



**Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

---

Fernando Henrique Antunes Murata

**Infecção por *Toxoplasma gondii*:  
Caracterização Sorológica e Molecular em  
Pacientes Atendidos pelo SUS**

São José do Rio Preto  
2016

Fernando Henrique Antunes Murata

Infecção por *Toxoplasma gondii*:  
Caracterização Sorológica e Molecular em  
Pacientes Atendidos pelo SUS

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina de São José do Rio Preto para  
obtenção do Título de Mestre no Curso de  
Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Eixo  
Temático: Medicina e Ciências Correlatas.

Orientadora: Profa. Dra. Cinara de Cássia Brandão  
de Mattos

Coorientadora: Profa. Dra. Hilda Fátima de Jesus  
Pena

São José do Rio Preto  
2016

Murata, Fernando Henrique Antunes  
Infecção por *Toxoplasma gondii*: Caracterização Sorológica e  
Molecular em Pacientes Atendidos pelo SUS / Fernando  
Henrique Antunes Murata  
São José do Rio Preto, 2016  
117 p.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José  
do Rio Preto – FAMERP  
Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientadora: Profa. Dra. Cinara de Cássia Brandão de Mattos

1. *Toxoplasma gondii*; 2. Testes Sorológicos; 3. Reação em Cadeia da Polimerase; 4. Toxoplasmose.

Fernando Henrique Antunes Murata

Infecção por *Toxoplasma gondii*:  
Caracterização Sorológica e Molecular em Pacientes  
Atendidos pelo SUS

BANCA EXAMINADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE  
MESTRE

Presidente e Orientadora: Profa. Dra. Cinara de Cássia Brandão  
de Mattos

2º Examinador: Profa. Dra. Vânia Belintani Piatto

3º Examinador: Profa. Dra. Heloisa da Silveira Paro Pedro

1º Suplente: Profa. Dra. Márcia Maria Costa Nunes Soares

2º Suplente: Prof. Dr. Aripuanã Sakurada Aranha Watanabe

São José do Rio Preto, 2016.

## Sumário

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	ii
Epígrafe.....	iv
Lista de Figuras.....	v
Lista de Tabelas e Quadros.....	vi
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	vii
Resumo.....	ix
Abstract.....	xi
1. Introdução.....	1
1.1 Histórico.....	2
1.2 Agente etiológico.....	2
1.3 Ciclo Biológico.....	4
1.4 Toxoplasmose em humanos.....	6
1.5 Diagnóstico Laboratorial da toxoplasmose.....	9
1.6 Aspectos Epidemiológicos e diversidade gênica do <i>T. gondii</i> .....	10
1.7 Objetivo Geral.....	14
1.8 Objetivos Específicos.....	14
2. Resultados.....	15
2.1 Manuscrito 1.....	18
2.2 Manuscrito 2.....	46
2.3 Manuscrito 3.....	68
3. Considerações finais.....	76
4. Conclusões.....	79
5. Referências Bibliográficas.....	81
6. Anexos.....	90
6.1. Manuscrito 4.....	91

*Dedicatória*

*Dedico este trabalho aos meus pais; Sussumu Murata e Maria Donizete  
Antunes Murata e aos meus avós Antônio Antunes e Geralda de Oliveira*

*Antunes*

*Obrigado!*

## *Agradecimentos*

Agradeço a Deus por sempre me dar força e guiar meu caminho.

À minha orientadora Profa. Dra. Cinara de Cássia Brandão de Mattos pela oportunidade de ter sido seu orientando, pelo apoio, paciência, pelas oportunidades oferecidas durante o período deste trabalho, e por todo ensinamento.

À minha coorientadora Profa. Dra. Hilda Fátima de Jesus Pena por todo apoio, ensinamentos e paciência.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos pelos ensinamentos e apoio durante a realização deste trabalho.

Aos meus pais, avós e minha irmã por todo o incentivo, carinho e compreensão. Sem eles não teria tido o suporte e apoio necessário para meu percurso acadêmico.

Aos membros da banca de qualificação e defesa.

A Dra. Vera Lucia Pereira-Chioccola pelo auxílio e parceria.

Aos amigos do Laboratório de Imunogenética da FAMERP: Alessandro, Amanda, Ana Vitória, Camila, Cássia, Christiane, Cidinha, Geraldo, Luiz, Marcio, Marcos, Mariana, Marina, Mirele, Natália, Valquíria, Vinicius, Regina, Ricardo e Warlen, por todos os momentos bons, ruins, difíceis, pelo compartilhamento do conhecimento, pelas boas risadas e por toda a ajuda.

À minha grande amiga Fabiana Nakashima por toda ajuda desde os tempos de faculdade. Obrigado por toda a ajuda, amizade, companheirismo, e por todos os momentos bons e ruins que passamos juntos.

Aos meus grandes amigos Alexandre, Camila e Marina pela amizade de vocês e por toda a força que me deram durante a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Solange Gennari pela ajuda e oportunidades.

Aos amigos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP de São Paulo, Prof. Ricardo Dias, Solange, Herbert, Marcos e Renato por todo acolhimento e ajuda.

*Thanks Dr. Chunlei Su, Department of Microbiology, The University of Tennessee, for the support and Exchange ideas and your expertise.*

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pela bolsa concedida (Processo: 2013/15879-8).

Fundação de Apoio à Pesquisa e Extensão de São José do Rio Preto - FAPERP pelo auxílio concedido (Processos: 175/2015).

À Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), ao programa de pós-graduação em Ciências da Saúde, e a todos os pacientes e funcionários dos ambulatórios de gestação de alto risco e medicina fetal e de oftalmologia da FAMERP que participaram deste projeto.

E agradeço a todos que contribuíram de alguma forma com a realização deste trabalho.



*Epígrafe*

*“Eu descobri que quando você realiza um sonho, você descobre também que existem sonhos ainda maiores para serem realizados.”*

*Carlos Wizard Martins*

**Lista de Figuras**

Figura 1. Formas infectantes do <i>T.gondii</i> .....	2
Figura 2. Estrutura do taquizoíto. ....	3
Figura 3. Etapas da endodiogenia.....	3
Figura 4. Reprodução sexuada e assexuada do <i>T.gondii</i> no hospedeiro definitivo.. ..	5
Figura 5. Fontes de infecção para <i>Toxoplasma gondii</i> . ....	6
Figura 6. Lesão sugestiva de toxoplasmose ocular.....	8

**Lista de Tabelas e Quadros**

Quadro 1. Soroprevalência da toxoplasmose em diferentes estados do Brasil. ....	13
Tabela 1. Manuscrito 1: Resultados dos testes sorológicos realizados no soro das gestantes do G1 e G2 por ELISA (Diasorin, Itália) das classes IgG, IgM e IgA, e ELFA (Biomerieux, França) das classes IgG e IgM. ....	44
Tabela 2. Manuscrito 1: Resultados dos testes moleculares realizados em amostras de sangue periférico das gestantes do G1 e G2 por cnPCR (JW62/63), Nested PCR, cnPCR (B22/23) e qPCR.....	45
Tabela 3. Manuscrito 2: Resultados dos testes sorológicos das classes IgG e IgM realizados no soro dos pacientes do G1 e G2 por ELISA (Diasorin, Itália) e ELFA (Biomerieux, França).....	66
Tabela 4. Manuscrito 2: Resultados dos testes moleculares realizados em amostras de sangue periférico dos pacientes do G1 e G2 por cnPCR (JW62/63), Nested PCR, cnPCR (B22/23) e qPCR.....	67
Tabela 5. Manuscrito 3: Resultados dos testes sorológicos realizados no soro por ELISA (Diasorin, Itália) das classes IgG, IgM e IgA, e molecular realizado por cnPCR no sangue dos neonatos.....	75

**Lista de Abreviaturas e Símbolos**

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
cnPCR	Reação em Cadeia da Polimerase convencional
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E	Especificidade
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELFA	<i>Enzyme Linked Fluorescent Assay</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
FUNFARME	Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto
HGH	Hormônio do Crescimento Humano
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IDT	<i>Integrated DNA Technologies</i>
IFAT	<i>Imunofluorescent Antibody Test</i>
IgA	Imunoglobulina da classe A
IgE	Imunoglobulina da classe E
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgM	Imunoglobulina da classe M
IHA	<i>Indirect Haemagglutination Assays</i>
ISAGA	<i>Immunsorbent Agglutination Assay</i>
LA	Líquido Amniótico
mL	Mililitros
N	Número
OCT	<i>Optical Coherence Tomography</i>
p	Valor de p
pb	Pares de base

PCR	Reação em cadeia da polimerase
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa ou tempo real
S	Sensibilidade
SUS	Sistema Único de Saúde
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
UA	Unidades Arbitrárias
UI	Unidades Internacionais
VPN	Valor Preditivo Negativo
VPP	Valor Preditivo Positivo
X <sup>2</sup>	Qui-quadrado
μl	Microlitro
°C	Graus Celsius
%	Porcentagem

## Resumo

**Introdução:** A infecção por *T. gondii* é elevada no Brasil, podendo levar ao desenvolvimento de sequelas graves como lesões oculares e neurológicas, principalmente quando ocorre durante a gestação com risco de transmissão congênita, e em pacientes imunocomprometidos. A maioria dos indivíduos acometidos não desenvolvem sintomas, tornando o diagnóstico clínico difícil, sendo assim necessária a utilização de testes que auxiliem no diagnóstico, como o uso dos métodos sorológicos e moleculares. Desta forma, é essencial a utilização de testes sensíveis e específicos para o correto diagnóstico da doença. **Objetivos:** Investigar e caracterizar a infecção por *T. gondii* em seus aspectos sorológicos e moleculares em pacientes da região noroeste do Estado de São Paulo. **Casística e métodos:** Foram coletadas amostras de sangue periférico de gestantes, neonatos e pacientes com doenças oculares sugestivas e não sugestivas de toxoplasmose, atendidos nos Ambulatórios de Gestação de Alto Risco e Medicina Fetal, e Retinopatia para realização dos métodos sorológicos (ELISA e ELFA) e moleculares (cnPCR, Nested PCR e qPCR). Foram coletadas também amostras de líquido amniótico para realização da cnPCR das gestantes com suspeita clínica de toxoplasmose. Os resultados foram comparados pelo índice Kappa, e calculados os valores de sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP) e negativo (VPN). **Resultados:** Para o grupo de gestantes analisadas, os testes sorológicos apresentaram concordância quando aplicados ao Kappa, G1: IgG = 0,83, IgM = 1,0; G2: IgG = 1,0, IgM = 0,78 . Quando comparados a pesquisa de anticorpos da classe IgM por ELISA e ELFA apresentaram S=75,5%, E=100,0%, VPP=100,0%, VPN=87,8% e S=79,2%, E=100,0%, VPP=100,0%, VPN=89,5%, respectivamente. Quando comparados com IgG apresentaram S=100,0%, E=46,8%, VPP=51,5%,

VPN=100,0% e S=100,0%, E=38,3%, VPP=47,7%, VPN=100,0%, respectivamente, e para os métodos moleculares realizados pelas PCRs cnPCR (JW62/63), Nested PCR, cnPCR (B22/23) e qPCR apresentaram S=0,0%, E=100,0%, VPP=0,0%, VPN=63,9%, S=5,7%, E=100,0%, VPP=100,0%, VPN=65,3%, S=7,5%, E=98,9%, VPP=80,0%, VPN=65,5% e S=1,9%, E=100,0%, VPP=100,0%, VPN=64,4%, respectivamente. Para o grupo de pacientes atendidos no ambulatório de Oftalmologia, os testes sorológicos para pesquisa de anticorpos anti-*T.gondii* da classe IgG apresentaram boa concordância quando aplicados ao índice Kappa, G1: IgG = 0,97, IgM = 0,49; G2: IgG = 0,85, IgM = 0,74. Quando comparados à pesquisa de anticorpos da classe IgM por ELISA e ELFA, apresentaram S=6,1%, E=96,8%, VPP=62,5%, VPN=53,7% e S=3,7%, E=98,9%, VPP=75,0%, VPN=53,7%, respectivamente. Quando comparados com IgG apresentaram S=96,3%, E=34,6%, VPP=56,6%, VPN=91,4% e S=95,1%, E=35,7%, VPP=56,7%, VPN=89,2%, respectivamente, e para os métodos moleculares realizados pelas PCRs cnPCR (JW62/63), Nested, cnPCR (B22/23) e qPCR, apresentaram S=1,8%, E=99,5%, VPP=75,0%, VPN=53,3%, S=2,4%, E=99,5%, VPP=80,0%, VPN=53,5%, S=6,1%, E=98,4%, VPP=76,7%, VPN=54,2% e S=8,5%, E=98,4%, VPP=82,3%, VPN=54,8%, respectivamente. Para o grupo de neonatos, das 50 amostras analisadas, 45 (90,0%) foram positivas para IgG, 1 (2,0%) para IgM, 3 (6,0%) para IgA e 13 (26,0%) no cnPCR. **Conclusão:** Os testes sorológicos comerciais na identificação de anticorpos anti-*T.gondii* das classes IgG e IgM por ELISA e ELFA apresentaram resultados concordantes, e os testes moleculares PCR convencional (cnPCR), PCR Nested e PCR em tempo real (qPCR) apresentaram resultados discordantes.

**Palavras-chave:** *Toxoplasma gondii*, Testes Sorológicos, Reação em Cadeia da Polimerase, Toxoplasmose.

## Abstract

**Introduction:** *T. gondii* infection is high in Brazil and could lead to the development of serious sequelae such as ocular and neurological injuries, especially when it occurs during pregnancy for the risk of congenital transmission, and in immunocompromised patients. Clinical diagnosis is often difficult because the majority of affected people do not develop symptoms, therefore the use of serological and molecular methods are essential to support the diagnosis. Thus the use of sensitive and specific tests for the diagnosis of this condition is necessary. **Objectives:** To investigate and characterize the infection by *T. gondii* in their serological and molecular aspects in the northwest region of São Paulo. **Methods:** Peripheral blood samples were collected from patients treated in the Outpatient Clinic of High Risk Pregnancy and Fetal Medicine, and Retinopathy to analyze the serological methods (ELISA and ELFA) and molecular (cnPCR, Nested PCR and qPCR). Amniotic fluid samples were collected from pregnant women with suspect toxoplasmosis to perform the cnPCR. The results were compared using the Kappa index and calculated the sensitivity (S), specificity (SP), positive predictive value (PPV) and negative (NPV). **Results:** For the group of pregnant women, serological tests showed good agreement when applied to the Kappa index, G1: IgG = 0.83, IgM = 1.0; G2: IgG = 1.0, IgM = 0.78. When compared to IgM class antibodies by ELISA and ELFA had S = 75.5%, E = 100.0%, PPV = 100.0%, NPV = 87.8% and S = 79.2%, and = 100.0%, PPV = 100.0%, NPV = 89.5%, respectively. When compared to IgG showed S = 100.0%, E = 46.8%, PPV = 51.5%, NPV = 100.0% and 100.0% S = E = 38.3%, PPV = 47.7% NPV = 100.0%, respectively, and molecular methods performed by PCRs cnPCR (JW62 / 63), nested PCR, cnPCR (B22 / 23) and qPCR showed 0.0% S = E = 100, 0%, PPV = 0.0%, NPV = 63.9%, S = 5.7%, E = 100.0%, PPV = 100.0%, NPV = 65.3%, S = 7.5 % E = 98.9%, PPV = 80.0%, NPV = 65.5% and S = 1.9%, E = 100.0%,



PPV = 100.0%, NPV = 64.4%, respectively. For the group of patients treated in the Retinopathy Clinic, serological tests for detection of anti-*T. gondii* IgG antibodies showed good agreement when applied to the Kappa index, G1: IgG = 0.97, IgM = 0.49; G2: = 0.85 IgG, IgM = 0.74. When compared to IgM class antibodies by ELISA and ELFA had S = 6.1% and = 96.8%, PPV = 62.5%, NPV = 53.7% and S = 3.7%, and = 98.9%, PPV = 75.0%, NPV = 53.7% respectively. When compared to IgG showed S = 96.3%, E = 34.6%, PPV = 56.6%, NPV = 91.4% and S = 95.1%, E = 35.7%, PPV = 56.7%, NPV = 89.2%, respectively, and the molecular methods performed by PCRs cnPCR (JW62 / 63), Nested, cnPCR (B22 / 23) and qPCR showed S = 1.8% and = 99.5 %, PPV = 75.0%, NPV = 53.3%, S = 2.4%, and 99.5%, PPV = 80.0%, NPV = 53.5%, S = 6.1% E = 98.4%, PPV = 76.7%, NPV = 54.2% and S = 8.5% and = 98.4%, PPV = 82.3%, NPV = 54.8%, respectively. For the group of neonates of 50 samples tested, 45 (90.0%) were positive for IgG 1 (2.0%) for IgM, 3 (6.0%) for IgA and 13 (26.0%) in cnPCR.

**Conclusion:** The commercial serological tests for identifying anti- *T. gondii* IgG and IgM antibodies by ELISA and ELFA showed concordant results, and the molecular conventional PCR tests (cnPCR), Nested PCR and real-time PCR (qPCR) were discordant.

