A new set of primers for the detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid using polymerase chain reaction. **FEMS Microbiol Lett.** v. 138, n. 1, p. 11 – 15, 1996

Pelloux, H., Fricker-Hidalgo, H., Pons, J.C., Bost-Brut, C., Brenier-Pinchart, M.P., Jouk, P.S., Ambroise-Thomas, P. Congenital toxoplasmosis: prevention in the pregnant woman and management of the neonate. **Arch Pediatr.** v. 9, n. 2, p. 206 - 212, 2002.

Persing, D.H. *In vitro* nucleic acid amplification techniques. In: Diagnostic Molecular Microbiology: principles and applications. Washington D.C.: **Am Soc for Microbiol,** p. 62 – 63, 1993.

Peyron, F.; Wallon, M. Options for the pharmacotherapy of toxoplasmosis during pregnancy. **Expert Opin Pharmacother.** v. 2, n. 8, p. 1269 - 1274, 2001.

Pinon, J.M.; Dumon, H.; Chemla, C.; Franck, J.; Petersen, E.; Lebech, M.; Zufferey, J.; Bessieres, M.-H.; Marty, P.; Holliman, R.; Johnson, J.; Luyasu, V.; Lecolier, B.; Guy, E.; Joynson, D.H.M.; Decoster, A.; Enders, G.; Pelloux, H. and Candolfi, E. Strategy for Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis: Evaluation of Methods Comparing Mothers and Newborns and Standard Methods for Postnatal Detection of Immunoglobulin G, M, and A Antibodies. **J Clin Microb**. v. 39, n. 6, p. 2267–2271, 2001.

Raggi, C.C.; Pinzani, P.; Paradiso, A.; Pazzagli, M. and Orlando.C. External Quality Assurance Program for PCR Amplification of genomic DNA: An Italian Experience. **Clin Chem**. v. 49, n. 5, p. 782 – 791, 2003.

Remington, J.S.; McLeod, R.; Desmonts G. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein J.O., editors. **Infec Dis of the Fetus and Newborn**. 5th ed. Philadelphia: WB Saunders. p. 205 – 346, 2001.

Remington, J.S.; Thulliez, P.; Montoya, J.G. Recent Developments for Diagnosis of Toxoplasmosis. **J Clin Microbiol**. v. 42, n. 3, p. 941 - 945, 2004.

Sambrook, J.; Fritsch, W.F. & Maniatis, T. Molecular cloning: a laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 2^a. Ed., 1989.

Sibley¹, L.D.; LeBlanc, A.J.; Pferfferkorn, E.R.; Boothroyd, J.C. Generation of a restriction fragment length polymorphism linkage map for *Toxoplasma gondii*. Genetics. v. 132, n. 4, p. 1003-1015, 1992.

Sibley², L.D. and Boothroyd, J.C. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. **Nature**. v. 359, p. 82– 85, 1992.

Spalding, S.M.; Amendoeira, M.R.R.; Coelho, J.M.C.; Angel, S.O. Otimização da reação em Cadeia da Polimerase para Detecção de *Toxoplasma gondii* em Sangue Venoso e Placenta de Gestantes. **J Bras Patol Med Lab**. v. 38, n. 2, p. 105 – 110, 2002.

Spalding, S.M.; Amendoeira, M.R.R.; Ribeiro, L.C.; Silveira, C.; Garcia, A.P. and Camillo-Coura, L. Estudo prospectivo de gestantes e seus bebês com risco de transmissão de toxoplasmose congênita em município do Rio Grande do Sul. **Rev da Soc Bras de Med Trop**. v. 36, n. 4, p. 483 - 491, 2003.

Soares, R.M. Caracterização Molecular de *Toxoplasma gondii*. **Rev Bras Parasitol Vet** 2004, v. 13, supl. 1. XIII Congresso Brasileiro de parasitologia Veterinária & I Simpósio Latino-Americano de Ricketisioses, Ouro Preto, MG, 2004.

Terry, R.S.; Smith, J.E.; Duncanson, P.; Hide, G. MGE-PCR: a novel approach to the analysis of *Toxoplasma gondii* strain differentiation using mobile genetic elements. **Int J Parasitol**. v. 31, p. 155- 161, 2001.

Wong, S.Y.; Remington, J.S. Toxoplasmosis in Pregnancy. *Clin Infect Dis In: Clin Infect Dis*. v. 20, n. 3, p. 720 - 729, 1995.

Yera, H.; Tzen, M. and Dupoy-Camet, J. Molecular biology for detection and characterization of protozoan infections in humans. *Europ J Protistol*. v. 39, n. 4, p. 435 – 443, 2003.

CONCLUSÕES

1. Das gestantes avaliadas, 53,03% apresentaram títulos de imunoglobulinas IgG+ e IgM- ou seja, eram pacientes imunizadas, não necessitando de acompanhamento clínico e laboratorial. 43,71% foram soronegativas para IgG- e IgM- representando população de risco de infecção e transmissão de *Toxoplasma gondii* durante o período gestacional., devendo portanto ser acompanhadas com exames laboratoriais até o último trimestre da gestação para evitar infecção aguda. 0,16% apresentaram IgG- e IgM+ sugerindo infecção recente e 3,10% apresentaram IgG+ e IgM+ dificultando a determinação do perfil imunológico da gestante; 0,64% apresentaram sorologia indeterminada;
2. Pacientes com IgG + e IgM + foram submetidos ao teste de avidéz. 28,3% apresentaram avidéz fraca compatível com infecção recente e 58,4% tiveram avidéz forte indicando infecção tardia e 13,3% foram considerados limitrofes (avidéz intermediária);
3. As cepas de *T. gondii* isoladas de líquido amniótico (*in vitro*) apresentaram taxa de crescimento lento quando comparadas às cepas referências de *T. gondii* ;
4. A cepa de *T. gondii* isolada de sangue de uma gestante em fase aguda de infecção (IgM+) antes do tratamento, apresentou taxa de crescimento mais rápido do que a cepa isolada de líquido amniótico, pós tratamento. A diferença no ritmo do crescimento do parasito, em cultivo *in vitro*, poderia ser explicada por alguma interferência do sistema imune do hospedeiro ou pelo tratamento;
5. O isolamento *in vivo* de *T. gondii* a partir de líquido amniótico apresentou resultados similares aos do isolamento *in vitro*, com crescimento lento e baixa concentração de parasitos, quando comparados às cepas referência RH de *T. gondii*;
6. O isolamento do parasito por métodos *in vivo* e *in vitro* não é adequado como ferramenta de diagnóstico de toxoplasmose congênita, em rotina laboratorial quando comparado a testes sorológicos e moleculares; pela demora na obtenção do resultado. Todavia, eles são importantes para avaliação de patogenicidade das cepas isoladas e podem ser usados em laboratórios de pesquisa para estudos epidemiológicos;