**Keywords:** *Toxoplasma gondii*, Serological testes, Polymerase Chain Reaction, Toxoplasmosis.

# 1.Introdução

---

## 1.1 Histórico

A toxoplasmose é uma doença causada pelo parasito intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii*. Foi descrito por Nicolle e Manceaux em 1908 no Instituto Pasteur da Tunísia, que o identificaram no corpo do roedor *Ctenodactylus gundii*, e também por Alfonso Splendore no Brasil, observado em coelhos domésticos (*Oryctolagus cuniculus*).<sup>(1-3)</sup> Apesar de descrito simultaneamente, o nome *Toxoplasma gondii* foi atribuído primeiramente por Nicolle e Manceaux em 1909.<sup>(1,4)</sup>

## 1.2 Agente etiológico

O parasito *Toxoplasma gondii* pertence ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, ordem Eucoccidia, família Sarcocystidae, e é encontrado em três formas infectantes: taquizoíto, bradizoíto e oocisto esporulado.<sup>(5,6)</sup> (Figura 1)

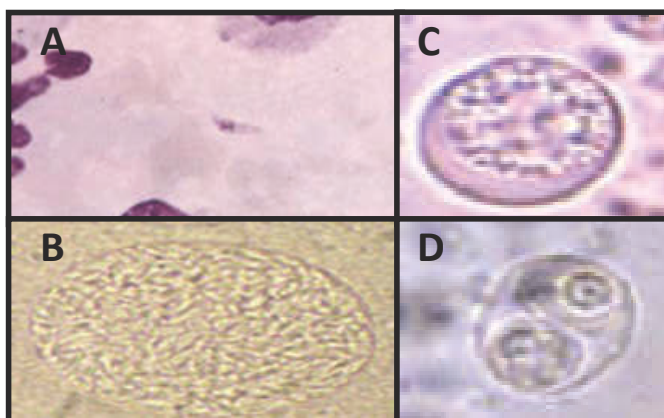


Figura 1. Formas infectantes do *T. gondii*: A) Taquizoítos presentes em amostra de lavagem broncoalveolar; B) Cistos presentes no cérebro de camundongos infectados; C) Oocistos não esporulado; D) Oocisto esporulado. Adaptado de Robert-Gangneux; Dardé (2012).<sup>(5)</sup>

O taquizoíto, ou trofozoíto é denominado como a forma livre ou proliferativa do parasito. Apresenta formato de banana ou meia lua, e foi a primeira forma encontrada e

descrita por Nicolle e Manceaux em 1908. Apresenta um complexo apical, localizado na extremidade anterior do parasito com estruturas importantes para a endocitose na célula hospedeira, como os micronemas que atuam na adesão do parasito à célula e as roptrias que contém enzimas proteolíticas que auxiliam na internalização do taquizoito para dentro da célula.<sup>(6)</sup> (Figura 2) O taquizoito apresenta reprodução rápida (*tachis* = rápido) por um processo denominado endodiogenia (reprodução assexuada onde duas células filhas são originadas dentro da célula mãe).<sup>(7-9)</sup> (Figura 3)

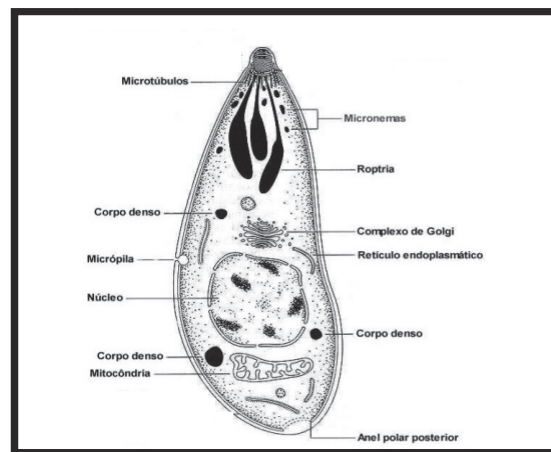


Figura 2. Estrutura do taquizoito. Adaptado de Galisteo JR (2004).<sup>(10)</sup>

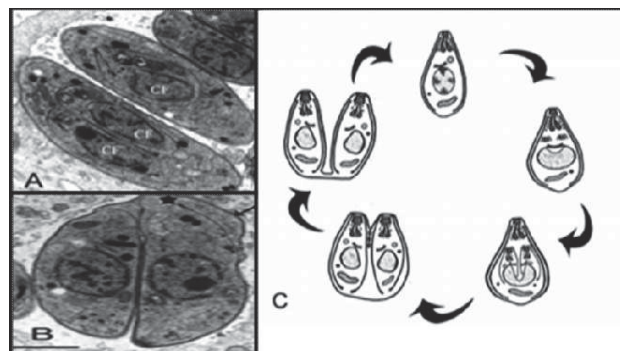


Figura 3. Etapas da endodiogenia. A e B Microscopia eletrônica de transmissão. A) Duas células filhas dentro da célula mãe; B) Final do processo de endodiogenia, apresentando as duas células filhas; C) Representação esquemática do processo de endodiogenia. Adaptado de Souza e colaboradores (2010).<sup>(7)</sup>

O bradizoíto ou cistozoíto é o estágio de encistamento do parasito. Apresenta reprodução lenta (*brady* = lento) e tem importante papel por ser resistente ao suco gástrico, e é a forma encontrada nos tecidos dos hospedeiros intermediários podendo permanecer por toda a vida. Cada cisto tecidual contém centenas de bradizoítos em seu interior.<sup>(6-9)</sup>

O oocisto é a forma resistente liberada nas fezes dos felinos não imunes para o ambiente. Os oocistos são liberados ainda imaturos, esporulando por volta de 1 a 5 dias, dependendo das condições do ambiente.<sup>(6,11)</sup> Oocistos esporulados contêm dois esporocistos que abrigam em seu interior quatro esporozoítos.<sup>(6-8)</sup>

### **1.3 Ciclo Biológico**

A toxoplasmose é uma zoonose que infecta humanos, animais de sangue quente e aves. Seu ciclo foi elucidado em 1960 demonstrando os felinos como hospedeiro definitivo do parasito.<sup>(12,13)</sup>

Apresenta ciclo heteroxeno com reprodução sexuada e assexuada no hospedeiro definitivo e, assexuada no hospedeiro intermediário. A transmissão do parasito pode ocorrer tanto do hospedeiro definitivo para intermediário como entre os hospedeiros intermediários e definitivos (carnivorismo) tornando ampla a disseminação do parasito no ambiente.<sup>(12)</sup> A infecção do hospedeiro definitivo pode ocorrer a partir da ingestão de qualquer uma das três formas infectantes, sendo mais frequente a ingestão de bradizoítos contido nos tecidos dos hospedeiros intermediários contaminados. Após a ingestão, essas formas do parasito chegam até o intestino do felino e invadem os enterócitos, reproduzindo-se assexuadamente formando vários merozoítos. Os merozoítos rompem a parede do epitélio intestinal e invadem novas células do tecido epitelial, dando origem ao ciclo sexuada do parasito formando gametas femininos

(macrogametas) e masculinos (microgametas). Após a fecundação dos gametas, ocorre a formação dos oocistos não esporulados, os quais são liberados juntamente com as fezes do animal. No meio ambiente, em condições favoráveis, os oocistos sofrem esporulação, tornando-se maduros ou infectantes com formação de dois esporocistos com quatro esporozoítos cada.<sup>(5)</sup> (Figura 4)

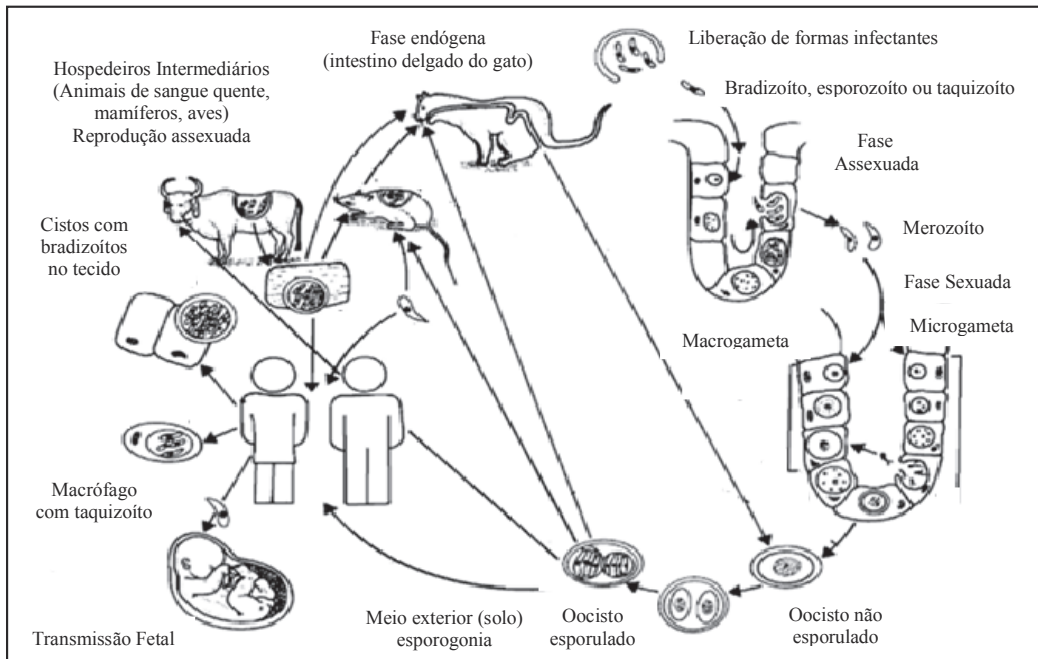


Figura 4. Reprodução sexuada e assexuada do *T. gondii* no hospedeiro definitivo. Adaptado de Neves DP (2005).<sup>(15)</sup>

Os hospedeiros intermediários como os humanos podem se infectar por ingestão de carne crua ou mal cozida de outros hospedeiros intermediários contaminados com cistos ou por ingestão de alimentos ou água contaminados com oocistos. A transmissão pode ocorrer também entre os humanos durante a gestação quando o parasito atravessa a barreira placentária e atinge o feto.<sup>(5,14)</sup> (Figura 5)

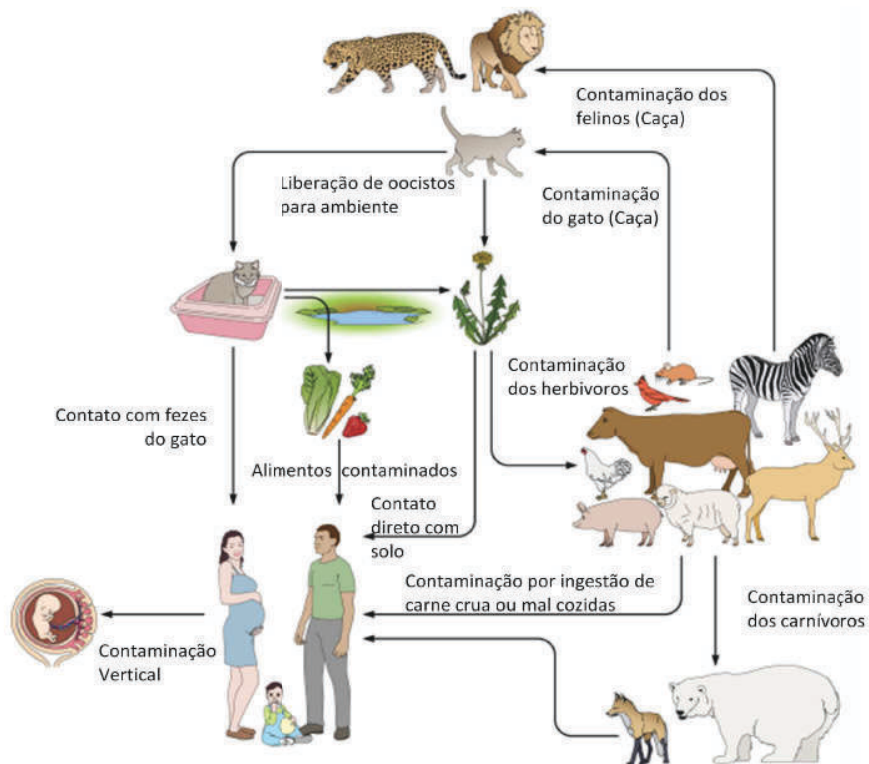


Figura 5. Fontes de infecção para *Toxoplasma gondii*. Adaptado de Robert-Gangneux;Dardé (2012).<sup>(5)</sup>

#### 1.4 Toxoplasmose em humanos

A toxoplasmose em humanos ganhou importância entre os anos de 1920 e 1930 quando foram descritos vários casos da doença em bebês, que desenvolveram manifestações oculares e cerebrais,<sup>(16-18)</sup> porém o primeiro caso confirmado da doença congênita foi descrito por Wolf e colaboradores (1939) que isolaram o parasito após inocular em coelhos e camundongos tecido cerebral e espinhal de uma criança de um mês de idade que foi a óbito.<sup>(16,19)</sup>

A infecção por *T. gondii* pode ser congênita quando o taquizoíto transpõe a barreira placentária infectando o feto,<sup>(5,14,20)</sup> ou adquirida, ocorrendo principalmente por meio da ingestão de carne crua ou mal-cozida contaminadas com cistos teciduais

contendo bradizoítos, ou alimentos contaminados com oocistos contendo esporozoítos.<sup>(5,9)</sup>

Em humanos, o *T. gondii* apresenta alta infectividade e baixa patogenicidade.<sup>(21)</sup> A infecção geralmente é assintomática em indivíduos imunocompetentes. Quando sintomática, os sintomas são em muitos casos inespecíficos, como febre, dor de cabeça, dor muscular e linfadenopatia.<sup>(5,22)</sup> No entanto em alguns indivíduos a infecção pode ser grave com manifestações clínicas evidentes.<sup>(12,21)</sup>

A gravidade da doença congênita está relacionada com o tipo de cepa adquirida, estado imunológico da gestante e o período da gestação em que ocorreu a infecção.<sup>(5,23)</sup> A transmissão para o feto é menor no começo da gestação (10-24 semanas), porém se ocorrer, a doença é mais grave podendo levar ao aborto ou manifestações clínicas severas com comprometimento do sistema nervoso central, retinocoroidites, estrabismo, cegueira, epilepsia, retardo mental, encefalite, microcefalia, calcificações cerebrais, entre outros. O risco de transmissão é maior no final da gestação (26-40 semanas), porém a infecção nesse período resulta na maioria das vezes na manifestação subclínica da doença, podendo levar ao desenvolvimento de sequelas como retinocoroidite e comprometimento neurológico na segunda ou terceira década de vida.<sup>(5,14,16,24,25)</sup>

A retinocoroidite toxoplásmica é reconhecidamente a causa mais comum de uveíte posterior, e caracteriza-se pela presença de lesões na retina e ou coróide, podendo levar a perda parcial ou total da visão.<sup>(8)</sup> Lesões típicas de retinocoroidite apresentam-se por uma retinocoroidite focal necrosante acompanhada de reação vítrea, podendo estar associada à lesão cicatrizada satélite, indicativa de ataque recorrente. Podem surgir lesões em decorrência da reativação da infecção, presentes nas margens das lesões antigas, longe do foco primário (lesão satélite).<sup>(8,21)</sup>





Figura 6. Lesão sugestiva de toxoplasmose ocular. A) Lesão de retinocoroidite, com lesão típica adjacente a cicatriz antiga. B) Mesma lesão após 6 semanas de terapêutica, apresentando melhor definição das bordas e acúmulo de pigmento. Adaptado de Nogueira & Liverani (2014).<sup>(26)</sup>

Outras formas da doença são mais comuns em alguns grupos de pacientes como os transplantados e os imunocomprometidos, sendo que no primeiro, a queda da imunidade pode levar a reativação de uma infecção latente resultante da ruptura de cistos teciduais, ou até mesmo infectar-se quando receber um órgão contaminado com cistos teciduais, sendo comum neste grupo o desenvolvimento da forma pulmonar ou disseminada da doença, o que tem sido observado com maior frequência em pacientes que realizaram transplante de coração.<sup>(5)</sup>

Nos imunocomprometidos, como os pacientes com AIDS, a toxoplasmose cerebral é a forma da doença mais comum podendo causar uma série de sintomas neurológicos graves,<sup>(5)</sup> apresentando altos índices de óbito no estado de São Paulo.<sup>(27)</sup> A incidência da doença neste grupo está relacionada, principalmente quando a contagem de células TCD4<sup>+</sup> está abaixo de 100 células por microlitro.<sup>(5)</sup>

### 1.5 Diagnóstico Laboratorial da toxoplasmose

Devido às manifestações inespecíficas da infecção por *T. gondii* e a dificuldade do diagnóstico clínico, os testes sorológicos são os mais utilizados para identificação da infecção.<sup>(5,11,23)</sup> Vários testes sorológicos foram desenvolvidos para identificação de anticorpos anti-*T. gondii*, sendo muitos deles produzidos por kits comerciais, destacando-se os métodos *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA), *Enzyme Linked Fluorescent Assay* (ELFA), *Imunofluorescent Antibody Test* (IFAT), *Immunosorbent Agglutination Assay* (ISAGA), *Indirect Haemagglutination Assays* (IHA).<sup>(28,29)</sup>

A pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* é utilizada para identificar o estágio da infecção, sendo que a presença de anticorpos da classe IgG para *T. gondii* indica que houve infecção pelo parasito, sendo considerado como anticorpo de infecção tardia (crônica).<sup>(11,30-32)</sup> A presença de anticorpos da classe IgM é indicativa de infecção recente (aguda), entretanto, esses anticorpos podem permanecer presentes por meses ou anos.<sup>(11,30,31,33,34)</sup> A avaliação desses anticorpos separadamente não difere infecção recente de tardia, porém o uso combinado com a pesquisa de anticorpos da classe IgA, IgE e teste de avidéz para IgG, podem auxiliar no diagnóstico de infecção aguda.<sup>(28,31,33,35,36)</sup>

A pesquisa de anticorpos da classe IgA tem se mostrado um marcador importante, principalmente para identificação da doença congênita, visto que os anticorpos da classe IgM podem surgir no feto durante a infecção no início da gestação e não ser mais detectados ao nascimento.<sup>(37,38)</sup> Porém, poucos trabalhos, principalmente, no Brasil descrevem o comportamento e o uso do IgA no diagnóstico da doença em gestantes.

O diagnóstico molecular tem sido utilizado em todo o mundo para a identificação do parasito, principalmente em casos onde a análise sorológica pode tornar-se difícil ou duvidosa como na doença congênita ou em pacientes com HIV/AIDS.<sup>(33,39-41)</sup>

Vários testes moleculares são utilizados para identificação do *T. gondii* como a reação em cadeia da polimerase convencional (cnPCR), Nested PCR, PCR em tempo real (qPCR), que oferecem rapidez, sensibilidade e alta especificidade na identificação do parasito em diversas amostras biológicas como sangue, líquido amniótico, líquido cefalorraquidiano, humor aquoso, etc.<sup>(33,42)</sup> Porém, a detecção do DNA do *T. gondii* pelos métodos moleculares ainda é bastante controversa, visto que há várias técnicas e marcadores para a identificação do parasito, e não há um consenso de qual o melhor protocolo a ser utilizado. Essas variações encontradas entre os métodos moleculares podem estar associadas a diversos fatores como, a escolha dos genes, composição dos *primers*, parâmetros de amplificação, tratamento do paciente e características genéticas do hospedeiro e do parasita.<sup>(43)</sup>

Dentre as regiões do DNA do *T. gondii*, as mais pesquisadas são os marcadores do gene *BI*, 529 pb de elementos repetitivos e 18s rDNA. O gene *BI* tem sido utilizado amplamente para estudos epidemiológicos e diagnóstico da doença no Brasil em diversos grupos, como gestantes e indivíduos imunocomprometidos, pois apresenta uma região bem conservada do DNA do *T. gondii* que se repete 35 vezes.<sup>(33,41,44)</sup>

### **1.6 Aspectos Epidemiológicos e diversidade gênica do *T. gondii***

A toxoplasmose é uma doença mundialmente disseminada. A prevalência da doença varia de um país para outro e até mesmo em regiões diferentes do mesmo país. Apresenta baixa prevalência nos países da América do Norte, sudeste da Ásia e norte da

Europa, média prevalência nos países da Europa central e do sul e alta prevalência nos países da América do Sul e em regiões tropicais da África. Vários fatores estão relacionados à grande variabilidade da soroprevalência da doença, incluindo as condições climáticas, ambientais, hábitos alimentares, sociais, culturais e higiênicos.<sup>(5,8,12,45)</sup>

Estudos epidemiológicos realizados em diferentes estados brasileiros nas últimas décadas revelaram altos índices de infecção por *T. gondii*; a soroprevalência variou de 49,2% no Paraná a 77,9% no Maranhão. (Quadro 1)

Os primeiros estudos genéticos de populações para *T. gondii* avaliaram cepas isoladas de humanos e animais provenientes da Europa e América do Norte, sendo possível agrupá-las em três linhagens diferentes designadas tipo I, II e III. Essas cepas foram isoladas a partir do bioensaio em camundongos, sendo então classificadas de acordo com a virulência apresentada nesses animais.<sup>(55,56)</sup>

Cepas do tipo I foram classificadas como virulentas, pois levavam a morte dos camundongos em um período de tempo rápido após serem inoculados, não formando cistos teciduais. Cepas do tipo II e III foram classificadas como não virulentas, pois permitiram uma maior sobrevivência dos camundongos infectados após inoculação, com formação de cistos teciduais. Esses estudos foram realizados em animais de laboratório e ainda não se sabe o comportamento dessas cepas na infecção em humanos.<sup>(55)</sup> Acredita-se que vários outros fatores estejam relacionados à gravidade da doença, tais como a via de contaminação, a carga parasitária e a imunidade do hospedeiro.<sup>(5)</sup>

Após a classificação dessas cepas foi possível identificar que era predominante as linhagens tipo II e III na Europa e na América do Norte. Estudos posteriores analisaram amostras da América do Sul e verificaram que as linhagens de cepas

presentes nessa região eram diferentes das linhagens apresentadas na América do Norte e Europa. Há hipótese de que as cepas da América do Sul tenham migrado para outros países como a América do Norte, principalmente por migração aviária, visto que o predomínio de linhagens clonais ocorre nestes países e não na América do Sul.<sup>(5,57)</sup>

Diante da diversidade das cepas encontradas na América do Sul, a investigação da aplicabilidade de kits comerciais utilizados no diagnóstico da infecção por *T. gondii* em amostras brasileiras torna-se uma ferramenta importante, visto que a maioria desses kits são produzidos em outros países, como América do Norte e Europa onde há predominância de cepas clonais. Portanto, não se sabe se esses kits produzidos nesses países reajam de forma adequada nas amostras de pacientes infectados com cepas do Brasil. Desta forma, este trabalho buscou comparar alguns dos métodos mais utilizados para a detecção da infecção por *T. gondii* na região estudada.

Quadro 1: Soroprevalência da toxoplasmose em diferentes estados do Brasil.

<b>Período</b>	<b>Estado</b>	<b>Prevalência</b>	<b>Pacientes</b>	<b>Referências</b>
2011 - 2012	Caxias, MA	77,9% (N= 437)	Gestantes	Câmara et al (2015). <sup>(46)</sup>
2012 – 2013	Gurupi, TO	68,7% (N=487)	Gestantes	Regina-Silva et al (2014). <sup>(47)</sup>
2009 – 2010	São José do Rio Preto, SP	74,5% (N=349)	Ocular	Ferreira et al (2014) <sup>(48)</sup>
2010 - 2011	Niterói, RJ	58,5% (N=400)	Gestantes	Moura et al (2013) <sup>(49)</sup>
2009 – 2010	São José do Rio Preto, SP	73,4% (184)	Ocular	Mattos et al (2011) <sup>(20)</sup>
2006-2007	São José do Rio Preto, SP	62,0% (N=556)	Gestantes	Gonçalves et al (2010) <sup>(50)</sup>
2005	Fortaleza, CE	68.6% (N=963)	Gestantes	Sroka et al (2010) <sup>(25)</sup>
2004	Rio de Janeiro, RJ	65,9% (N=1071)	Ocular	Aleixo et al (2009) <sup>(51)</sup>
NI	Paraná	49,2% (N=492)	Gestantes	Lopes et al (2009) <sup>(52)</sup>
NI	Amazonas	73,5% (N=260)	População indígena	Bóia et al (2008) <sup>(53)</sup>
1997 - 1998	Rio Grande do Sul	74,5% (N=1583)	Gestantes	Spalding et al (2005) <sup>(54)</sup>

## 1.7 Objetivo Geral

Investigar e caracterizar a infecção por *T. gondii* em seus aspectos sorológicos e moleculares em pacientes atendidos em um hospital escola da região noroeste do Estado de São Paulo.

## 1.8 Objetivos Específicos

1. Validar os testes sorológicos comerciais ELISA e ELFA, utilizados na identificação de anticorpos anti-*T. gondii* em grupos de pacientes com suspeita ou diagnóstico clínico de toxoplasmose ocular, congênita ou gestacional;
2. Validar os testes moleculares PCR convencional (cnPCR), Nested PCR, PCR em tempo real (qPCR) em amostras biológicas (sangue periférico e líquido amniótico).

## **2. Resultados**

---



Os resultados deste trabalho serão apresentados na forma de três manuscritos que serão submetidos à publicação nas revistas descritas.

### **Manuscrito 1**

**Título:** Avaliação dos testes sorológicos e moleculares utilizados para a identificação da infecção por *Toxoplasma gondii* em gestantes atendidas em um serviço de saúde da região noroeste paulista

**Autores:** Fernando Henrique Antunes Murata, Marina Neves Ferreira, Vera Lucia Pereira-Chioccola, Fabiana Nakashima, Natália Sayoun, Gabriela Soria Santos, Aparecida Perpétuo Silveira Carvalho, Lígia Cosentino Junqueira Franco Spegorin, Luiz Carlos de Mattos, Cinara de Cássia Brandão de Mattos

Manuscrito será submetido a revista Journal of Clinical Microbiology – 2014 IF: 3.993.

### **Manuscrito 2**

**Título:** Avaliação dos testes sorológicos e moleculares utilizados para a identificação da infecção por *Toxoplasma gondii* em pacientes atendidos no ambulatório de Oftalmologia de um hospital escola na região noroeste paulista

**Autores:** Fernando Henrique Antunes Murata, Vera Lucia Pereira-Chioccola, Fabiana Nakashima, Mariana Previato, Rubens Camargo Siqueira, Amanda Pires Barbosa, Aparecida Perpétuo Silveira Carvalho, Fábio Batista Frederico, Luiz Carlos de Mattos, Cinara de Cássia Brandão de Mattos

Manuscrito será submetido à revista Journal of Clinical Microbiology – 2014 IF: 3.993.

**Manuscrito 3**

**Título:** Avaliação sorológica e molecular para a identificação da infecção por *Toxoplasma gondii* em neonatos nascidos de mães com suspeita de toxoplasmose durante a gestação, atendidas em um hospital escola na cidade de São José do Rio Preto, São Paulo

**Autores:** Fernando Henrique Antunes Murata, Marina Neves Ferreira, Lígia Cosentino Junqueira Franco Spegiorin, Aparecida Perpétuo Silveira Carvalho, Luiz Carlos de Mattos, Cinara de Cássia Brandão de Mattos

Manuscrito será submetido no formato de Short-communication à revista The Pediatric Infectious Disease Journal – IF 2014: 2,723.

**Manuscrito 1**

---

## 2.1 Manuscrito 1

### **Avaliação dos testes sorológicos e moleculares utilizados para a identificação da infecção por *Toxoplasma gondii* em gestantes atendidas em um serviço de saúde da região noroeste paulista**

Fernando Henrique Antunes Murata<sup>1</sup>, Marina Neves Ferreira<sup>1</sup>, Vera Lucia Pereira-Chiocola<sup>2</sup>; Fabiana Nakashima<sup>1</sup>, Natália Sayoun<sup>1</sup>, Gabriela Soria Santos<sup>1</sup>, Aparecida Perpétuo Silveira Carvalho<sup>1</sup>; Lígia Cosentino Junqueira Franco Spegorin<sup>3</sup>; Luiz Carlos de Mattos<sup>1</sup>, Cinara de Cássia Brandão de Mattos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Imunogenética da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

<sup>2</sup>Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas e Fungos do Centro de Parasitologia e Micologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, São Paulo, Brasil.

<sup>3</sup>Hospital da Criança e Maternidade, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil

### **Resumo**

**Introdução:** A toxoplasmose pode ser grave durante a gestação, e os testes sorológicos e moleculares são importantes para o diagnóstico da doença, sendo necessária a utilização de métodos sensíveis e específicos. **Objetivo:** Comparar os métodos sorológicos e moleculares utilizados na identificação da infecção por *T. gondii* nos grupos de gestantes analisadas. **Material e métodos:** Foram compostos dois grupos. G1: Gestantes de alto risco sem suspeita clínica de toxoplasmose (N = 94), e G2:

Gestantes com suspeita clínica (N = 53). Foram coletadas amostras de sangue para realização dos testes sorológicos e moleculares em ambos os grupos, e nas gestantes do G2 também foi coletado líquido amniótico. Os resultados foram comparados pelo índice Kappa e calculado os valores de sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP) e negativo (VPN). **Resultados:** Os testes sorológicos apresentaram: Kappa, G1: IgG = 0,83, IgM = 1,0; G2: IgG = 1,0, IgM = 0,78, ELISA e ELFA IgM: S=75,5%, E=100,0%, VPP=100,0%, VPN=87,8% e S=79,2%, E=100,0%, VPP=100,0%, VPN=89,5% respectivamente, e para IgG: S=100,0%, E=46,8%, VPP=51,5%, VPN=100,0% e S=100,0%, E=38,3%, VPP=47,7%, VPN=100,0% respectivamente. Para a análise molecular a pesquisa do *T. gondii* realizada pelo cnPCR (JW62/63), Nested PCR, cnPCR (B22/23) e qPCR apresentaram S=0,0%, E=100,0%, VPP=0,0%, VPN=63,9%, S=5,7%, E=100,0%, VPP=100,0%, VPN=65,3%, S=7,5%, E=98,9%, VPP=80,0%, VPN=65,5% e S=1,9%, E=100,0%, VPP=100,0%, VPN=64,4% respectivamente. Das 50 amostras de líquido amniótico do G2, 29 (58,0%) foram positivas no cnPCR. **Conclusão:** Os métodos sorológicos apresentaram concordância tanto para IgM como IgG, e os métodos moleculares apresentaram-se discordantes, sendo necessário mais estudos que permitam acompanhar o curso da infecção por *T. gondii* dessas gestantes.

**Palavras-chave:** *Toxoplasma gondii*; diagnóstico sorológico; Reação em Cadeia da Polimerase

## **Introdução**

A toxoplasmose é uma doença causada pelo parasito intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii*, e afeta mamíferos e aves no mundo todo.<sup>(1,2)</sup> Em humanos a doença pode ser grave principalmente durante a gestação, onde o parasito pode atravessar a barreira placentária e infectar o feto, causando sequelas graves e até fatais.<sup>(2)</sup>

A soroprevalência da doença gestacional é elevada no Brasil.<sup>(3-7)</sup> Um estudo realizado na região noroeste do estado de São Paulo mostrou que a soroprevalência em gestantes é de 64,4%.<sup>(8)</sup>

O diagnóstico precoce e o tratamento anti-parasitário podem reduzir a gravidade da doença no feto que, se não tratado, pode apresentar complicações como microcefalia, hidrocefalia, calcificações cerebrais, retinocoroidites, retardo mental, entre outros.<sup>(3,9,10)</sup>

O diagnóstico clínico da toxoplasmose é difícil, pois as manifestações clínicas são muitas vezes inespecíficas. No entanto, a utilização de testes sorológicos e moleculares podem auxiliar na identificação precoce da doença.<sup>(2,11)</sup> O objetivo deste estudo foi avaliar os métodos sorológicos e moleculares para diagnóstico de toxoplasmose em gestantes atendidas em um hospital escola na região noroeste paulista.

## **Material e Métodos**

### **Casuística**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Rio Preto – FAMERP (CAAE 32259714.8.0000.5415). É um estudo retrospectivo que analisou gestantes atendidas e clinicamente avaliadas no Ambulatório

de Gestação de Alto Risco e Medicina Fetal da Funda o Faculdade Regional de Medicina, Hospital de Base – FUNFARME, São José do Rio Preto, Brasil.

Foram compostos dois grupos. Grupo 1 (G1): Gestantes de alto risco sem suspeita clínica de toxoplasmose (N = 94). Grupo 2 (G2): Gestantes de alto risco com suspeita clínica de toxoplasmose e/ou apresentaram anticorpos da classe IgM em algum momento da gesta o (N = 53).

Em ambos os grupos foi coletado sangue periférico em tubo seco para realiza o da análise sorológica e em tubo com EDTA para extra o de DNA e realiza o dos testes moleculares. As análises sorológicas e moleculares do sangue periférico foram realizadas no Laboratório de Imunogenética da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP. Das 53 gestantes do G2, 50 foram também encaminhadas para a amniocentese para pesquisa do *T. gondii* no líquido amniótico. O líquido amniótico foi encaminhando para o laboratório de referência do estado para realiza o da Rea o em cadeia da polimerase convencional (cnPCR). Todas as gestantes são rotineiramente triadas no ambulatório de gesta o de alto risco para TORSCH (Toxoplasmose, Rubéola, Sífilis, Citomegalovírus, Hepatite e HIV).<sup>(12)</sup>

### **Pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* por ELISA e ELFA**

A presença de anticorpos anti-*T. gondii* foi confirmada pelos métodos ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (Diasorin, Itália) utilizando os kits ETI-TOXOK-A reverse plus para pesquisa de IgA, ETI-TOXOK-M reverse plus para pesquisa de IgM e ETI-TOXOK-G plus para pesquisa de IgG, e ELFA - *Enzyme Linked Fluorescent Assay* (Biomerieux, França) utilizando os kits Vidas<sup>®</sup>Toxo IgM (TXM) para pesquisa de IgM, Vidas<sup>®</sup>Toxo IgG II (TXG) para pesquisa de IgG, e Vidas<sup>®</sup>Toxo

IgG Avidity (TXGA) para avides de IgG. A detecção de anticorpos das classes IgA e IgM foi realizada pelo método ELISA de captura. Todas as amostras que apresentaram anticorpos anti-*T. gondii* positivos para IgG e IgM por ELFA foram testadas para avides do IgG. A determinação da avides das IgG foi realizada pelo método ELFA. Baixos títulos de avides (<25%) são indicativos de infecção recente. O método ELFA foi realizado em equipamento automatizado (Mini Vidas, Biomerieux, França) e ambos os testes foram realizados conforme instruções do fabricante. Os valores de referência utilizados pelo método ELISA IgG foram: Reagentes, quando a concentração de IgG foi >15 UI/mL, e não reagentes, quando a concentração de IgG foi  $\leq 15$  UI/mL. Para o método ELISA IgA foram: Reagentes, quando a concentração de IgA foi > 5 UA/mL, e não reagentes, quando a concentração de IgA foi  $\leq 5$  UA/mL. Para o método ELISA IgM foram comparados os valores da absorbância das amostras com a média do controle do *cut-off*, sendo consideradas reagentes as amostras com valores de absorbância maior ou igual a do *cut-off* e, não reagentes as amostras com valores de absorbância menores que o valor do *cut-off*. Para o método ELFA IgG foram: Reagentes quando apresentou título  $\geq 8$  UI/mL; indeterminado quando apresentou  $\geq 4$  e  $\leq 8$  UI/mL, e não reagente quando <4 UI/mL. Para o método ELFA IgM foram: Reagentes quando apresentou índice  $\geq 0,65$  UI/mL, indeterminado quando  $\geq 0,55$  e < 0,65 UI/mL, e não reagente quando < 0,55 UI/mL. Para a determinação da avides das IgG foram: IgG de fraca avides < 0,200; avides intermediária  $0,200 \leq e < 0,300$ ; IgG de forte avides  $\geq 0,300$ .