7. Na análise histopatológica de placenta pela coloração hematoxilina e eosina não foi possível detectar o protozoário, sendo observado apenas lesões macro e microscópicas.
8. Dentre os dois protocolos testados para extração de DNA de *Toxoplasma gondii*, o do método *salting out* mostrou-se mais eficiente por evitar interferências químico-protéicas nas etapas de amplificação e restrição enzimática;
9. A PCR mostrou-se ser um método rápido e eficiente na avaliação de infecção fetal, pois demonstrou a persistência de parasitos no líquido amniótico das gestantes tratadas com drogas antiparasitárias;
10. O genótipo prevalente de *Toxoplasma gondii* isolado das gestantes e determinado por PCR-RFLP, foi do Tipo I;
11. O emprego de metodologias diferentes para detecção da infecção toxoplásmica em gestantes aumenta a confiabilidade do diagnóstico e permite melhor planejamento das medidas a serem tomadas em relação à gestante e ao feto.

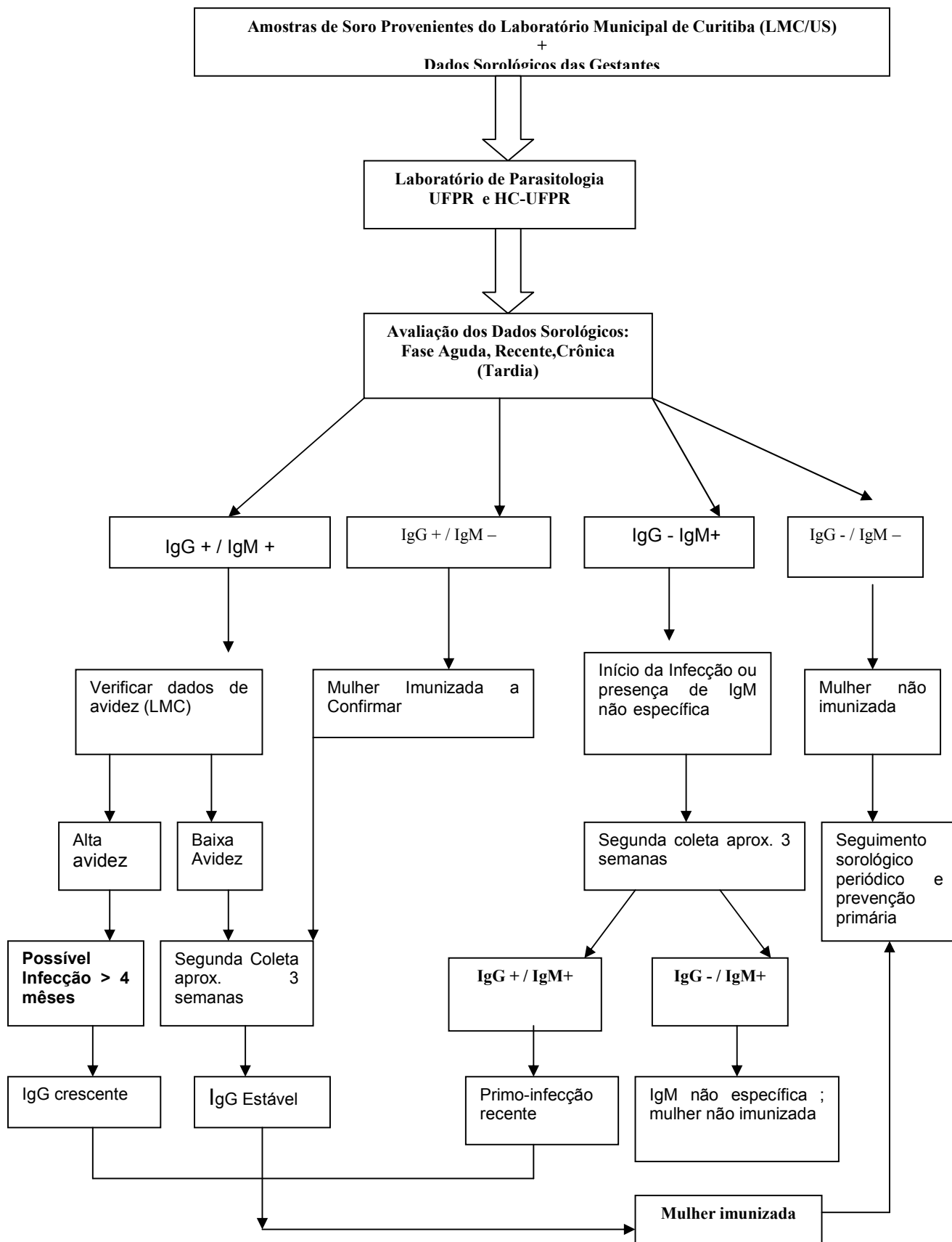
PERSPECTIVAS

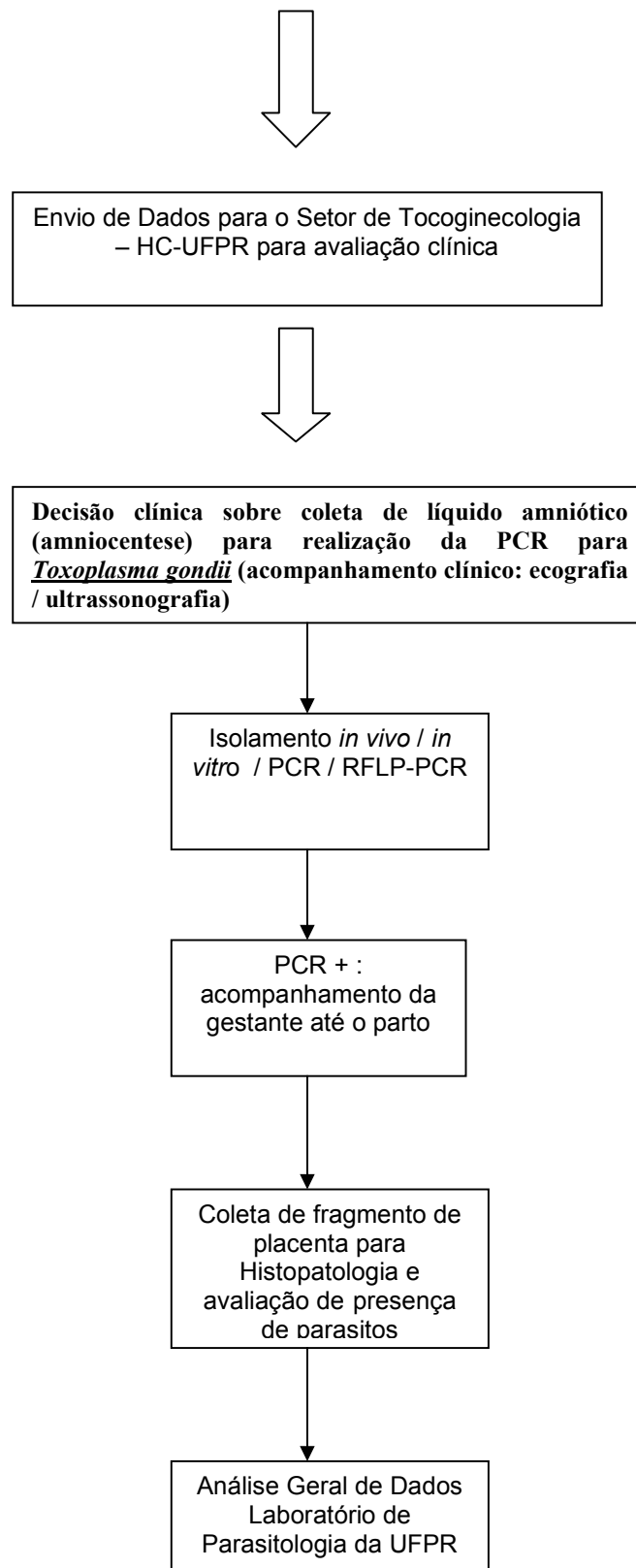
1. Avaliar a prevalência do(s) genótipo(s) em maior número de isolados de *Toxoplasma gondii* em gestantes na região de Curitiba e Estado do Paraná
2. Correlacionar o efeito das drogas usadas no tratamento de toxoplasmose e o efeito citopático produzido pelo protozoário em cultivo celular;
3. Avaliar, em cultivo celular, estresse químico, físico, e mecânico que possam influenciar na atenuação e a diminuição de patogenicidade cepas de *T. gondii* isoladas;
4. Viabilizar estudos de soroprevalência de toxoplasmose em população de doadores e receptores de sangue e hemoderivados;
5. Investigar fatores de risco transfusional de sangue e medula em receptores imunocomprometidos;