### **Extração do DNA genômico**



Foi extraído o DNA genômico a partir de 5 ml de sangue periférico colhido com EDTA, com uso de kit comercial (Qiam DNA blood mini kit, Qiagen, Alemanha) de acordo com protocolo descrito por Mattos e colaboradores (2011).<sup>(13)</sup> O DNA extraído foi armazenado em freezer a -20°C até a realização da PCR.

### **Identificação do gene *B1* de *Toxoplasma gondii***

#### **Reação em Cadeia da Polimerase convencional (cnPCR)**

Foram realizadas duas reações de cnPCR para identificar o *T. gondii* em amostras de sangue. Uma delas utilizando os oligoiniciadores B22 (Sense: 5'-AACGGGCGAGTAGCACCTGAGGAGA-3') e B23 (Anti-sense: 5'-TGGGTCTACGTCGATGGCATGACAACT-3'), que amplificam um fragmento de 115 pares de base do gene *B1* do *T. gondii*. Para a preparação do mix foi utilizado 8,5 µL de H<sub>2</sub>O Nuclease Free (Promega, EUA); 12,5 µL de GoTaq Green Master Mix (Promega, EUA); 1,0 µL do *primers* B22 e 1,0 µL do B23 (IDT, EUA). O ciclo utilizado para esta PCR foi 95°C por cinco minutos, 95°C por 45 segundos (35X), 62°C por 45 segundos (35X), 72°C por 45 segundos (35X) e 5 minutos à 72°C em um termociclador (Verity, Applied Biosystems, EUA). Em seguida o amplificado foi submetido a corrida eletroforética em gel de agarose 1,5%.

A outra reação utilizou os oligoiniciadores JW62 (Anti-sense: 5'-TTCTCGCCTCATTCTGGGTCTAC-3') e JW63 (Sense: 5'-GCACCTTTCGGACCTCAACAACCG-3') que amplificam um fragmento de 286 pares de base do gene *B1* do *T. gondii*. Para a preparação do mix foi utilizado 6,5 µL de H<sub>2</sub>O Nuclease Free (Promega, EUA); 12,5 µL de GoTaq Green Master Mix (Promega, EUA); 0,5 µL do *primers* JW62 e 0,5 µL do JW63 (IDT, EUA). O ciclo utilizado foi

95°C por cinco minutos, 95°C por 45 segundos (40X), 55°C por 45 segundos (40X), 72°C por 45 segundos (40X) e 5 minutos à 72°C em um termociclador (Verity, Applied Biosystems, EUA). Em seguida o amplificado foi submetido a corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5%.

### **Nested PCR**

O material genético amplificado com o marcador JW 62/63 foi submetido a uma segunda PCR (Nested PCR) utilizando os oligoiniciadores B22/23, conforme protocolo desenvolvido com modificações publicado por Okay e colaboradores (2009).<sup>(14)</sup> Para a preparação do mix da segunda reação (Nested PCR) foi utilizado 6,5 µL de H<sub>2</sub>O Nuclease Free (Promega, EUA); 12,5 µL de GoTaq Green Master Mix (Promega,EUA); 0,5 µL do *primers* B22 e 0,5 µL do B23 (IDT, EUA). O ciclo utilizado para a Nested PCR foi 95°C por cinco minutos, 95°C por 45 segundos (25X), 62°C por 45 segundos (25X), 72°C por 45 segundos (25X) e 5 minutos à 72°C em um termociclador (Verity, Applied Biosystems, EUA). Os amplicons foram analisados em gel de agarose a 1,5% utilizando o corante SYBR Safe (Invitrogen, EUA).

### **PCR em tempo real (qPCR)**

O DNA genômico foi submetido também ao método de PCR em tempo real (qPCR) para pesquisa do gene *BI*. O ciclo foi realizado no aparelho Step One Plus (Applied Biosystems, EUA) com volume final da reação de 20 µL, utilizando os seguintes componentes: 4,5 µL de H<sub>2</sub>O RNase Free; 10,0 µL de 2x QuantiTect Probe PCR Master Mix; 0,5 µL de PrimeTime (Qiagen, Alemanha) com as seguintes temperaturas: uma vez de 50°C por 2 minutos, uma vez de 95°C por 15 minutos, 40 vezes 94°C por 15 segundos, 40 vezes de 60°C por 1 minuto e uma vez de 50°C por 30

segundos. Os *primers* e a sonda utilizados nesta análise foram publicados por Gunel e colaboradores (2012).<sup>(15)</sup>

Em todas as reações de PCR (cnPCR, Nested e qPCR) foi incluído um controle negativo (água ultrapura) e um controle positivo (DNA extraído de *T. gondii* da cepa RH). O *primer* HGH que amplifica um fragmento de 400 pares de base do gene hormônio de crescimento humano foi utilizado como controle de amplificação e detecção de inibidores da PCR.

### **Análise Estatística**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software IBM SPSS Statistics, IBM v.23 para a determinação do valor de Kappa, e o software GraPhPad InStat Software, Inc 3.06 para determinar os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e negativo (VPN) pelo Teste Exato de Fisher, com intervalo de confiança de 95%. Os valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

A análise de concordância Kappa foi realizada para descrever a intensidade de concordância entre os dois testes sorológicos. Os resultados foram interpretados conforme publicado por Landis e Koch (1977)<sup>(16)</sup> sendo considerados como concordância: Baixa: Kappa  $<0$ ; Leve: Kappa  $0 - 0,19$ ; Razoável: Kappa  $0,2$  a  $0,39$ ; Moderada: Kappa  $0,4 - 0,59$ ; Grande: Kappa  $0,6 - 0,79$ ; Quase perfeita: Kappa  $0,8 - 1,0$ .

### **Resultados**

A média de idade do G1 foi igual a 27,6 anos (Mínima 18; Máxima 41; SD 6,0), e do G2 foi igual a 24,0 anos (Mínima 14; Máxima 42; SD 7,0). A média de idade do

G1 apresentou diferença estatisticamente significativa com relação à média de idade do G2 ( $p = 0,0014$ ; Teste t-student = 3,263; Grau de liberdade = 145; Intervalo de confiança de 95% = 1.428-5.816).

O valor de Kappa para detecção de anticorpos da classe IgG anti *T-gondii* para G1 foi 0,83, e para IgM foi de 1,0. Ambos apresentaram concordância quase perfeita entre as duas técnicas utilizadas.

Para G2 o valor de Kappa para anticorpos da classe IgG anti *T-gondii* foi de 1,0 apresentando concordância quase perfeita entre os métodos, e para IgM foi 0,78, apresentando grande concordância entre os métodos utilizados

Das 94 amostras de gestantes do G1 analisadas, 58 (61,7%) foram positivas para a IgG por ELFA e 50 (53,2%) para IgG por ELISA. Ambos os testes foram negativos para pesquisa de IgM. Apenas uma amostra apresentou resultado positivo para IgA, a qual foi positiva também para IgG por ELFA e negativa para IgG por ELISA.

Das 53 amostras do G2, todas foram positivas para a pesquisa de IgG (100%) por ELFA e ELISA, 42 (79,2%) foram positivas para IgM por ELFA e 40 (75,5%) por ELISA. Das 53 amostras 30 (56,6%) foram positivas para IgA. Das amostras positivas para IgA, 28 (93,3%) foram positivas para IgM por ELFA, e 26 (86,7%) para IgM por ELISA. Os resultados dos testes sorológicos do G1 e G2 encontram-se na tabela 1.

Das 42 (79,2%) amostras que apresentaram sorologia positiva para IgG e IgM foi realizada a determinação da avidéz para IgG que apresentou, forte avidéz em 31 (73,8%) amostras, avidéz intermediária em 4 (9,5%) amostras e fraca avidéz em 7

(16,7%) amostras. Das 28 amostras positivas para IgM e IgA, 7 (25%) apresentaram fraca avidéz para IgG, 3 (10,7%) avidéz intermediária e 18 (64,3%) forte avidéz.

Em relação ao resultado dos testes moleculares no G1, apenas 1 (1,1%) amostra foi positiva, por cnPCR (B22/23) (valor de  $p = 0.390$ ; grau de liberdade = 3;  $\chi^2 = 3.008$ ). No G2, 6 (11,3%) amostras foram positivas no sangue em alguma das reações de PCR, sendo 3 (5,7%) no Nested PCR, 4 (7,5%) no cnPCR (B22/B23) e 1 (1,9%) no qPCR (valor de  $p = 0.158$ ; grau de liberdade = 3;  $\chi^2 = 5.196$ ). Os resultados dos testes moleculares realizados no sangue das gestantes encontram-se na tabela 2

O cnPCR realizado nas 50 amostras de líquido amniótico, 29 (58,0%) amostras foram positivas e 21 (42,0%) negativas. Das 29 gestantes com PCR positivo no líquido amniótico, 3 foram positivas no PCR pelo sangue (Nested=1; cnPCR (B22/23)=1; qPCR=1), 21 foram positivas por ELISA IgM, 22 por ELFA IgM e 19 por ELISA IgA. Das 22 gestantes positivas por ELFA IgM e IgG, 6 (27,3%) apresentaram fraca avidéz para IgG, 2 (9,1%) intermediária e 14 (63,6%) forte avidéz.

A sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP) e negativo (VPN) foi calculada para cada teste sorológico e molecular separadamente. Quando comparados a pesquisa de anticorpos da classe IgM por ELISA e ELFA apresentaram  $S=75,5\%$ ,  $E=100,0\%$ ,  $VPP=100,0\%$ ,  $VPN=87,8\%$  e  $S=79,2\%$ ,  $E=100,0\%$ ,  $VPP=100,0\%$ ,  $VPN=89,5\%$ , respectivamente. Quando comparados com IgG apresentaram  $S=100,0\%$ ,  $E=46,8\%$ ,  $VPP=51,5\%$ ,  $VPN=100,0\%$  e  $S=100,0\%$ ,  $E=38,3\%$ ,  $VPP=47,7\%$ ,  $VPN=100,0\%$ , respectivamente.

Para a análise molecular a pesquisa do *T. gondii* realizada pelos PCRs cnPCR (JW62/63), Nested, cnPCR (B22/23) e qPCR no sangue apresentaram  $S=0,0\%$ ,

E=100,0%, VPP=0,0%, VPN=63,9%, S=5,7%, E=100,0%, VPP=100,0%, VPN=65,3%, S=7,5%, E=98,9%, VPP=80,0%, VPN=65,5% e S=1,9%, E=100,0%, VPP=100,0%, VPN=64,4% respectivamente.

## **Discussão**

Este estudo comparou os métodos sorológicos e moleculares utilizados para identificar a infecção por *T. gondii* em gestantes com e sem suspeita clínica de toxoplasmose gestacional na região noroeste paulista. A taxa de infecção, detectada pelos métodos sorológicos, demonstrou ser elevada para as gestantes inseridas neste estudo, o que está de acordo com outros estudos realizados no Brasil,<sup>(3,17,18)</sup> e em outros países.<sup>(7,19-21)</sup>

Os métodos sorológicos ELISA e ELFA são amplamente utilizados para a identificação da infecção por *T. gondii* no Brasil, apresentando alta sensibilidade e especificidade.<sup>(22-24)</sup> Em nosso estudo não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre os métodos sorológicos utilizados. Entretanto, quatro amostras apresentaram discordância na pesquisa de IgM entre os métodos ELFA e ELISA, sendo que o ELFA apresentou maior positividade. Essas amostras apresentaram forte avidéz para IgG, o que é indicativo de infecção crônica, e dessas, duas também foram positivas para IgA. A presença desses anticorpos, principalmente de IgM na fase crônica da doença também têm sido identificada por outros autores.<sup>(25-27)</sup> Os anticorpos da classe IgM são amplamente utilizados para identificar a doença na fase aguda, porém estes podem permanecer detectáveis por longos períodos, sendo assim necessário realizar outros testes para confirmar a infecção aguda, como a avidéz para IgG, pesquisa de IgE e testes parasitológicos.<sup>(28)</sup>

Alem destes fatores, a maior detecção de IgM por ELFA pode estar relacionada a melhor sensibilidade apresentada pelos métodos automatizados, visto que testes com maior sensibilidade podem detectar esses anticorpos específicos por períodos maiores após a infecção aguda,<sup>(29,30)</sup> o que dificulta o diagnóstico de infecção recente em gestantes, porém essa alta sensibilidade é vantajosa para o diagnóstico em recém-nascidos, como descrito por Rodrigues e colaboradores, 2009.<sup>(9)</sup>

Neste estudo o ELFA apresentou maior sensibilidade na detecção de anticorpos da classe IgM e IgG anti-*T. gondii*, o que está de acordo com outros trabalhos que também utilizaram métodos automatizados para a pesquisa desses anticorpos.<sup>(9,31-37)</sup> Em um estudo realizado por Rodrigues e colaboradores (2009) foram utilizados quatro métodos sorológicos para identificação de anticorpos anti-*T. gondii* em neonatos, desses 2 eram automatizados (MEIA e ELFA IgM) e apresentaram sensibilidade (S = 60,9%) e especificidade (E = 100,0%) contra IFAT IgM (S = 59,6%, E = 91,7%) e ELISA IgA (S = 57,1% e E = 100,0%).<sup>(9)</sup> Já em um estudo realizado por Maudry e colaboradores (2009) utilizando amostras de gestantes e pacientes imunocomprometidos para comparar 6 métodos automatizados, a sensibilidade variou de 89,7% a 99,4%, e especificidade de 99,1% a 100% entre os métodos.<sup>(33)</sup>

A baixa especificidade dos métodos para a pesquisa de IgG está relacionada principalmente a alta taxa de soroprevalência na região estudada, e a permanência desses anticorpos por toda a vida do hospedeiro, mesmo não apresentando a doença, como evidenciado em alguns estudos que pesquisaram esses anticorpos em populações sem a presença de sintomas clínicos.<sup>(38-40)</sup>

A pesquisa de anticorpos da classe IgA não é frequente e sua utilização para o diagnóstico da infecção gestacional é questionada, porém pode auxiliar o diagnóstico da infecção congênita.<sup>(31,41-44)</sup> Em nosso estudo foi demonstrado que 14 amostras positivas para IgM e com forte avidéz de IgG foram negativas para IgA o que é indicativo de uma infecção crônica, auxiliando o diagnóstico.

A detecção do DNA do *T. gondii* pelos métodos moleculares é bastante controversa, visto que há várias técnicas e marcadores para a identificação do parasito, e não há um consenso de qual o melhor protocolo a ser utilizado. Além do mais, o tratamento da gestante pode modificar os resultados dos testes sorológicos e moleculares, como descrito por alguns autores.<sup>(2,14,45,46)</sup>

Em nosso estudo não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre os métodos moleculares pesquisados. Não foi detectado o DNA do *T. gondii* no G2 utilizando os pares de *primers* JW 62/63, porém essas amostras quando submetidos a uma segunda PCR (Nested PCR) 3 amostras tornaram-se positivas, indicando uma maior sensibilidade do método quando submetido a uma nova amplificação. Concordando com nossos resultados, o estudo conduzido por Okay e colaboradores (2009),<sup>(14)</sup> utilizando amostras de líquido amniótico, também detectou 9 casos positivos a mais no Nested PCR, utilizando os *primers* B22/23 do que somente no cnPCR (JW 62/63).

A pesquisa de *T. gondii* pelo Nested PCR tem mostrado alta sensibilidade,<sup>(14,47,48)</sup> porém o risco de resultados falso-positivos é maior.<sup>(48)</sup> Essas amostras foram submetidas a outro cnPCR utilizando somente os pares de *primers* B22/23, sendo detectadas 4 amostras positivas, dessas, 2 foram positivas também no



Nested PCR utilizando os mesmos pares de *primers*. Estes achados discordantes entre os métodos moleculares também foram relatados por outros trabalhos.<sup>(14,49-51)</sup> Esses autores sugerem que essas discordâncias podem estar relacionadas a vários fatores como os métodos utilizados para extração do DNA genômico, remoção dos fatores de inibição da PCR, escolha dos *primers* e parâmetros de amplificação.<sup>(14,49,51)</sup>

Com relação aos resultados da qPCR, foi observada amplificação somente em uma amostra, a qual apresentava fraca avidéz para IgG. Este achado é compreensivo, pois é esperado detectar parasitemia em casos de infecção aguda,<sup>(52)</sup> o que foi evidenciado para esta amostra pela fraca avidéz e o resultado positivo pelo PCR no LA. De acordo com alguns autores, qPCR é considerada uma técnica de maior sensibilidade e os riscos de contaminação são menores.<sup>(31,53,54)</sup>

Os resultados dos PCRs quando comparados ao teste de avidéz para IgG mostraram que as 5 amostras positivas (Nested = 3; cnPCR (B22/23) = 4) apresentavam forte avidéz para IgG, e a única amostra positiva no qPCR apresentou fraca avidéz para IgG. Diante destes achados, não é possível descartar a possibilidade de resultados falsos positivos apresentados no Nested PCR e cnPCR, visto que os resultados sorológicos são sugestivo de infecção crônica, não sendo esperado a detecção de parasitemia. Já o resultado da qPCR é compreensivo, pois o resultado da sorologia sugere infecção aguda a qual é caracterizada por períodos de parasitemia.<sup>(55)</sup>

Em G1 apenas uma amostra apresentou positividade no cnPCR utilizando os pares de *primers* B22/B23. Essa gestante apresentou sorologia não reagente para IgA e IgM, porém positiva com altas concentrações para IgG por ELISA e ELFA. Casos de gestantes cronicamente infectadas que tiveram reativação da doença durante a gestação

foram reportadas por Andrade e colaboradores (2010)<sup>(56)</sup> e Olival e colaboradores (2014),<sup>(57)</sup> com transmissão da doença congênita para os respectivos bebês. Em nosso estudo avaliamos apenas as gestantes atendidas. Para confirmar a suspeita de toxoplasmose gestacional e congênita seria necessário o acompanhamento sorológico e molecular da gestante e do bebê. Em todo caso não é descartada a hipótese de um resultado falso-positivo pelo método, visto que a parasitemia não foi identificada pelos outros métodos.

Foi verificada maior positividade das gestantes com suspeita clínica por PCR no líquido amniótico do que no sangue. Isso pode ser explicado pelo fato da imunidade da gestante diminuir a quantidade de parasito livre na circulação sanguínea, e também a quantidade de volume circulante, sendo a do sangue muito maior do que a do líquido amniótico, sendo possível identificar o parasito mais facilmente no LA do que no sangue. Na maioria das pesquisas com gestantes é utilizado o líquido amniótico para a pesquisa do parasito, esse material tem mostrado bons resultados para a identificação da doença congênita.<sup>(14,48)</sup> A pesquisa do parasito por PCR no sangue tem mostrado bons resultados em neonatos nascidos de mães com suspeita clínica e pacientes imunocomprometidos.<sup>(58,59)</sup>

## **Conclusão**

A taxa de infecção é elevada entre as gestantes atendidas no ambulatório de gestação de alto risco e a infecção é freqüente em gestantes com menor idade. Os métodos sorológicos apresentaram concordância tanto para a pesquisa de IgM quanto para IgG e os métodos moleculares apresentaram-se discordantes, sendo necessário o acompanhamento do curso da infecção por *T. gondii* das gestantes. A avaliação clínica

continua sendo fundamental para apoiar os resultados encontrados pelas análises laboratoriais. O método ELFA para caracterização da infecção aguda e crônica em gestantes foi mais sensível do que o ELISA. Entre os métodos moleculares, o cnPCR utilizando os pares de *primers* B22/23 apresentou maior sensibilidade, no entanto apresentou menor especificidade quando comparado aos demais métodos moleculares.

### **Financiamentos**

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Processos: #2012/07716-9 LCM; #2013/15879-8 FHAM; #2014/01706-7 MNF; #2014/09496-1 VLPC); pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Processos: PIBIC-CNPq #135144/2014-0; #135229/2014-6) e pela Fundação de Apoio à Pesquisa e Extensão de São José do Rio Preto - FAPERP (Processos: FAPERP FHAM #175/2015 MNF #129/2015).

### **Referências**

- 1 Dubey JP. The history of *Toxoplasma gondii*--the first 100 years. J Eukaryot Microbiol 2008;55:467-75.
- 2 Robert-Gangneux F, Dardé ML. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. Clin Microbiol Rev 2012;25:264-96.
- 3 Sroka S, Bartelheimer N, Winter A, Heukelbach J, Ariza L, Ribeiro H, et al. Prevalence and Risk Factors of Toxoplasmosis among Pregnant Women in Fortaleza, Northeastern Brazil. Am J Trop Med Hyg 2010;83:528-33.

- 4 Gontijo da Silva M, Clare Vinaud M, de Castro AM. Prevalence of toxoplasmosis in pregnant women and vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in patients from basic units of health from Gurupi, Tocantins, Brazil, from 2012 to 2014. PLoS One 2015;10:e0141700.
- 5 Moura FL, Amendoeira MR, Bastos OM, Mattos DP, Fonseca AB, Nicolau JL, et al. Prevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection among pregnant and postpartum women attended at public healthcare facilities in the City of Niterói, State of Rio de Janeiro, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 2013;46:200-7.
- 6 Rebouças EC, dos Santos EL, do Carmo ML, Cavalcante Z, Favali C. Seroprevalence of Toxoplasma infection among pregnant women in Bahia, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 2011;105:670-1.
- 7 Pappas G, Roussos N, Falagas ME. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. Int J Parasitol 2009;39:1385-94.
- 8 Mattos Cde C, Spegiorin LC, Meira Cda S, Silva Tda C, Ferreira AI, Nakashima F, et al. Anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in pregnant women and their newborn infants in the region of São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil. Sao Paulo Med J 2011;129:261-6.
- 9 Rodrigues IM, Castro AM, Gomes MB, Amaral WN, Avelino MM. Congenital toxoplasmosis: evaluation of serological methods for the detection of anti-

*Toxoplasma gondii* IgM and IgA antibodies. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009;104:434-40.

- 10 Bittencourt LH, Lopes-Mori FM, Mitsuka-Breganó R, Valentim-Zabott M, Freire RL, Pinto SB, et al. Seroepidemiology of toxoplasmosis in pregnant women since the implementation of the Surveillance Program of Toxoplasmosis Acquired in Pregnancy and Congenital in the western region of Paraná, Brazil. Rev Bras Ginecol Obstet 2012;34:63-8.
- 11 Bichara CN, Canto GA, Tostes Cde L, Freitas JJ, Carmo EL, Póvoa MM, et al. Incidence of congenital toxoplasmosis in the City of Belém, State of Pará, Northern Brazil, determined by a neonatal screening program: preliminary results. Rev Soc Bras Med Trop 2012;45:122-4.
- 12 Gonçalves MA, Mattos Cde C, Spegiorin LC, Oliani DC, Oliani AH, Mattos LC. Seropositivity rates for toxoplasmosis, rubella, syphilis, cytomegalovirus, hepatitis and HIV among pregnant women receiving care at a public health service, São Paulo state, Brazil. Braz J Infect Dis 2010;14:601-5.
- 13 Mattos CC, Meira CS, Ferreira AI, Frederico FB, Hiramoto RM, Jr. GC, et al. Contribution of laboratory methods in diagnosing clinically suspected ocular toxoplasmosis in Brazilian patients. Diagn Microbiol Infect Dis 2011;70:362-6.
- 14 Okay TS, Yamamoto L, Oliveira LC, Manuli ER, Andrade Junior HF, Del Negro GM. Significant performance variation among PCR systems in diagnosing congenital toxoplasmosis in São Paulo, Brazil: analysis of 467 amniotic fluid samples. Clinics 2009;64:171-6.

- 15 Gunel T, Kalelioglu I, Ermis H, Has R, Aydinli K. Large scale pre-diagnosis of *Toxoplasma gondii* DNA genotyping by real-time PCR on amniotic fluid. *Biotechnol Biotechnol Equip* 2012;26:2913–5.
- 16 Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977;33:159-74.
- 17 Vaz RS, Thomaz-Soccol V, Sumikawa E, Guimarães AT. Serological prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in pregnant women from Southern Brazil. *Parasitol Res* 2010;106:661-5.
- 18 Lopes-Mori FM, Mitsuka-Breganó R, Bittencourt LH, DIAS RC, Gonçalves DD, Capobiango JD, et al. Gestational toxoplasmosis in Paraná State, Brazil: prevalence of IgG antibodies and associated risk factors. *Braz J Infect Dis* 2013;17:405-9.
- 19 Marquez MDLA, Etcheverry IS. Seroprevalence of toxoplasmosis in pregnant women in La Plata area. *Acta Biochim. Clin. Latinoam* 2009;37:413–415.
- 20 Sanchez-Gutierrez A, Martin-Hernandez I, Garcia-Izquierdo SM. Estudio de reactividad a *Toxoplasma gondii* en embarazadas de las provincias Ciudad de la Habana y Pinar del Rio, Cuba. *Bioquimia* 2003;28:3–8.
- 21 Harma M, Harma M, Gungen N, Demir N. Toxoplasmosis in pregnant women in Sanliurfa, Southeastern Anatolia City, Turkey. *J Egypt Soc Parasitol* 2004;34:519-25.

- 22 Barreto JAA, Oliveira LAR, Oliveira MFB, Araújo RM, Santos RCS, Abud ACF, et al. Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em mulheres grávidas. Rev. enferm. UERJ 2009;17:107-0.
- 23 Bichara CN, Canto GA, Tostes Cde L, Freitas JJ, Carmo EL, Póvoa MM, et al. Incidence of congenital toxoplasmosis in the City of Belém, State of Pará, Northern Brazil, determined by a neonatal screening program: preliminary results. Rev Soc Bras Med Trop 2012;45:122-4.
- 24 Avelino MM, Amaral WN, Rodrigues IM, Rassi AR, Gomes MB, Costa TL, et al. Congenital toxoplasmosis and prenatal care state programs. BMC Infect Dis 2014;14:33.
- 25 Spalding SM, Amendoeira MR, Ribeiro LC, Silveira C, Garcia AP, Camillo-Coura L. Prospective study of pregnant and babies with risk of congenital toxoplasmosis in municipal district of Rio Grande do Sul. Rev Soc Bras Med Trop 2003;36:483-91.
- 26 Liesenfeld O, Press C, Montoya JG, Gill R, Isaac-Renton JL, Hedman K, et al. False-positive results in immunoglobulin M (IgM) toxoplasma antibody tests and importance of confirmatory testing: the Platelia Toxo IgM test. J Clin Microbiol 1997;35:174-8.
- 27 Bobić B, Sibalić D, Djurković-Djaković O. High levels of IgM antibodies specific for *Toxoplasma gondii* in pregnancy 12 years after primary toxoplasma infection. Case report. Gynecol Obstet Invest 1991;31:182-4.

- 28 Dhakal R, Gajurel K, Pomares C, Talucod J, Press CJ, Montoya JG. Significance of a Positive Toxoplasma Immunoglobulin M Test Result in the United States. *J Clin Microbiol* 2015;53:3601-5.
- 29 Murat JB, Hidalgo HF, Brenier-Pinchart MP, Pelloux H. Human toxoplasmosis: which biological diagnostic tests are best suited to which clinical situations? *Expert Rev Anti Infect Ther* 2013;11:943-56.
- 30 Del Bono V, Canessa A, Bruzzi P, Fiorelli MA, Terragna A. Significance of specific immunoglobulin M in the chronological diagnosis of 38 cases of toxoplasmic lymphadenopathy. *J Clin Microbiol* 1989;27:2133-5.
- 31 Murat JB, Dard C, Fricker Hidalgo H, Dardé ML, Brenier-Pinchart MP, Pelloux H. Comparison of the Vidas system and two recent fully automated assays for diagnosis and follow-up of toxoplasmosis in pregnant women and newborns. *Clin Vaccine Immunol* 2013;20:1203-12.
- 32 Prusa AR, Hayde M, Unterasinger L, Pollak A, Herkner KR, Kasper DC. Evaluation of the Roche Elecsys Toxo IgG and IgM electrochemiluminescence immunoassay for the detection of gestational Toxoplasma infection. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010;68:352-7.
- 33 Maudry A, Chene G, Chatelain R, Patural H, Bellete B, Tisseur B, et al. Bicentric evaluation of six anti-toxoplasma immunoglobulin G (IgG) automated immunoassays and comparison to the Toxo II IgG Western blot. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16:1322-6.



- 34 Kasper DC, Prusa AR, Hayde M, Gerstl N, Pollak A, Herkner KR, et al. Evaluation of the Vitros ECiQ immunodiagnostic system for detection of anti-Toxoplasma immunoglobulin G and immunoglobulin M antibodies for confirmatory testing for acute *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women. J Clin Microbiol 2009;47:164-7.
- 35 Calderaro A, Piccolo G, Peruzzi S, Gorrini C, Chezzi C, Dettori G. Evaluation of *Toxoplasma gondii* immunoglobulin G (IgG) and IgM assays incorporating the newVidia analyzer system. Clin Vaccine Immunol 2008;15:1076-9.
- 36 Petersen E, Borobio MV, Guy E, Liesenfeld O, Meroni V, Naessens A, et al. European multicenter study of the LIAISON automated diagnostic system for determination of *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G (IgG) and IgM and the IgG avidity index. J Clin Microbiol 2005;43:1570-4.
- 37 Wilson M, Remington JS, Clavet C, Varney G, Press C, Ware D. Evaluation of six commercial kits for detection of human immunoglobulin M antibodies to *Toxoplasma gondii*. The FDA Toxoplasmosis Ad Hoc Working Group. J Clin Microbiol 1997;35:3112-5.
- 38 Rodrigues JP, Frei F, Navarro IT, Silva LP, Marcelino MY, de Andrade-Junior HF, et al. Seroepidemiological analysis of toxoplasmosis in college students. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis 2015;21:1.
- 39 Fromont EG, Riche B, Rabilloud M. Toxoplasma seroprevalence in a rural population in France: detection of a household effect. BMC Infect Dis 2009;9:76.

- 40 Obaidat MM, Al-Sheyab NA, Bani Salman AE, Lafi SQ. Seroepidemiology and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in undergraduate university female students in Jordan. *Epidemiol Infect* 2015;143:1898-903.
- 41 Montoya JG. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. *J Infect Dis* 2002;185:S73-82.
- 42 Pinon JM, Dumon H, Chemla C, Franck J, Petersen E, Lebech M, et al. Strategy for diagnosis of congenital toxoplasmosis: evaluation of methods comparing mothers and newborns and standard methods for postnatal detection of immunoglobulin G, M, and A antibodies. *J Clin Microbiol* 2001;39:2267-71.
- 43 Faure AK, Fricker-Hidalgo H, Pelloux H, Bost-Bru C, Goullier-Fleuret A, Ambroise-Thomas P. Lack of value of specific IgA detection in the postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *J Clin Lab Anal* 1999;13:27-30.
- 44 Jenum PA, Stray-Pedersen B. Development of specific immunoglobulins G, M, and A following primary *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women. *J Clin Microbiol* 1998;36:2907-13.
- 45 Lago EG, Oliveira AP, Bender AL. Presence and duration of anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulin M in infants with congenital toxoplasmosis. *J Pediatr*. 2014;90:363-9.
- 46 Lefevre-Pettazzoni M, Bissery A, Wallon M, Cozon G, Peyron F, Rabilloud M. Impact of spiramycin treatment and gestational age on maturation of *Toxoplasma gondii* immunoglobulin G avidity in pregnant women. *Clin Vaccine Immunol* 2007;14:239-43.

- 47 Mousavi M, Saravani R, Modrek MJ, Shahrakipour M, Sekandarpour S. Detection of *Toxoplasma gondii* in Diabetic Patients Using the Nested PCR Assay via RE and *BI* Genes. Jundishapur Journal of Microbiology 2016;9:e29493.
- 48 Teixeira LE, Kanunfre KA, Shimokawa PT, Targa LS, Rodrigues JC, Domingues W, et al. The performance of four molecular methods for the laboratory diagnosis of congenital toxoplasmosis in amniotic fluid samples. Rev Soc Bras Med Trop 2013;46:584-8.
- 49 Nagy B, Bán Z, Beke A, Nagy GR, Lázár L, Papp C, et al. Detection of *Toxoplasma gondii* from amniotic fluid, a comparison of four different molecular biological methods. Clin Chim Acta 2006;368:131-7.
- 50 Hierl T, Reischl U, Lang P, Hebart H, Stark M, Kyme P, Autenrieth IB. Preliminary evaluation of one conventional nested and two real-time PCR assays for the detection of *Toxoplasma gondii* in immunocompromised patients. J Med Microbiol 2004;53:629-32.
- 51 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 2004;42:1719-22.
- 52 Yamada H, Nishikawa A, Yamamoto T, Mizue Y, Yamada T, Morizane M, et al. Prospective study of congenital toxoplasmosis screening with use of IgG avidity and multiplex nested PCR methods. J Clin Microbiol 2011;49:2552-6.

- 53 Lin MH, Chen TC, Kuo TT, Tseng CC, Tseng CP. Real-time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. J Clin Microbiol 2000;38:4121-5.
- 54 Homan WL, Vercammen M, de Braekeleer J, Verschueren H. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. Int J Parasitol 2000;30:69-75.
- 55 Cordeiro CA, Moreira PR, Dutra WO, Young L, Campos WR, Oréface F, et al. Immunology of the toxoplasmic retinochoroiditis. Arq Bras Oftalmol 2010;73:548-51.
- 56 Andrade GM, Vasconcelos-Santos DV, Carellos EV, Romanelli RM, Vitor RW, Carneiro AC, et al. Congenital toxoplasmosis from a chronically infected woman with reactivation of retinochoroiditis during pregnancy. J Pediatr 2010;86:85-8.
- 57 Olival V, Correia A, Bello A, Cabugueira A, Nunes MJ. Ocular toxoplasmosis reactivation during pregnancy. Acta Obstet Ginecol Port 2014;8:82-83
- 58 Sterkers Y, Ribot J, Albaba S, Issert E, Bastien P, Pratlong F. Diagnosis of congenital toxoplasmosis by polymerase chain reaction on neonatal peripheral blood. Diagn Microbiol Infect Dis 2011;71:174-6.
- 59 Mesquita RT, Vidal JE, Pereira-Chioccia VL. Molecular diagnosis of cerebral toxoplasmosis: comparing markers that determine *Toxoplasma gondii* by PCR in peripheral blood from HIV-infected patients. Braz J Infect Dis 2010;14:346-50.