6. Isolar cepas de *T. gondii* em hemocomponentes, e definir o genótipo associado e persistência do parasito em condições de processamento e armazenamento pré-trasnfusionais.

ANEXO I

**ALGORITMO DO PROJETO TOXOPLASMOSE UFPR /
LMC / HC-TOCOGINECOLOGIA.**

Algoritmo - Projeto Toxoplasmose UFPR/LMC/HC-Tocoginecologia





ANEXO II

MÉTODOS DE IMUNOENSAIOS UTILIZADOS PELO LMC

MÉTODOS DE IMUNOENSAIOS UTILIZADOS PELO LMC

Período de 01/04/2003 a 18/02/2004

Protocolo Técnico - AxSYM® Toxo IgM

MEIA – ABBOTT: Imunoensaio Enzimático de Micropartículas para a determinação quantitativa de anticorpos IgM para o *Toxoplasma gondii* em soro ou plasma humanos.

Princípio

O ensaio AxSYM® Toxo IgM é um Imunoensaio Enzimático de Micropartículas para a determinação qualitativa de anticorpos IgM para *Toxoplasma gondii* em soro ou plasma humano (EDTA, heparina ou citrato de sódio), para auxiliar no diagnóstico de infecção aguda, recente ou reativa por *T.gondii*.

Reagentes

1 Frasco (7,8 mL) de partículas purificadas recobertas com *T.gondii* (derivada de cultura de células *HeLa*), micropartículas recobertas com tampão TRIS com estabilizantes de proteína. Conservantes: Agentes antimicrobianos. 1 Frasco (9,5 mL) de Conjugado de Anti-IgM Humano (origem caprina) contendo: Fosfatase Alcalina em tampão TRIS com estabilizantes de proteína, conservante: Azida Sódica. 1 Frasco (25,7 mL) de Diluente de Ensaio em tampão TRIS com estabilizantes de proteína. Conservantes: Agentes antimicrobianos. 1 Frasco (21,7 mL) de Tampão Citrato de Neutralização RF (Fator Reumatóide). Conservantes: Agentes antimicrobianos.

Calibração

Calibrador Index do AxSYM® Toxo IgM, 1 frasco (3 mL) de calibrador Index do AxSYM® Toxo IgM preparado com plasma de soro humano recalcificado reativo para *T.gondii* IgM Ab e não reativo para HBsAg, anti-HCV e anti-HIV-1/HIV-2.

Conservante: Azida sódica.