**Tabela 1. Resultados dos testes sorológicos realizados em amostras das gestantes do G1 e G2 por ELISA (Diasorin, Itália) das classes IgG, IgM e IgA, e ELFA (Biomerieux, França) das classes IgG e IgM**

	Positivo		Negativo		Total	
	N	%	N	%	N	%
<b>Grupo 1*</b>						
ELISA IgG	50	53,2	44	46,8	94	100
ELISA IgM	0	0	94	100	94	100
ELISA IgA	1	1,1	93	98,9	94	100
ELFA IgG	58	61,7	36	38,3	94	100
ELFA IgM	0	0	94	100	94	100
	Positivo		Negativo		Total	
	N	%	N	%	N	%
<b>Grupo 2**</b>						
ELISA IgG	53	100	0	0	53	100
ELISA IgM	40	75,5	13	24,5	53	100
ELISA IgA	30	56,6	23	43,4	53	100
ELFA IgG	53	100	0	0	53	100
ELFA IgM	42	79,2	11	20,8	53	100

\*Análise estatística do G1. ELISA *versus* ELFA IgG valor de  $p = 0,318$ ; Interv. Conf. 95% = 0,672-1,104.

\*\*Análise estatística do G2. ELISA *versus* ELFA IgM  $p = 0,816$ ; Interv. Conf. 95% = 0,774-1,171.

Obs: Não foi possível comparar os resultados entre G1 ELISA *versus* ELFA IgM e G2 ELISA *versus* ELFA IgG.

**Tabela 2. Resultados dos testes moleculares realizados em amostras de sangue periférico das gestantes do G1 e G2 por cnPCR (JW62/63), Nested PCR, cnPCR (B22/23) e qPCR**

	Positivo		Negativo		Total	
	N	%	N	%	N	%
<b>Grupo 1*</b>						
<b>cnPCR (JW62/63)</b>	0	0,0	94	100,0	94	100
<b>Nested PCR</b>	0	0,0	94	100	94	100
<b>cnPCR (B22/23)</b>	1	1,1	93	98,9	94	100
<b>qPCR</b>	0	0,0	94	100,0	94	100
	Positivo		Negativo		Total	
	N	%	N	%	N	%
<b>Grupo 2**</b>						
<b>cnPCR (JW62/63)</b>	0	0,0	53	100,0	53	100
<b>Nested PCR</b>	3	5,7	50	94,3	53	100
<b>cnPCR (B22/23)</b>	4	7,5	49	92,5	53	100
<b>qPCR</b>	1	1,9	52	98,1	53	100

\*  $p = 0.390$ ;  $GL = 3$ ;  $\chi^2 = 3.008$ .

\*\*  $p = 0.158$ ;  $GL = 3$ ;  $\chi^2 = 5.196$ .

**Manuscrito 2**

---

## 2.2 Manuscrito 2

### **Avaliação dos testes sorológicos e moleculares utilizados para a identificação da infecção por *Toxoplasma gondii* em pacientes atendidos no ambulatório de Oftalmologia de um hospital escola na região noroeste paulista**

Fernando Henrique Antunes Murata<sup>1</sup>, Vera Lucia Pereira-Chioccola<sup>2</sup>; Fabiana Nakashima<sup>1</sup>, Mariana Previato<sup>1</sup>, Rubens Camargo Siqueira<sup>1</sup>, Amanda Pires Barbosa<sup>3</sup>, Aparecida Perpétuo Silveira Carvalho<sup>1</sup>; Fábio Batista Frederico<sup>3</sup>; Luiz Carlos de Mattos<sup>1</sup>, Cinara de Cássia Brandão de Mattos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Imunogenética da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

<sup>2</sup>Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas e Fungos do Centro de Parasitologia e Micologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, São Paulo, Brasil.

<sup>3</sup>Ambulatório de Oftalmologia do Hospital de Base, Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto (FUNFARME)

### **Resumo**

**Introdução:** A toxoplasmose ocular (TO) é a manifestação clínica mais comumente encontrada nos indivíduos afetados. O diagnóstico clínico é difícil, sendo necessária a utilização de testes sorológicos e moleculares para auxiliar no diagnóstico da doença. **Objetivo:** Comparar os métodos sorológicos e moleculares na identificação da infecção por *T. gondii* nos grupos de pacientes atendidos em um ambulatório de



oftalmologia. **Material e métodos:** Foram compostos dois grupos. G1: Pacientes sem lesão sugestiva de toxoplasmose ocular (N = 185) e G2: Pacientes com lesão característica de uveíte toxoplásmica (N = 164) ambos os grupos foram atendidos no Ambulatório de Oftalmologia e Retinopatia da FUNFARME. Foram coletadas amostras de sangue para realização dos testes sorológico e moleculares. Os resultados foram comparados pelo índice Kappa e calculado os valores de sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP) e negativo (VPN). **Resultados:** Os testes sorológicos apresentaram: Kappa, G1: IgG = 0,97, IgM = 0,49; G2: IgG = 0,85, IgM = 0,74, ELISA e ELFA IgM S=6,1%, E=96,8%, VPP=62,5%, VPN=53,7% e S=3,7%, E=98,9%, VPP=75,0%, VPN=53,7% respectivamente, e para IgG S=96,3%, E=34,6%, VPP=56,6%, VPN=91,4% e S=95,1%, E=35,7%, VPP=56,7%, VPN=89,2% respectivamente. Para a análise molecular a pesquisa do *T. gondii* realizada pelo cnPCR (JW62/63), Nested, cnPCR (B22/23) e qPCR apresentaram S=1,8%, E=99,5%, VPP=75,0%, VPN=53,3%, S=2,4%, E=99,5%, VPP=80,0%, VPN=53,5%, S=6,1%, E=98,4%, VPP=76,7%, VPN=54,2% e S=8,5%, E=98,4%, VPP=82,3%, VPN=54,8% respectivamente. **Conclusão:** Os resultados sugerem concordância entre os métodos sorológicos para pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* da classe IgG, e discordância entre os métodos moleculares, sendo necessário mais estudos dessas técnicas.

**Palavras-chave:** *Toxoplasma gondii*; diagnóstico sorológico; Toxoplasmose ocular

## Introdução

A toxoplasmose é uma doença causada pelo parasito intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii*. Em indivíduos imunocompetentes a doença, em geral é

assintomática. Quando sintomática, a toxoplasmose ocular (TO) é a manifestação clínica mais comumente encontrada,<sup>(1)</sup> que pode ser em decorrência da infecção congênita ou adquirida.<sup>(2-4)</sup>

As manifestações clínicas são decorrentes da invasão de taquizoítos nas células do hospedeiro, provenientes de uma infecção aguda, e também na infecção crônica pela reativação de cistos contidos na retina com liberação de bradizoítos, o que leva a uma intensa resposta inflamatória e destruição tecidual.<sup>(2)</sup>

A soroprevalência da toxoplasmose ocular no Brasil é alta.<sup>(5-8)</sup> Estudos realizados na região noroeste do estado de São Paulo mostraram que a soroprevalência foi de 74,5%, destes, 27,3% apresentavam a doença ocular.<sup>(9)</sup>

Devido as dificuldades do diagnóstico clínico, o uso dos testes sorológicos e moleculares auxiliam no diagnóstico da doença, porém não há um consenso sobre qual o melhor método a ser utilizado. Assim a escolha de métodos com melhor sensibilidade e especificidade podem melhor auxiliar o correto diagnóstico da doença. O objetivo deste estudo foi avaliar os métodos sorológicos e moleculares para diagnóstico da toxoplasmose em pacientes com e sem lesões oculares sugestivas de toxoplasmose, atendidos no ambulatório de Oftalmologia do Hospital de Base de São José do Rio Preto, São Paulo.

## **Material e Métodos**

### **Casuística**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Rio Preto – FAMERP (CAAE 32259714.8.0000.5415).

É um estudo retrospectivo que analisou 349 amostras de sangue de pacientes de ambos os sexos atendidos e clinicamente avaliados no Ambulatório de Oftalmologia da Fundação Faculdade Regional de Medicina, Hospital de Base – FUNFARME, São José do Rio Preto, Brasil, no período de 2009 a 2014. Todos os pacientes foram convidados a participar do projeto, e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido após receber todas as informações sobre os objetivos e os procedimentos a serem realizados na pesquisa. Todos os pacientes selecionados eram imunocompetentes e foram divididos em dois grupos: Grupo 1 (G1): Pacientes sem lesões sugestivas de toxoplasmose ocular (N = 185), como glaucoma, retinopatia diabética tipo I, descolamento de retina, degeneração macular relacionada a idade, uveíte sem causa definida, transplante de córnea, catarata, alteração de mácula, lesão pós operatória, entre outras doenças oculares, e Grupo 2 (G2): Pacientes com lesões características de uveíte toxoplásmica (N = 164). O critério de inclusão neste grupo foi à presença de lesões na retina características de toxoplasmose, e retinocoroidite com lesão ativa (satélite). A avaliação clínica ocular de todos os pacientes foi realizada por meio de exames de fundo de olho (fundoscopia), além de fotodocumentação com uso de retinografia colorida, angiografia e OCT (*Optical Coherence Tomography*).

Foram coletadas amostras de sangue periférico em tubo seco para realização da análise sorológica e em tubo com EDTA para extração de DNA e realização dos testes moleculares. As análises sorológicas e moleculares foram realizadas no Laboratório de Imunogenética da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP.

### **Pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* por ELISA e ELFA**

A presença de anticorpos anti-*T. gondii* foi confirmada pelos métodos ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (Diasorin, Itália) utilizando os kits ETI-TOXOK-M reverse plus para pesquisa de IgM e ETI-TOXOK-G plus para pesquisa de IgG, e ELFA - *Enzyme Linked Fluorescent Assay* (Biomerieux, França) utilizando os kits Vidas<sup>®</sup>Toxo IgM (TXM) para pesquisa de IgM, Vidas<sup>®</sup>Toxo IgG II (TXG) para pesquisa de IgG, e Vidas<sup>®</sup>Toxo IgG Avidity (TXGA) para avidéz de IgG. A detecção de anticorpos da classe IgM foi realizada pelo método ELISA de captura. Todas as amostras que apresentaram anticorpos anti-*T. gondii* positivos para IgG e IgM por ELFA foram testadas para avidéz do IgG. A determinação da avidéz das IgG foi realizada pelo método ELFA. Baixos títulos de avidéz (<25%) são indicativos de infecção recente. O método ELFA foi realizado em equipamento automatizado (Mini Vidas, Biomerieux, França) e ambos os testes foram realizados conforme instruções do fabricante. Os valores de referência utilizados pelo método ELISA IgG foram: Reagentes, quando a concentração de IgG foi >15 UI/mL, e não reagentes, quando a concentração de IgG foi ≤ 15 UI/mL. Para o método ELISA IgM foram comparados os valores da absorbância das amostras com a média do controle do *cut-off*, sendo consideradas reagentes as amostras com valores de absorbância maior ou igual a do *cut-off* e, não reagentes as amostras com valores de absorbância menores que o valor do *cut-off*. Para o método ELFA IgG foram: Reagentes quando apresentou título ≥ 8 UI/mL; indeterminado quando apresentou ≥ 4 e ≤ 8 UI/mL, e não reagente quando <4 UI/mL. Para o método ELFA IgM foram: Reagentes quando apresentou índice ≥ 0,65 UI/mL, indeterminado quando ≥ 0,55 e < 0,65 UI/mL, e não reagente quando < 0,55 UI/mL.

Para a determinação da avidéz das IgG foram: IgG de fraca avidéz < 0,200; avidéz intermediária  $0,200 \leq e < 0,300$ ; IgG de forte avidéz  $\geq 0,300$ .

### **Extração do DNA genômico**

Foi extraído o DNA genômico a partir de 5 ml de sangue periférico colhido com EDTA, com uso de kit comercial (Qiamp DNA blood mini kit, Qiagen, Alemanha) de acordo com protocolo descrito por Mattos e colaboradores (2011).<sup>(10)</sup> O DNA extraído foi armazenado em freezer a -20°C até a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR).

### **Identificação do gene *B1* de *Toxoplasma gondii***

#### **Reação em Cadeia da Polimerase convencional (cnPCR)**

Foram realizadas duas reações de cnPCR para identificar o *T. gondii* em amostras de sangue. Uma delas utilizando os oligoiniciadores B22 (Sense: 5'-AACGGGCGAGTAGCACCTGAGGAGA-3') e B23 (Anti-sense: 5'-TGGGTCTACGTCGATGGCATGACAACT-3'), que amplificam um fragmento de 115 pares de base do gene *B1* do *T. gondii*. Para a preparação do mix foi utilizado 8,5 µL de H<sub>2</sub>O Nuclease Free (Promega, EUA); 12,5 µL de GoTaq Green Master Mix (Promega, EUA); 1,0 µL do *primers* B22 e 1,0 µL do B23 (IDT, EUA). O ciclo utilizado para esta PCR foi 95°C por cinco minutos, 95°C por 45 segundos (35X), 62°C por 45 segundos (35X), 72°C por 45 segundos (35X) e 5 minutos à 72°C em um termociclador (Verity, Applied Biosystems, EUA). Em seguida o amplificado foi submetido à corrida eletroforética em gel de agarose 1,5%.

A outra reação utilizou os oligoiniciadores JW62 (Anti-sense: 5'-TTCTCGCCTCATTTCTGGGTCTAC-3') e JW63 (Sense: 5'-GCACCTTTCGGACCTCAACAACCG-3') que amplificam um fragmento de 286 pares de base do gene *BI* do *T. gondii*. Para a preparação do mix foi utilizado 6,5 µL de H<sub>2</sub>O Nuclease Free (Promega, EUA); 12,5 µL de GoTaq Green Master Mix (Promega, EUA); 0,5 µL do *primers* JW62 e 0,5 µL do JW63 (IDT, EUA). O ciclo utilizado foi 95°C por cinco minutos, 95°C por 45 segundos (40X), 55°C por 45 segundos (40X), 72°C por 45 segundos (40X) e 5 minutos à 72°C em um termociclador (Verity, Applied Biosystems, EUA). Em seguida o amplificado foi submetido a corrida eletroforética em gel de agarose 1,5%.

### **Nested PCR**

O material genético amplificado com o marcador JW 62/63 foi submetido a uma segunda PCR (Nested PCR) utilizando os oligoiniciadores B22/23, conforme protocolo desenvolvido com modificações publicado por Okay e colaboradores (2009).<sup>(11)</sup> Para a preparação do mix da segunda reação (Nested PCR) foi utilizado 6,5 µL de H<sub>2</sub>O Nuclease Free (Promega, EUA); 12,5 µL de GoTaq Green Master Mix (Promega, EUA); 0,5 µL do *primers* B22 e 0,5 µL do B23 (IDT, EUA). O ciclo utilizado para a Nested PCR foi 95°C por cinco minutos, 95°C por 45 segundos (25X), 62°C por 45 segundos (25X), 72°C por 45 segundos (25X) e 5 minutos à 72°C em um termociclador (Verity, Applied Biosystems, EUA). Os amplicons foram analisados em gel de agarose a 1,5% utilizando o corante SYBR Safe (Invitrogen, EUA).

### **PCR em tempo real (qPCR)**

O DNA genômico foi submetido também ao método de PCR em tempo real (qPCR) para pesquisa do gene *BI*. O ciclo foi realizado no aparelho Step One Plus (Applied Biosystems, EUA) com volume final da reação de 20  $\mu$ L, utilizando os seguintes componentes: 4,5  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O RNase Free; 10,0  $\mu$ L de 2x QuantiTect Probe PCR Master Mix; 0,5  $\mu$ L de PrimeTime (Qiagen, Alemanha) com as seguintes temperaturas: uma vez de 50°C por 2 minutos, uma vez de 95°C por 15 minutos, 40 vezes 94°C por 15 segundos, 40 vezes de 60°C por 1 minuto e uma vez de 50°C por 30 segundos. Os *primers* e a sonda utilizados nesta análise foram publicados por Gunel e colaboradores (2012).<sup>(12)</sup>

Em todas as reações de PCR (cnPCR, Nested e qPCR) foi incluído um controle negativo (água ultrapura) e um controle positivo (DNA extraído de *T. gondii* da cepa RH). O *primer* HGH que amplifica um fragmento de 400 pares de base do gene hormônio de crescimento humano foi utilizado como controle de amplificação e detecção de inibidores da PCR.

### **Análise Estatística**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software IBM SPSS Statistics, IBM v.23 para a determinação do valor de Kappa, e o software GraPhPad InStat Software, Inc 3.06 para determinar os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e negativo (VPN) pelo Teste Exato de Fisher, com intervalo de confiança de 95%. Os valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

A análise de concordância Kappa foi realizada para descrever a intensidade de concordância entre os dois testes sorológicos. Os resultados foram interpretados conforme publicado por Landis e Koch (1977)<sup>(13)</sup> sendo considerados como concordância: Baixa: Kappa <0; Leve: Kappa 0 – 0,19; Razoável: Kappa 0,2 a 0,39; Moderada: Kappa 0,4 – 0,59; Grande: Kappa 0,6 – 0,79; Quase perfeita: Kappa 0,8 -1,0.