Controles

AxSYM® Toxo M Controles : 1 frasco (5 mL) de AxSYM® Toxo M Controle Negativo (**NEG**) são preparados com plasma humano recalcificado não-reativo para HBsAg, HIV-1Ag, anti-HCV e anti-HIV-1 / HIV-2 e *T.gondii* IgM, 1 frasco (5 mL) de AxSYM Toxo M Controle Positivo (**POS**) são preparados com anticorpo IgM anti-*T.gondii* (humano) em soro humano não reativo para HBsAg, HIV-1Ag, anti-HCV e anti-HIV-1/ HIV-2.

Resultado – Cálculos

O sistema AxSYM® calcula um Valor Index Toxo IgM baseado na proporção da taxa de amostra para a Taxa Média do Index Calibrador, para cada amostra e controle.

$$\text{Valor Index} = \frac{\text{Taxa da Amostra}}{\text{Taxa Média do Calibrador Index}}$$

Interpretação de Resultados

Amostras com Valores Index inferiores ou iguais a 0,499 são consideradas **não reativas** para anticorpo IgM para o *T.gondii*, pelos critérios do AxSYM® Toxo IgM. Os resultados não reativos reportados para o clínico devem incluir a seguinte observação: “Não reativa para anticorpos anti *Toxoplasma gondii* IGM. Este resultado foi obtido utilizando o ensaio AxSYM® Toxo IgM.

Amostras com Valores Index na faixa de 0,500 a 0,599 são consideradas **duvidosas** (zona cinza). Amostras interpretadas como duvidosas (zona cinza) podem conter níveis muito baixos de IgM. Amostras com resultados duvidosos devem ser retestadas. Se o reteste também apresentar resultado duvidoso essa amostra deve ser reportada como inconclusiva e testes adicionais são necessários para auxiliar no diagnóstico.

Amostras com Valores Index iguais ou superiores a 0,600 são consideradas **reativas** para anticorpo IgM para o *T.gondii* pelo critério do AxSYM® Toxo IgM. O diagnóstico de infecção primária por *T.gondii* não pode ser realizado apenas utilizando um resultado reativo. Outras metodologias devem ser utilizadas antes de confirmar diagnóstico.

Protocolo Técnico – AxSyM® Toxo IgG

MEIA – ABBOTT: Imunoensaio Enzimático de Micropartículas para a determinação quantitativa de anticorpos IgG para o *Toxoplasma gondii* em soro ou plasma humanos.

Princípio

O ensaio AxSYM[®] Toxo G é um Imunoensaio Enzimático de Micropartículas (MEIA) para a determinação quantitativa de anticorpos IgG para o *Toxoplasma gondii* em soro ou plasma humano (EDTA, heparina ou citrato de sódio), para auxiliar na determinação do estado imune e é recomendado como teste de acompanhamento durante a gravidez.

Reagentes

1 Frasco (7,8 mL) de Micropartículas Recobertas com *T. gondii* em tampão TRIS com estabilizantes de proteínas. Conservantes: Agentes antimicrobianos. 1 Frasco (9,6 mL) de Conjugado Anti-IgG Humano (origem caprina): Fosfatase Alcalina em tampão TRIS com estabilizantes de proteína, conservante: Azida Sódica. 1 Frasco (25,8 mL) de Diluente de Ensaio em tampão TRIS com estabilizantes de proteína, Conservantes: Agentes antimicrobianos.

Calibradores

Os calibradores são elaborados por diluição e referenciados com o Segundo Padrão Internacional para Anticorpo Anti-*T. gondii* da Organização Mundial da Saúde (OMS) para cada nível de concentração: 1 Frasco (3 mL) Calibrador Master 1 AxSYM[®] Toxo G preparado com plasma humano recalcificado não-reativo para HBsAg, HIV-1 Ag, anti-HCV, anti-HIV-1/HIV-2 e *T.gondii* IgG, 1 Frasco (3 mL) Calibrador Master 2 AxSYM Toxo G preparado com plasma humano recalcificado reativo para *T. gondii* IgG e não-reativo para HBsAg, HIV-1 Ag, anti-HCV e anti-HIV-1/HIV-2.

Controles

A concentração do controle positivo é avaliada utilizando calibradores referenciados com o Segundo Padrão Internacional para Anticorpo Anti-*T. gondii* da Organização Mundial da Saúde (OMS), 1 Frasco (5 mL) Controle Negativo Toxo G preparado com plasma humano recalcificado não-reativo para HBsAg, HIV-1 Ag, anti-HCV, anti-HIV-1/HIV-2 e *T. gondii* IgG, 1 Frasco (5 mL) Controle Positivo Toxo G preparado com plasma humano recalcificado reativo para *T. gondii* IgG e não-reativo para HBsAg, HIV-1 Ag, anti-HCV e anti-HIV-1/HIV-2.

Interpretação de Resultados

Resultados AxSYM[®] Toxo G inferiores a 2 UI/mL são considerados negativos para a presença de anticorpos IgG para o *T. gondii*.

Resultados AxSYM[®] Toxo G superiores ou iguais a 3 UI/mL são considerados positivos para a presença de anticorpos IgG para *T. gondii* e indicam infecção aguda ou passada.

Resultados AxSYM[®] Toxo G iguais ou superiores a 2 UI/mL e inferiores a 3 UI/mL (2,00 – 2,99 UI/mL) são considerados duvidosos (zona cinza). Amostras interpretadas como duvidosas (zona cinza) podem conter níveis baixos de IgG. Deve-se obter e testar uma segunda amostra.

Protocolo Técnico – VIDAS[®] Toxo IgG Aidez (TXGA)

ELIFA – Biomerieux: é um teste quantitativo automatizado no aparelho VIDAS, que permite a medida quantitativa das IgG anti-toxoplásmocas no soro ou no

plasma humano (heparinato de lítio ou EDTA) pela técnica ELIFA ou ELFA (Enzyme Linked Immuno Fluorescent Assay).

Princípio

O princípio de doseamento associa o método imunoenzimático tipo “sanduíche” em duas etapas, com uma detecção final em fluorescência (ELIFA).

Reagentes

Fase sólida revestida com os principais antígenos (membranar e citoplasmático) do *T.gondii*, controle de avidéz forte e fraca (soro humano contendo IgG anti-toxoplásmica, estabilizante protéico e azida sódica) 1g/L, Diluente de amostra (soro humano, estabilizante protéico e azida sódica, 1g/L).

Amostras

Soro ou plasma (heparinato de lítio, EDTA, citrato de sódio).

Procedimento

Todas as etapas foram realizadas automaticamente no aparelho, e foram constituídas de uma sucessão de ciclos de aspiração e dispensação dos reagentes e amostras. Na etapa final de revelação, agregou-se o substrato 4-MUP (4-Metil-umbeliferil-fosfato). O resultado foi mensurado através de fluorescência em espectrofotometro a 450nm. A fluorescência emitida foi proporcional a concentração de anticorpos na amostra.

Resultados e Interpretação

O cálculo basou-se em RFV (Valor de Fluorescência Relativa) e foi expresso em um “índice”, e foi realizado de forma automática pelo aparelho.

A interpretação do índice de avidéz está disposta no quadro abaixo:

Avidez	Interpretação
Índice < 0,200	IgG de fraca avides
$0,200 \leq$ Índice < 0,300	Avides Intermediária
Índice \geq 0,300	IgG de forte avides

Um índice de avides superior ou igual a 0,300 permite excluir uma infecção recente (inferior a 4 meses)

Um índice inferior a 0,300 não permite excluir uma infecção recente (inferior a 4 meses).

MÉTODOS DE IMUNOENSAIOS UTILIZADOS PELO LMC

Período de 19/02/2004 a 31/07/2004

Protocolo Técnico – LIASON[®] Toxo IgG , IgM e Avides

CLIA – DiaSorin: é um imunoensaio para a determinação quantitativa dos anticorpos específicos anti-*Toxoplasma gondii* da classe IgG,M e Avides em amostras de soro ou plasma humano de indivíduos suob suspeita clínica de toxoplasmose. O método utiliza a tecnologia da quimioluminescência.

Princípio

Método indireto para a determinação quantitativa de IgG, IgM e IgG Avides específica anti-*Toxoplasma gondii* baseado no princípio da quimioluminescência (CLIA). O parasita é utilizado para revestir partículas paramagnéticas (fase sólida) e um anticorpo monoclonal (MoAb) de origem murina é ligado a um derivado do isoluminol (conjugado). Os resultados são obtidos por sinais luminosos emitidos e mensurados em fotomultiplicador em unidades relativas (RLU), e é indicativo da concentração de IgG, IgM anti-*T.gondii* presente nos calibradores, amostra e nos controles.

Reagentes

Partículas magnéticas revestidas com *T.gondii* inativado (Cepa RH), albumina sérica bovina, tampão fosfato, < 0,1%), calibrador 1 e 2 (soro humano contendo níveis altos e baixos de IgG, IgM anti-*T.gondii*, albumina sérica bovina, tampão fosfato, conservantes, corantes inertes. As concentrações dos calibradores (UI/mL) estão referenciadas ao Terceiro padrão Internacional da OMS (1994). Diluente de amostras (albumina sérica bovina, tampão fosfato, conservantes e uum corante amarelo inerte. Conjugado (anticorpos monoclonais de origem murina anti-IgG human conjugados com um derivado do isoluminol, albumina sérica bovina, tampão fosfato, conservantes.

Procedimento

Automatizado – através do aparelho LIASON com amostras de plasma ou soro humanos. Os tubos contendo amostras identificadas foram inseridos no aparelho que:

- .Distribuiu amostras e reagentes (controles, calibradores)
- .Distribuiu partícula magnéticas revestidas
- .Distribuiu diluente das amostras
- .Incubou
- .Lavou com tampão
- .Distribuiu conjugado
- .Incubou
- .Lavou com tampão
- .Adicionou reagentes reveladores e mensurou luz emitida

Interpretação dos Resultados

O instrumento calculou automaticamente as concentrações de IgG anti-*T.gondii* em UI/mL e IgM anti-*T.gondii* expressas em UA/mL e classificou os resultados.

Intervalo de Medição para IgG: 0 – 500 UI/mL

Amostras com resultados abaixo de 6 UI/mL são consideradas negativas

Amostras com resultados entre 6 e 8 UI/mL são consideradas duvidosas

Amostras com resultados acima de 8 UI/mL são consideradas positivas

Intervalo de Medição para IgM: 0 – 160 UA/mL

Amostras com resultados abaixo de 6 UA/mL são consideradas negativas

Amostras com resultados entre 6 e 8 UA/mL são consideradas duvidosas

Amostras com resultados acima de 8 UA/mL são consideradas positivas

Índice de Avidéz (IgG): 0,010 – 0,950

Índice < 0,200 - Avidéz Fraca

Índice 0.200 a 0,250 - Avidéz Intermediária

Índice > 0.250 - Avidéz Forte

Obs: índices de avidéz superiores a 0.250 excluem infecções recentes (inferiores a 4 meses).