## **Resultados**

A média de idade do G1 foi igual a 51,6 anos (Mínima 17; Máxima 85; SD 19,3), sendo 185 pacientes, 97 (52,4%) masculinos e 88 (47,6%) femininos, e a média de idade do G2 foi igual a 45,7 anos (Mínima 10; Máxima 90; SD 19,6), sendo 164 pacientes, 95 (57,9%) masculinos e 69 (42,1%) femininos. A média de idade do G1 apresentou diferença estatisticamente significativa com relação à média de idade do G2 ( $p = 0,0054$ ; Teste t-student = 2,799; Grau de liberdade = 347; Intervalo de confiança de 95% = 1.734-9.936).

O valor de Kappa para detecção de anticorpos da classe IgG anti *T-gondii* para o G1 foi 0,97, o que demonstra uma concordância quase perfeita entre as duas técnicas utilizadas, e para IgM foi de 0,49 demonstrando moderada concordância entre as duas técnicas utilizadas.

Para o G2 o valor de Kappa para anticorpos da classe IgG anti *T-gondii* foi de 0,85 apresentando concordância quase perfeita entre os métodos, e para IgM foi 0,74 apresentando grande concordância entre os métodos utilizados.



Das 185 amostras do G1 analisadas, 119 (64,3%) foram positivas para a IgG por ELFA e 121 (65,4%) para IgG por ELISA. Duas (1,1%) amostras foram positivas para ELFA IgM, e 6 (3,2%) foram positivas para ELISA IgM.

Das 164 amostras do G2, 156 (95,1%) foram positivas para IgG por ELFA e 158 (96,3%) para IgG por ELISA. 6 (3,7%) foram positivas para IgM por ELFA e 10 (6,1%) por ELISA. Os resultados dos testes sorológicos do G1 e G2 encontram-se na tabela 1.

Das 2 (1,15) amostras do G1 que apresentaram sorologia positiva para IgG e IgM, 1 (50,0%) apresentou forte avidéz para IgG, e 1 (50,0%) avidéz intermediária. Das 6 (3,7%) amostras positivas para IgM e IgG do G2, 2 (33,3%) apresentaram avidéz intermediária e 4 (66,7%) forte avidéz.

Em relação ao resultado dos testes moleculares no G1, uma (0,5%) amostra foi positiva no cnPCR (JW62/63), uma (0,5%) amostra no Nested PCR, 3 (1,6%) amostras no cnPCR (B22/23) e 3 (1,6%) amostras no qPCR (valor de  $p = 0.567$ ; grau de liberdade = 3;  $\chi^2 = 2.022$ ). No G2, três (1,8%) amostras foram positivas no cnPCR (JW62/63), 4 (2,4%) amostras no Nested PCR, 10 (6,1%) amostras no cnPCR (B22/23) e 14 (8,5%) no qPCR (valor de  $p = 0.012$ ; grau de liberdade = 3;  $\chi^2 = 10.936$ ). Os resultados dos testes moleculares encontram-se na tabela 2.

A sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP) e negativo (VPN) foi calculada para cada teste sorológico e molecular separadamente. Quando comparados a pesquisa de anticorpos da classe IgM por ELISA e ELFA apresentaram  $S=6,1\%$ ,  $E=96,8\%$ ,  $VPP=62,5\%$ ,  $VPN=53,7\%$  e  $S=3,7\%$ ,  $E=98,9\%$ ,  $VPP=75,0\%$ ,  $VPN=53,7\%$  respectivamente. Quando comparados com IgG apresentaram  $S=96,3\%$ ,

E=34,6%, VPP=56,6%, VPN=91,4% e S=95,1%, E=35,7%, VPP=56,7%, VPN=89,2% respectivamente.

Para a análise molecular a pesquisa do *T. gondii* realizada pelos PCRs JW 62/63, Nested PCR, cnPCR B22/23 e qPCR apresentaram S=1,8%, E=99,5%, VPP=75,0%, VPN=53,3%, S=2,4%, E=99,5%, VPP=80,0%, VPN=53,5%, S=6,1%, E=98,4%, VPP=76,7%, VPN=54,2% e S=8,5%, E=98,4%, VPP=82,3%, VPN=54,8% respectivamente.

## **Discussão**

Esse trabalho buscou comparar os métodos sorológicos e moleculares utilizados para identificar a infecção por *T. gondii* em pacientes atendidos no ambulatório de oftalmologia no município de São José do Rio Preto. A taxa de infecção, detectada pelos métodos sorológicos, demonstrou ser elevada na população estudada, e a média de idade do grupo de pacientes com lesões oculares sugestivas de toxoplasmose foi menor do que o grupo de pacientes sem lesões sugestivas, o que está de acordo com outros trabalhos na literatura.<sup>(7,14-16)</sup>

Os métodos sorológicos ELISA e ELFA são amplamente utilizados para identificar a infecção por *T. gondii* no Brasil, apresentando alta sensibilidade e especificidade.<sup>(4,17-19)</sup> Os resultados apresentados nesse trabalho mostraram que a pesquisa de anticorpos da classe IgG pelos métodos sorológicos apresentaram grande concordância de acordo com o índice Kappa, porém foi verificado uma maior positividade de anticorpos da classe IgM por ELISA do que por ELFA.

Os métodos automatizados como o ELFA têm mostrado maior sensibilidade e especificidade quando comparados a outros métodos, apresentando vantagens de eliminar interferentes que possam ocorrer durante os testes manuais.<sup>(20,21)</sup> A avaliação dos anticorpos da classe IgM tem sido discutida por alguns autores pela possibilidade de permanência desse anticorpo nas infecções crônicas e o risco de resultados falso-positivos por reações cruzadas com autoanticorpos, fator reumatóide e outras doenças virais e bacterianas.<sup>(4,19,22,23)</sup> Em um estudo realizado por Dao e colaboradores (2003) comparando a reação de anticorpos da classe IgM por ELISA e ISAGA em pacientes sem suspeita clínica de infecção por *T. gondii*, foi observado positividade em 5 amostras por ELISA e nenhuma por ISAGA. Os autores concluíram que as diferentes composições do antígeno na fase sólida das reações podem ter levado aos resultados falso-positivos por ELISA.<sup>(24)</sup> A diferença na composição dos antígenos dos Kits ELFA e ELISA pode também ter colaborado para a diferença nos resultados encontrados neste trabalho, além disso não foi possível confirmar se os resultados apresentados pelo ELISA IgM foram falso-positivos, visto que para isso seria necessário confirmar o resultado com novas coletas de amostra e realizar outros métodos sorológicos mais precisos como o Dye test e, ou Western blot.

A baixa especificidade dos métodos para a pesquisa de IgG está relacionada principalmente a alta taxa de soroprevalência na região estudada, e a permanência desses anticorpos por toda a vida do hospedeiro, mesmo não apresentando a doença. Melamed (2009)<sup>(25)</sup> descreve a dificuldade do diagnóstico sorológico em pacientes com lesões oculares, visto que esses anticorpos estão presentes tanto em indivíduos doentes quanto em sadios, dificultando assim a correta identificação do agente etiológico.

Em relação aos resultados dos testes moleculares do G2, três (1,8%) amostras foram positivas para o cnPCR (JW62/63), e também para o Nested PCR. Quando submetidas a segunda reação por Nested PCR, 4 (2,4%) amostras foram positivas. Concordando com nossos resultados, o estudo conduzido por Okay e colaboradores (2009), utilizando amostras de líquido amniótico, também detectou 9 casos positivos a mais no Nested PCR, utilizando os *primers* B22/23 do que somente no cnPCR (JW 62/63). Essas amostras foram submetidas a outro cnPCR utilizando somente os pares de *primers* B22/23, sendo detectadas 10 (6,1%) amostras positivas, dessas, 1 foi positiva também no cnPCR (JW62/63) e 2 no Nested PCR utilizando os mesmos pares de *primers*. O melhor desempenho utilizando os pares de *primers* B22/B23 tem sido descrito por outros autores,<sup>(11,26,27)</sup> concordando com nossos resultados. Quando submetidas ao qPCR, 14 (8,5%) amostras foram positivas, dessas, 2 foram positivas também no cnPCR JW62/63, 3 no Nested PCR e 3 no cnPCR (B22/23). A maior positividade do qPCR pode ser justificada pelo fato do método identificar concentrações muito baixas de DNA, apresentando assim uma melhor sensibilidade em relação aos métodos convencionais e Nested PCR, e melhor especificidade, visto que a reação por qPCR reduz o risco de contaminação por *carry-over*.<sup>(28,29)</sup> Estas frequências ao serem comparadas apresentaram diferença estatisticamente significativa, o que pode estar associada a maior taxa de detecção do cnPCR (B22/23) e qPCR.

No G1 foi identificado 1 (0,5%) amostra positiva para cnPCR (JW62/63), a qual também foi positiva no Nested PCR. Três (1,6%) amostras foram positivas para o cnPCR (B22/23) e 3 (1,6%) para qPCR. Todas as amostras positivas em algum dos PCRs foram não reagentes para IgM. Das 6 amostras positivas no cnPCR (B22/23) e qPCR, 4 não apresentavam anticorpos da classe IgM e IgG para *T. gondii* (cnPCR=2;

qPCR=2), o que pode ser indicativo de uma infecção muito recente, onde ainda não é possível identificar anticorpos pela análise sorológica.

A detecção do DNA do *T. gondii* pelos métodos moleculares é bastante controversa, visto que há várias técnicas e marcadores para a identificação do parasito, e não há um consenso de qual o melhor protocolo a ser utilizado. Além do mais, vários fatores estão relacionados à discrepância dos resultados encontrados entre os tipos de PCR, como a escolha do gene e *primer*, parâmetros de amplificação e características genéticas do hospedeiro e do parasito.<sup>(11)</sup>

A baixa parasitemia encontrada nos pacientes com a doença ocular pelos métodos moleculares pode ser em decorrência da baixa quantidade de parasitos presentes na circulação sanguínea. Garweg e colaboradores (2011)<sup>(30)</sup> descrevem a dificuldade em identificar o parasito por PCR em amostras de humor aquoso de pacientes imunocompetentes, mesmo esse sendo um método muito sensível para confirmar a presença do toxoplasma. Portanto, a baixa parasitemia encontrada nesse trabalho é esperada, visto que os pacientes são imunocompetentes, e assim, a ação do sistema imune do hospedeiro pode reduzir a quantidade de parasito livre na circulação sanguínea.<sup>(22,31,32)</sup>

## **Conclusão**

A taxa de infecção é elevada nos grupos de pacientes analisados, e a infecção é freqüente nos indivíduos mais jovens. Os métodos sorológicos apresentaram concordância para pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* da classe IgG, e os métodos moleculares apresentaram-se discordantes. O método ELISA apresentou maior sensibilidade do que o ELFA na caracterização da infecção aguda e crônica em

pacientes com e sem lesões características de toxoplasmose, porém o ELFA apresentou maior especificidade do que o ELISA. Entre os métodos moleculares, o qPCR apresentou maior sensibilidade, no entanto apresentou menor especificidade quando comparado ao cnPCR (JW62/63) e Nested PCR.

### **Financiamentos**

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Processos: #2012/07716-9 LCM; #2013/15879-8 FHAM; #2014/09496-1 VLPC; #2013/10050-5 MP); e pela Fundação de Apoio à Pesquisa e Extensão de São José do Rio Preto - FAPERP (Processos: FAPERP FHAM #175/2015) e BAP FAMERP.

### **Referências**

- 1 Garweg JG, Peyron F. Clinical and laboratory diagnosis of ocular toxoplasmosis. *Expert Rev. Ophthalmol* 2008;3:333-346.
- 2 Maenz M, Schlüter D, Liesenfeld O, Schares G, Gross U, Pleyer U. Ocular toxoplasmosis past, present and new aspects of an old disease. *Prog Retin Eye Res* 2014;39:77-106.
- 3 Oréfice F, Filho RC, Barboza AL, Oréfice JL, Calucci D. Toxoplasmose ocular adquirida Toxoplasmose ocular pós-natal. *Rev Bras Oftalmol* 2010;69:184-207
- 4 Montoya JG. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. *J Infect Dis.* 2002;185:73-82.

- 5 Aleixo AL, Benchimol EI, Neves Ede S, Silva CS, Coura LC, Amendoeira MR. Frequency of lesions suggestive of ocular toxoplasmosis among a rural population in the State of Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009;42:165-9.
- 6 Furtado JM, Winthrop KL, Butler NJ, Smith JR. Ocular toxoplasmosis I: parasitology, epidemiology and public health. *Clin Experiment Ophthalmol* 2013;41:82-94.
- 7 Glasner PD, Silveira C, Kruszon-Moran D, Martins MC, Burnier Júnior M, Silveira S, et al. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. *Am J Ophthalmol* 1992;114:136-44.
- 8 Garcia JL, Navarro IT, Ogawa L, de Oliveira RC, Kobilka E. Seroprevalence, epidemiology and ocular evaluation of human toxoplasmosis in the rural zone Jauguapitã (Paraná) Brazil. *Rev Panam Salud Publica* 1999;6:157-63.
- 9 Ferreira AI, de Mattos CC, Frederico FB, Meira CS, Almeida GC Jr, Nakashima F, et al. Risk factors for ocular toxoplasmosis in Brazil. *Epidemiol Infect* 2014;142:142-8.
- 10 Mattos CC, Meira CS, Ferreira AI, Frederico FB, Hiramoto RM, Jr. GC, et al. Contribution of laboratory methods in diagnosing clinically suspected ocular toxoplasmosis in Brazilian patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;70:362-6.
- 11 Okay TS, Yamamoto L, Oliveira LC, Manuli ER, Andrade Junior HF, Del Negro GM. Significant performance variation among PCR systems in

- diagnosing congenital toxoplasmosis in São Paulo, Brazil: analysis of 467 amniotic fluid samples. *Clinics* 2009;64:171-6.
- 12 Gunel T, Kalelioglu I, Ermis H, Has R, Aydinli K. Large scale pre-diagnosis of *Toxoplasma gondii* DNA genotyping by real-time PCR on amniotic fluid. *Biotechnol Biotechnol Equip* 2012;26:2913–5.
  - 13 Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977;33:159-74.
  - 14 Holland GN. Ocular toxoplasmosis: the influence of patient age. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104:351-7.
  - 15 Bosch-Driessen LE, Berendschot TT, Ongkosuwito JV, Rothova A. Ocular toxoplasmosis: clinical features and prognosis of 154 patients. *Ophthalmology* 2002;109:869-78.
  - 16 Silveira C, Belfort R Jr, Burnier M Jr, Nussenblatt R. Acquired toxoplasmic infection as the cause of toxoplasmic retinochoroiditis in families. *Am J Ophthalmol* 1988;106:362-4.
  - 17 Avelino MM, Amaral WN, Rodrigues IM, Rassi AR, Gomes MB, Costa TL, et al. Congenital toxoplasmosis and prenatal care state programs. *BMC Infect Dis* 2014;14:33.
  - 18 Barreto JAA, Oliveira LAR, Oliveira MFB, Araújo RM, Santos RCS, Abud ACF, et al. Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em mulheres grávidas. *Rev. enferm. UERJ* 2009;17:107-0.



- 19 Bichara CN, Canto GA, Tostes Cde L, Freitas JJ, Carmo EL, Póvoa MM, Silveira Eda C. Incidence of congenital toxoplasmosis in the City of Belém, State of Pará, Northern Brazil, determined by a neonatal screening program: preliminary results. *Rev Soc Bras Med Trop* 2012;45:122-4.
- 20 Murat JB, Hidalgo HF, Brenier-Pinchart MP, Pelloux H. Human toxoplasmosis: which biological diagnostic tests are best suited to which clinical situations? *Expert Rev Anti Infect Ther* 2013;11:943-56.
- 21 Del Bono V, Canessa A, Bruzzi P, Fiorelli MA, Terragna A. Significance of specific immunoglobulin M in the chronological diagnosis of 38 cases of toxoplasmic lymphadenopathy. *J Clin Microbiol* 1989;27:2133-5.
- 22 Villard O, Cimon B, Franck J, Fricker-Hidalgo H, Godineau N, Houze S, et al. Network from the french national reference center for toxoplasmosis. Evaluation of the usefulness of six commercial agglutination assays for serologic diagnosis of toxoplasmosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012;73:231-5.
- 23 Naot Y, Barnett EV, Remington JS. Method for avoiding false-positive results occurring in immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays due to presence of both rheumatoid factor and antinuclear antibodies. *J Clin Microbiol* 1981;14:73-8.
- 24 Dao A, Azzouz N, Eloundou NGA C, Dubremetz JF, Schwarz RT, Fortier B. Unspecific reactivity of IgM directed against the low-molecular-weight antigen of *Toxoplasma gondii*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003;22:418-21.

- 25 Melamed, J. Contributions to the history of ocular toxoplasmosis in Southern Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009;104:358-63.
- 26 Teixeira LE, Kanunfre KA, Shimokawa PT, Targa LS, Rodrigues JC, Domingues W, et al. The performance of four molecular methods for the laboratory diagnosis of congenital toxoplasmosis in amniotic fluid samples. Rev Soc Bras Med Trop 2013;46:584-8.
- 27 Mesquita RT, Vidal JE, Pereira-Chioccola VL. Molecular diagnosis of cerebral toxoplasmosis: comparing markers that determine *Toxoplasma gondii* by PCR in peripheral blood from HIV-infected patients. Braz J Infect Dis 2010;14:346-50.
- 28 Barra GB, Caixeta MCSASB, de Sousa PGGCCF, Velasco LFR. Molecular diagnosis – past, present and future. RBAC 2011;43:254-60
- 29 Csako G. Present and future of rapid and/or high-throughput methods for nucleic acid testing. Clin Chim Acta 2006;363:6-31.
- 30 Garweg JG, de Groot-Mijnes JD, Montoya JG. Diagnostic approach to ocular toxoplasmosis. Ocul Immunol Inflamm 2011;19:255-61.
- 31 Robert-Gangneux F, Dardé ML. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. Clin Microbiol Rev 2012;25:264-96.
- 32 Denkers EY, Gazzinelli RT. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. Clin Microbiol Rev 1998;11:569-88.