ANEXO III

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

COLETA DE LÍQUIDO AMNIÓTICO E PLACENTA (PARTO)

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Adolescente
Coleta de Líquido Amniótico / Placenta (Parto)**

- A) – Você está sendo convidada a participar de um estudo científico sobre toxoplasmose congênita que está sendo desenvolvido pelo Departamento de Patologia Básica / Laboratório de Parasitologia Molecular da UFPR e do Departamento de Tocoginecologia e do setor de Ecografia do Hospital de Clínicas da UFPR. É através de pesquisas clínicas como esta que avanços em área diagnóstica e de medicina ocorrem, portanto sua participação é de fundamental importância.
- B) – Os objetivos desta pesquisa são: 1) -desenvolver ferramentas diagnósticas mais seguras para pacientes gestantes com histórico sorológico e clínico de toxoplasmose triadas por médicos do Departamento de Tocoginecologia do Hospital de Clínicas da UFPR, com suporte técnico e científico do Laboratório de Parasitologia da UFPR; 2) – permitir o monitoramento e tratamento mais adequado ao longo da gestação.
- C) – Caso você tenha sido triada pela pesquisa sorológica e clínica e tenha sido convidada a realizar este procedimento de coleta de líquido amniótico (líquido que banha o feto) pela equipe de Ecografia do Hospital de Clínicas, este procedimento é acompanhado por médicos especializados em ambiente adequado. Como qualquer procedimento de coleta, o ato da punção poderá causar algum desconforto (semelhante a dor causada por injeção intramuscular, eventualmente poderá causar hematoma semelhante a punção para coleta de sangue, sensibilidade no local de punção).
- D) – Após a coleta de material (líquido amniótico), e de sangue de cordão umbilical e de placenta imediatamente após o parto, estes materiais serão encaminhados para análises específicas junto ao Laboratório de Parasitologia Molecular da UFPR, no intuito de isolar o *Toxoplasma gondii* (parasita que causa a Toxoplasmose) a partir de diversas técnicas descritas em literatura científica.
- E) – O principal benefício esperado deste estudo, é de obter um exame mais seguro, rápido e eficaz para avaliar juntamente com outros exames existentes e em conjunto com a avaliação clínica a presença do *Toxoplasma gondii* em pacientes gestantes com sorologia e histórico clínico de toxoplasmose.
- F) – Estão garantidas sob sigilo todas as suas informações, sendo somente inspecionadas pelos pesquisadores e médicos participantes deste estudo e autoridades legais, caso haja divulgação de informações em relatório ou publicação científica, isto ocorrerá de maneira codificada, para que a confidencialidade seja garantida. Os membros da equipe participante são: Pesquisador Principal - Dr. Rogério Saad Vaz – Doutorando pela UFPR telefone: (041) 9637 66 16, Profa. Dra. Vanete Thomaz Soccol – Orientadora/UFPR tel.: (041) 3361 17 01, Prof. Dr. Denis José Nascimento – Departamento de Tocoginecologia /HC-UFPR tel.: (041) 360 18 00 R: 7879 (Tocoginecologia).
- G) – Sua participação é voluntária, tendo a liberdade de aceitar ou não sua inclusão neste estudo, para isto necessitamos de seu consentimento para a realização do procedimento de coleta e exames posteriores relacionados como acima mencionado.
- H) Caso você não aceite participar, terá o mesmo atendimento obstétrico, pré-natal e parto pela equipe da maternidade do HC-UFPR.
- I) – Todas as despesas necessárias para realização desta pesquisa são de responsabilidade das instituições participantes. Você receberá pela participação no procedimento de amniocentese um vale transporte.
- J) – Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro.

Eu, _____, rg: _____, li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual fui convidada a participar. A explicação que recebi menciona o procedimento de coleta de líquido amniótico pela amniocentese e acompanhamento por ecografia, assim como da coleta de fragmento de placenta pela equipe do centro obstétrico do HC-UFPR imediatamente após o parto, e também os benefícios que este estudo poderá proporcionar. Eu entendi que sou livre para aceitar ou não a minha participação no estudo.

Eu concordo voluntariamente na participação deste estudo.

Curitiba, ____ de _____ de _____

Assinatura da Paciente: _____.

Assinatura do Responsável: _____.
(caso a paciente for menor de 18 anos de idade)

Assinatura do Pesquisador: _____.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Adulto
Coleta de Líquido Amniótico / Placenta (Parto)

- A) – Você está sendo convidada a participar de um estudo científico sobre toxoplasmose congênita que está sendo desenvolvido pelo Departamento de Patologia Básica / Laboratório de Parasitologia Molecular da UFPR e do Departamento de Tocoginecologia e do setor de Ecografia do Hospital de Clínicas da UFPR. É através de pesquisas clínicas como esta que avanços em área diagnóstica e de medicina ocorrem, portanto sua participação é de fundamental importância.
- B) – Os objetivos desta pesquisa são: 1) desenvolver ferramentas diagnósticas mais seguras para pacientes gestantes com histórico sorológico e clínico de toxoplasmose triadas por médicos do Departamento de Tocoginecologia do Hospital de Clínicas da UFPR, com suporte técnico e científico do Laboratório de Parasitologia da UFPR; 2) – permitir o monitoramento e tratamento mais adequado ao longo da gestação.
- C) – Caso a paciente menor de 18 anos a qual o sr. (a) esteja acompanhando e sob sua responsabilidade tenha sido triada pela pesquisa sorológica e clínica e tenha sido convidada a realizar este procedimento de coleta de líquido amniótico (líquido que banha o feto) pela equipe de Ecografia do Hospital de Clínicas, vimos informar que este procedimento é acompanhado por médicos especializados em ambiente adequado. Como qualquer procedimento de coleta, o ato da punção poderá causar algum desconforto (semelhante a dor causada por injeção intramuscular, eventualmente poderá causar hematoma semelhante a punção para coleta de sangue, sensibilidade no local de punção).
- D) – Após a coleta de material (líquido amniótico), e de sangue de cordão umbilical e de placenta imediatamente após o parto, estes materiais serão encaminhados para análises específicas junto ao Laboratório de Parasitologia Molecular da UFPR, no intuito de isolar o *Toxoplasma gondii* (parasita que causa a Toxoplasmose) a partir de diversas técnicas descritas em literatura científica.
- E) – O principal benefício esperado deste estudo, é de obter um exame mais seguro, rápido e eficaz para avaliar juntamente com outros exames existentes e em conjunto com a avaliação clínica a presença do *Toxoplasma gondii* em pacientes gestantes com sorologia e histórico clínico de toxoplasmose.
- F) – Estão garantidas sob sigilo todas as suas informações, sendo somente inspecionadas pelos pesquisadores e médicos participantes deste estudo e autoridades legais, caso haja divulgação de informações em relatório ou publicação científica, isto ocorrerá de maneira codificada, para que a confidencialidade seja garantida. Os membros da equipe participante são: Pesquisador Principal - Dr. Rogério Saad Vaz – Doutorando pela UFPR telefone: (041) 9637 66 16, Profa. Dra. Vanete Thomaz Soccol – Orientadora/UFPR tel.: (041) 361 17 01, Prof. Dr. Denis José Nascimento – Departamento de Tocoginecologia /HC-UFPR tel.: (041) 3360 18 00 R: Tocoginecologia.
- G) – Sua participação é voluntária, tendo a liberdade de aceitar ou não sua inclusão neste estudo, para isto necessitamos de seu consentimento para a realização do procedimento de coleta e exames posteriores relacionados como acima mencionado.
- H) – Todas as despesas necessárias para realização desta pesquisa são de responsabilidade das instituições participantes.
- I) – Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro.

ANEXO IV

**PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP):
INSTRUÇÃO DE TRABALHO PARA COLETA E
ARMAZENAMENTO DE LÍQUIDO AMNIÓTICO DE
GESTANTES COM SOROLOGIA PARA TOXOPLASMOSE.**

Laboratório de Parasitologia Molecular-UFPR	LPM-Centro Politécnico-UFPR / Programa de Doutorado em Biotecnologia e Bioprocessos
Departamento: Patologia Básica	Procedimento Operacional (POP) – Instrução de Trabalho Coleta e Armazenamento de Líquido Amniótico de Gestantes com Sorologia para Toxoplasmose.
Setor: Parasitologia	Título: Coleta e Armazenamento de Líquido Amniótico
Versão: 1.0	Indexação: Parasito 000/01 Página: 1 de 6

Mneumônico: LQAMN

Título: Coleta (Amniocentese) e Armazenamento de Líquido Amniótico.

Sinonímia: Amniocentese.

APROVAÇÃO

Aprovado por:

Coordenação do Laboratório de Parasitologia Molecular-UFPR

Nome: Profa. Dra. Vanete Thomaz Soccol – Orientadora

Assinatura: _____ **Data:** 10/03/03

Serviço de Tocoginecologia – Hospital de Clínicas-UFPR

Nome: Prof. Dr. Denis José Nascimento / Co-orientador

Assinatura: _____ **Data:** 10/03/03

Elaborado por: Rogério Saad Vaz – Doutorando - UFPR

Assinatura: _____ **Data:** 10/03/03

Laboratório de Parasitologia Molecular-UFPR	LPM-Centro Politécnico-UFPR / Programa de Doutorado em Biotecnologia e Bioprocessos	
Departamento: Patologia Básica	Procedimento Operacional (POP) – Instrução de Trabalho	
Setor: Parasitologia	Título: Coleta e Armazenamento de Líquido Amniótico	
Versão: 1.0	Indexação: Parasito 000/01	Página: 2 de 6

- **Princípio:** Obtenção de líquido amniótico (LA) de pacientes gestantes (14^a. – 18^a. semana) por amniocentese) e armazenamento da amostra para posteriores análises laboratoriais : inoculação em camundongos , cultivo celular , extração de DNA e PCR.

1.0 – Amostra:

1.1 – Condições para preparo do paciente

2.1.1 – Preparo: paciente previamente orientada sobre o procedimento em consulta com médico do setor de Tocoginecologia – Hospital de Clínicas.

2.1.2 – Instruções especiais: Vide orientações do Setor de Tocoginecologia – Hospital de Clínicas

2.1.3 - Coleta da amostra: Coletar aproximadamente 10 a 30 ml (variação de volume conforme instruções do médico – Tocoginecologia) de líquido amniótico (LA) em seringa específica de procedimento – amniocentese com auxílio de equipamento ultrassonográfico/ecografia. Após a coleta, transferir o LA imediatamente para o tubo (estéril) de polipropileno de fundo cônico do KIT de Coleta fornecido pelo Laboratório de Parasitologia Molecular-UFPR (LPM-UFPR) e levar o tubo até recipiente refrigerado de 2 a 8 °C até que a equipe do LPM-UFPR venha buscá-lo.

2.2 – Tipo da amostra: Líquido Amniótico)

2.3 – Frascos adequados: Seringa de Procedimento – amniocentese e Tubo estéril para armazenamento da amostra.

2.4 – Preparo da amostra: Transferir imediatamente o LA para o tubo estéril e levá-lo até recipiente refrigerado.

2.5 - Estabilidade e armazenamento: < 12 horas sob refrigeração (2- 8C) . Comunicar imediatamente a equipe do Laboratório de Parasitologia Molecular – UFPR .

2.6 – Encaminhamento: Encaminhar as amostras em recipiente refrigerado , protegido da luz.

2.7 - Amostras Inadequadas: - Quando excessivamente hemolisadas, volume menor que 10ml, não refrigeradas fora do prazo de armazenamento.

Laboratório de Parasitologia Molecular-UFPR	LPM-Centro Politécnico-UFPR / Programa de Doutorado em Biotecnologia e Bioprocessos	
Departamento: Patologia Básica	Procedimento Operacional (POP) – Instrução de Trabalho	
Setor: Parasitologia	Título: Coleta e Armazenamento de Líquido Amniótico	
Versão: 1.0	Indexação: Parasito 000/01	Página: 3 de 6

3.0– Materiais / Equipamentos

3.1 –Materiais para Coleta/Armazenamento:

- 01 seringa de procedimento estéril (amniocentese)
- 01 Tubo de Polipropileno Graduado de Fundo Cônico (estéril)
- 01 Kit de Coleta – LPM-UFPR (para armazenar a amostra)
- 01 Recipiente Térmico para Acondicionamento da Amostra (2-8C)
- Gelo Reciclável / Gelo
- Estante para o Tubo de Polipropileno

3.2 – Estabilidade e armazenamento : Manter o tubo refrigerado de 2 a 8 °C até 12 horas após coleta.

3.3 – Volume Mínimo: Coletar de 5 – 10 ml de LA (conforme indicação do médico responsável / Tocoginecologia /HC)

4.0 – Passo a Passo:

Equipes Participantes:

Serviço de Tocoginecologia - Hospital de Clínicas – UFPR
 Serviço de Ecografia/Ultrassom – Hospital de Clínicas – UFPR
 Laboratório de Parasitologia Molecular-UFPR
 Rogério Saad Vaz – telefone: 9637 66 16 (celular) / 3331 66 97 (residência)
 3361 17 01 (laboratório de parasitologia molecular-UFPR)

4.1

Equipe da Secretaria Municipal de Saúde de Curitiba(SMSC) tria e encaminha paciente gestante com sorologia e histórico clínico específicos para toxoplasmose para o setor de Tocoginecologia do Hospital de Clínicas de Curitiba.

Laboratório de Parasitologia Molecular-UFPR	LPM-Centro Politécnico-UFPR / Programa de Doutorado em Biotecnologia e Bioprocessos
Departamento: Patologia Básica	Procedimento Operacional (POP) – Instrução de Trabalho
Setor: Parasitologia	Título: Coleta e Armazenamento de Líquido Amniótico
Versão: 1.0	Indexação: Parasito 000/01 Página: 4 de 6

4.2

Equipe do setor de Tocoginecologia – Hospital de Clínicas (TCG/HC) recebe a paciente gestante, cadastra dados pessoais e histórico sorológico e clínico, em seguida procede com orientações específicas e informa sobre data e horário da amniocentese .

4.3

Equipe de TCG/HC comunica o Laboratório de Parasitologia Molecular – UFPR (LPM) sobre o procedimento e informa sobre data , horário e dados específicos da paciente (histórico clínico).

4.4

Equipe do LPM-UFPR registra as informações em prontuário técnico e prossegue com o preparo de Kit – coleta/armazenamento de líquido amniótico e POP (procedimento operacional padrão) específico e envia para a equipe do setor de TCG/HC.

4.5

Equipe do TCG/HC recebe o Kit de coleta/ armazenamento de líquido amniótico e POP técnico fornecidos pelo LPM-UFPR e fornece para a equipe do LPM-UFPR formulário com dados pessoais/laboratoriais/clínicos da paciente .

4.6

Paciente retorna ao setor de TCG/HC em data e horários conforme agendado.

4.7

Equipes de TCG/Ultrassom do HC prosseguem com a amniocentese e coleta e armazenamento do líquido amniótico conforme POP técnico do LPM-UFPR.

4.8

Equipe de TCG/HC comunica a equipe do LPM-UFPR sobre o material coletado .

Laboratório de Parasitologia Molecular-UFPR	LPM-Centro Politécnico-UFPR / Programa de Doutorado em Biotecnologia e Bioprocessos
Departamento: Patologia Básica	Procedimento Operacional (POP) – Instrução de Trabalho
Setor: Parasitologia	Título: Coleta e Armazenamento de Líquido Amniótico
Versão: 1.0	Indexação: Parasito 000/01 Página: 5 de 6

4.9

Equipe do LPMN/UFPR prossegue com a busca do material checando as condições de armazenamento (volume mínimo/temperatura/condições de estocagem) e retorna para o LPM.

4.10

Equipe do LPM prepara o material para outros procedimentos técnicos específicos: Inocular material em camundongos, Cultivo Celular Extração de DNA, PCR .

4.11

Equipe do LPM/UFPR comunica equipe de TCG/HC sobre os resultados laboratoriais da paciente.

4.12

Resultados são utilizados para cálculos estatísticos e avaliação de tese.

5.0 – Notificação Especial:

A paciente deverá ser informada sobre o experimento e posterior coleta de amostras de placenta e sangue no momento do parto e receber uma folha contendo nome(s) e telefone(s) da(s) equipe(s) envolvida(s) , para contato em período prévio ao parto. O ”documento de consentimento” para obtenção das amostras deverá ser preenchido e arquivado com a assinatura da paciente / representante legal (vide – em anexos: Consentimento). A equipe de Tocoginecologia / Ecografia deverão comunicar a equipe do LPM-UFPR sobre quaisquer outros exames ao longo da gestação que tenham significado clínico relevante.

6.0 – Significado Clínico: A amniocentese é necessária para a obtenção de amostras de líquido amniótico para fins de isolamento do parasita *“Toxoplasma gondii”* através de técnicas laboratoriais tais como: inoculação em camundongos , cultivo celular , extração de DNA e PCR.

Laboratório de Parasitologia Molecular-UFPR	LPM-Centro Politécnico-UFPR / Programa de Doutorado em Biotecnologia e Bioprocessos
Departamento: Patologia Básica	Procedimento Operacional (POP) – Instrução de Trabalho
Setor: Parasitologia	Título: Coleta e Armazenamento de Líquido Amniótico
Versão: 1.0	Indexação: Parasito 000/01 Página: 6 de 6

7.0 – Modelo de resultado: (amostra de LA submetida a PCR)

Resultado Positivo indica a presença do DNA do T.gondii na amostra pesquisada

Resultado Negativo indica a ausência do DNA do Tgondii na amostra pesquisada

8.0 – Interferentes:

Amostras Excessivamente Hemolisadas

Amostras Estocadas fora do prazo de validade e condições de refrigeração inadequadas

Resultados Falso-Negativos: resíduos de reagentes durante procedimento de extração de DNA.

Resultados Falso-Positivos: contaminação por aerossóis (amplicons).

9.0 – Biossegurança:

Utilizar proteção individual: óculos acrílicos de proteção, avental de mangas longas e luvas de procedimentos após o manuseio das amostras, retirar as luvas e lavar as mãos com água e sabão. Desprezar material descartável em recipiente adequado (lixo hospitalar/descartex)

10.0 – Arquivamento: Livro de Registro /Prontuário para posterior transferência de dados em sistema informatizado (LPM-UFPR – Estatística)

11.0 – Confidencialidade: Dados pertinentes as pacientes serão mantidos em sigilo, conforme normas de conduta ética (vide CEP-HC).

12.0 – Anexos: (Incluir “Documento de Consentimento”)