**Tabela 1. Resultados dos testes sorológicos das classes IgG e IgM realizados em amostras dos pacientes do G1 e G2 por ELISA (Diasorin, Itália) e ELFA (Biomerieux, França)**

Grupo 1	Positivo		Negativo		Total	
	N	%	N	%	N	%
ELISA IgG	121	65,4	64	34,6	185	100
ELISA IgM	6	3,2	179	96,8	185	100
ELFA IgG	119	64,3	66	35,7	185	100
ELFA IgM	2	1,1	183	98,9	185	100

Grupo 2	Positivo		Negativo		Total	
	N	%	N	%	N	%
ELISA IgG	158	96,3	6	3,7	164	100
ELISA IgM	10	6,1	154	93,9	164	100
ELFA IgG	156	95,1	8	4,9	164	100
ELFA IgM	6	3,7	158	96,3	164	100

G1. ELISA *versus* ELFA IgG valor de  $p = 0,913$ ; Interv. Conf. 95% = 0,875-1,181 e ELISA *versus* ELFA IgM  $p = 0,283$ ; Interv. Conf. 95% = 0,613-14,677.

G2. ELISA *versus* ELFA IgG valor de  $p = 0,785$ ; Interv. Conf. 95% = 0,967-1,060 e ELISA *versus* ELFA IgM  $p = 0,443$ ; Interv. Conf. 95% = 0,619-4,481.

**Tabela 2. Resultados dos testes moleculares realizados em amostras de sangue periférico dos pacientes do G1 e G2 por cnPCR (JW62/63), Nested PCR, cnPCR (B22/23) e qPCR**

	Positivo		Negativo		Total	
	N	%	N	%	N	%
<b>Grupo 1*</b>						
<b>cnPCR (JW62/63)</b>	1	0,5	184	99,5	185	100
<b>Nested PCR</b>	1	0,5	184	99,5	185	100
<b>cnPCR (B22/23)</b>	3	1,6	182	98,4	185	100
<b>qPCR</b>	3	1,6	182	98,4	185	100
	Positivo		Negativo		Total	
	N	%	N	%	N	%
<b>Grupo 2**</b>						
<b>cnPCR (JW62/63)</b>	3	1,8	161	100,0	164	100
<b>Nested PCR</b>	4	2,4	160	94,3	164	100
<b>cnPCR (B22/23)</b>	10	6,1	154	92,5	164	100
<b>qPCR</b>	14	8,5	150	98,1	164	100

\*  $p = 0.567$ ; GL = 3;  $\chi^2 = 2.022$ .

\*\*  $p = 0.012$ ; GL = 3;  $\chi^2 = 10.936$ .

## **Manuscrito 3**

---

### 2.3 Manuscrito 3

**Avaliação sorológica e molecular para a identificação da infecção por *Toxoplasma gondii* em neonatos nascidos de mães com suspeita de toxoplasmose durante a gestação, atendidas em um hospital escola na cidade de São José do Rio Preto, São Paulo**

Fernando Henrique Antunes Murata<sup>1</sup>, Marina Neves Ferreira<sup>1</sup>, Vera Lucia Pereira-Chioccola<sup>2</sup>, Lígia Cosentino Junqueira Franco Spegiorin<sup>3</sup>, Marcia Wakai Catelan<sup>3</sup>, Aparecida Perpétuo Silveira Carvalho<sup>1</sup>, Luiz Carlos de Mattos<sup>1</sup>, Cinara de Cássia Brandão de Mattos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Imunogenética da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

<sup>2</sup>Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas e Fungos do Centro de Parasitologia e Micologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, São Paulo, Brasil.

<sup>3</sup>Hospital da Criança e Maternidade, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil

#### **Resumo**

Cinquenta amostras de neonatos nascidos de mães com suspeita de toxoplasmose durante a gestação foram analisadas por ELISA (IgA, IgM e IgG) e cnPCR. 45 (90,0%) amostras foram positivas para IgG, 1 (2,0%) para IgM, 3 (6,0%) para IgA e 13 (26,0%) no cnPCR. Nosso estudo mostrou que o cnPCR pode auxiliar no diagnóstico da toxoplasmose congênita

## Short Communication

### Introdução

A toxoplasmose é uma doença causada pelo parasito *Toxoplasma gondii*, e pode ser grave principalmente durante a gestação, onde o parasito pode atravessar a barreira placentária e atingir o feto.<sup>(1-3)</sup> A gravidade da doença está associada a diversos fatores como o tipo de cepa adquirida, estado imunológico da gestante e o período da gestação em que ocorreu a transmissão fetal.<sup>(3,4)</sup>

A soroprevalência da doença gestacional no Brasil é alta quando comparada a outros países.<sup>(5-7)</sup> Um estudo realizado com gestantes e seus neonatos atendidos no ambulatório de gestação de alto risco no município de São José do Rio Preto, São Paulo, mostrou que a soroprevalência nesses grupos foi de 64,4%, e a taxa de transmissão congênita de 2,3%.<sup>(2)</sup>

A doença congênita pode levar ao desenvolvimento de seqüelas graves na criança e no feto como lesões oculares e neurológicas,<sup>(5,8)</sup> e o diagnóstico clínico da toxoplasmose é difícil, pois as manifestações são muitas vezes inespecíficas. No entanto a utilização de testes sorológicos e moleculares podem auxiliar na detecção da doença precoce.<sup>(3,4)</sup>

### Materiais e métodos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Rio Preto – FAMERP (CAAE 32259714.8.0000.5415). Foram analisados 50 neonatos com até um mês de vida, de mães que apresentaram suspeita clínica de toxoplasmose durante a gestação, atendidas e tratadas no período de 2012 a 2015 no

Ambulatório de Gestação de Alto Risco e Medicina Fetal da Funda o Faculdade Regional de Medicina, Hospital de Base – FUNFARME, São José do Rio Preto.

Foram coletadas amostras de sangue periférico em tubo seco para a análise sorológica, e com EDTA para a análise molecular. Anticorpos das classes IgA, IgG e IgM anti-*T. gondii* foram analisados por ELISA (DiaSorin, Itália) utilizando os kits comerciais ETI – TOXOK-A (IgA), ETI – TOXOK-G (IgG) e ELISA ETI – TOXOK-M (IgM), sendo a pesquisa do IgA e IgM por ELISA de captura. Os valores de cut-off e as interpreta es dos resultados foram realizadas conforme instru es do fabricante. Para a análise molecular, o sangue coletado foi encaminhando para o laboratório de referência do Estado para realiza o da cnPCR. O cnPCR foi realizado conforme protocolo descrito por Mattos e colaboradores (2011).<sup>(9)</sup>

## **Resultados**

Das 50 amostras, 45 (90,0%) foram positivas para IgG, 1 (2,0%) para IgM, 3 (6,0%) para IgA e 13 (26,0%) positivas no cnPCR. (Tabela 1)

## **Discussão**

Este estudo buscou identificar a freq ncia de anticorpos utilizados para identifica o da toxoplasmose e a pesquisa do parasito por cnPCR em amostras de sangue de neonatos de mães que apresentaram suspeita clínica de infec o por *T. gondii* durante a gesta o.

A maior detec o de anticorpos nesse grupo foi a de IgG, 45 (90,0%) amostras, dessas, 1 (2,2%) foi positiva também para IgM, 3 (6,7%) para IgA e 11 (24,4%) na cnPCR. Com rela o   análise molecular, das 13 amostras positivas, 11 (84,6%) foram positivas para IgG e 1 (11,1%) para IgM.



A alta taxa de detecção de anticorpos da classe IgG em neonatos pode ser em decorrência da passagem desse anticorpo da mãe para o filho via transplacentária, os quais podem permanecer detectáveis nos testes sorológicos por alguns meses após o nascimento.<sup>(8)</sup> Em nosso estudo não foi possível confirmar se esses anticorpos são provenientes da mãe ou da própria criança, visto que seria necessário o acompanhamento clínico e sorológico dessas crianças para a confirmação, ou a realização de outros testes sorológicos que diferenciem os anticorpos maternos dos do bebê, tais como *Western blotting* (WB) e, ou *Enzyme-linked immunofiltration assay* (ELIFA), os quais permitem uma análise qualitativa de IgG e IgM por uma comparação dos padrões de bandas ou padrões de precipitação, respectivamente.<sup>(3)</sup> A baixa taxa de detecção dos anticorpos da classe IgM e IgA encontrada, pode estar relacionada ao período em que ocorreu a transmissão fetal, visto que infecções que ocorrem no começo da gestação podem levar a produção desses anticorpos no feto que, até o momento do parto não são mais detectáveis.<sup>(1)</sup> A melhor detecção de anticorpos da classe IgA em relação ao IgM pode estar relacionada pelo fato de que, o maior pico de IgA ocorre mais tardiamente do que o do IgM, o que facilitaria a detecção desse anticorpo no nascimento.<sup>(8)</sup>

A análise molecular por cnPCR apresentou uma melhor taxa de detecção da infecção do que os testes sorológicos. Em um estudo realizado por Sterkers e colaboradores (2011)<sup>(10)</sup> analisando amostras de sangue de neonatos por PCR, foi possível identificar a parasitemia na maioria das amostras analisadas, inclusive com sorologia não reagente.

O diagnóstico da doença congênita é muitas vezes difícil, pois em alguns casos o neonato não apresenta sintomas ao nascimento, o que dificulta o diagnóstico e atrasa o

tratamento.<sup>(3)</sup> Para a confirmação da infecção pelos métodos sorológicos, é muitas vezes necessário o acompanhamento clínico e sorológico do neonato, sendo necessário a realização de novas coletas de sangue a cada mês para detectar a presença de anticorpos da classe IgA e IgM, e monitorar a diminuição nos níveis de anticorpos maternos que possam ter sido transmitidos durante a gestação, os quais desaparecem dentro de 5 a 8 meses.<sup>(3)</sup> Desta forma, o diagnóstico molecular com o uso do cnPCR auxilia no diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita em neonatos.

### **Financiamentos**

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Processos: #2012/07716-9 LCM; #2013/15879-8 FHAM; #2014/09496-1 VLPC; #2014/01706-7 MNF); e pela Fundação de Apoio à Pesquisa e Extensão de São José do Rio Preto - FAPERP (Processos: FAPERP FHAM #175/2015; MNF #175/2015) e BAP FAMERP.

### **Referências**

- 1 Roc ML, Palacián MP, Lomba E, Monforte ML, Rebaje V, Revillo Pinilla MJ. Serologic diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010;28:517-9.
- 2 Mattos Cde C, Spegorin LC, Meira Cda S, et al. Anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in pregnant women and their newborn infants in the region of São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil. *Sao Paulo Med J* 2011;129:261-6.
- 3 Robert-Gangneux F, Dardé ML. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev* 2012 25:264-96.
- 4 Bichara CN, Canto GA, Tostes Cde L, et al. Incidence of congenital toxoplasmosis in the City of Belém, State of Pará, Northern Brazil, determined

- by a neonatal screening program: preliminary results. *Rev Soc Bras Med Trop* 2012;45:122-4.
- 5 Pappas G, Roussos N, Falagas ME. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *Int J Parasitol* 2009;39:1385-94.
  - 6 Dubey JP, Lago EG, Gennari SM, Su C, Jones JL. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology* 2012;139:1375-424.
  - 7 Robert-Gangneux F. It is not only the cat that did it: how to prevent and treat congenital toxoplasmosis. *J Infect* 2014;68:125-33.
  - 8 Villard O, Cimon B, L'Ollivier C, et al. Serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection: Recommendations from the French National Reference Center for Toxoplasmosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2016;84:2233.
  - 9 Mattos CC, Meira CS, Ferreira AI, Frederico FB, Hiramoto RM, Jr GC, Mattos LC, Pereira-Chioccola VL. Contribution of laboratory methods in diagnosing clinically suspected ocular toxoplasmosis in Brazilian patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;70:362-6.
  - 10 Sterkers Y, Ribot J, Albaba S, Issert E, Bastien P, Pratlong F. Diagnosis of congenital toxoplasmosis by polymerase chain reaction on neonatal peripheral blood. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;71:174-6.

**Tabela 1. Resultados dos testes sorológicos realizados no soro por ELISA (Diasorin, Itália) das classes IgG, IgM e IgA, e molecular realizado por cnPCR no sangue dos neonatos.**

Testes	Positivo		Negativo		Total	
	N	%	N	%	N	%
<b>ELISA IgG</b>	45	90,0	5	10,0	50	100,0
<b>ELISA IgM</b>	1	2,0	49	98,0	50	100,0
<b>ELISA IgA</b>	3	6,0	47	94,0	50	100,0
<b>cnPCR</b>	13	26,0	37	74,0	50	100,0

### **3. Considerações Finais**

---

Este estudo foi conduzido a fim de verificar a aplicabilidade de kits comerciais utilizados no diagnóstico sorológico e molecular da infecção por *T. gondii* nos pacientes com a doença ocular, a gestacional e a congênita.

Os aspectos que fundamentam a realização deste estudo incluem a variabilidade das cepas presentes na América do Sul, a diversidade de testes sorológicos e moleculares utilizados no diagnóstico da infecção por *T. gondii* e a falta de padronização desses testes.

Os resultados apresentados nos manuscritos que compõem esta dissertação mostram que a taxa de infecção por *T. gondii* é alta na região estudada e que os testes sorológicos e moleculares podem tornar-se ferramentas decisivas no diagnóstico clínico da doença. Desta forma, é importante a utilização de testes sensíveis e específicos para detectar a infecção por *T. gondii* nos diversos grupos de pacientes acometidos.

Diversos métodos sorológicos e moleculares foram desenvolvidos para diagnóstico da infecção por *T. gondii*, e, apesar de vários trabalhos realizarem a comparação destes métodos, ainda não foi possível definir qual o melhor método a ser utilizado. Esta dificuldade de padronização de um método ideal para o diagnóstico da doença tem sido discutida e diversos fatores podem estar relacionados às diferenças de sensibilidade e especificidade apresentada entre os métodos, como já discutida nos manuscritos que compõem este trabalho.

Os métodos sorológicos ELISA e ELFA utilizados neste estudo foram concordantes, o que mostra ser um fator importante já que esses métodos são utilizados amplamente no Brasil para a triagem e pesquisa de anticorpos das classes IgG e IgM anti-*T. gondii* em diversos grupos de pacientes como gestantes, recém nascidos e pacientes imunocomprometidos.

Além do mais, esses resultados mostram que os métodos manuais ou semi-automatizados, como o ELISA, utilizado neste trabalho continuam apresentando bons resultados na identificação de anticorpos anti-*T. gondii*, mesmo com a evolução desses métodos, como o desenvolvimento de métodos automatizados, que vem sendo considerados mais sensíveis e específicos.

Os métodos moleculares utilizados neste estudo mostraram-se discrepantes. Essas diferenças estão presentes também em outros trabalhos da literatura, o que mostra a real dificuldade em identificar a parasitemia por estes métodos. Essas dificuldades podem ser justificadas pelo fato de que os métodos moleculares foram desenvolvidos recentemente, e vários estudos vêm sendo conduzidos comparando os diferentes métodos e *primers* a fim de tentar definir qual o melhor método para identificação do parasito para cada região do mundo.

Apesar da frequente discussão em torno dos métodos sorológicos e moleculares para a pesquisa da infecção por *T. gondii*, estes continuam sendo métodos essenciais para auxiliar no correto diagnóstico clínico das diferentes formas da infecção por *T. gondii*.

## **4. Conclusões**

---



1. Os testes sorológicos comerciais utilizados na identificação de anticorpos anti-*T. gondii* das classes IgG e IgM por ELISA e ELFA apresentaram resultados concordantes.
2. Para a caracterização da infecção aguda e crônica em gestantes, o método ELFA apresentou maior sensibilidade do que o ELISA.
3. Para caracterização da infecção aguda e crônica em pacientes com e sem lesões oculares características de toxoplasmose, o método ELISA apresentou maior sensibilidade do que o ELFA, porém este apresentou maior especificidade do que o ELISA.
4. Os testes moleculares PCR convencional (cnPCR), PCR nested e PCR em tempo real (qPCR) apresentaram resultados discordantes.
5. Entre os testes moleculares realizados nos grupos de gestantes, o cnPCR utilizando os pares de *primers* B22/23 apresentou maior sensibilidade, no entanto, menor especificidade quando comparado aos demais métodos.
6. Entre os testes moleculares realizados nos grupos de pacientes com e sem lesões oculares, o qPCR apresentou maior sensibilidade, no entanto, menor especificidade quando comparado ao cnPCR (JW62/63) e Nested PCR.

## **5. Referências Bibliográficas**

---

- 1 Dubey JP, Lago EG, Gennari SM, Su C, Jones JL. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology* 2012;139:1375-424.
- 2 Nicolle C, Manceaux L. Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *Comptes Rendus des Séances de l'Academie des Sciences* 1908;147:763–766.
- 3 Splendore A. Un nuovo protozoo parassita de conigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'una malattia che ricorda in molti punti il Kalaazar dell' uomo. Nota preliminare. *Revista da Sociedade Scientífica de São Paulo* 1908;3:109–112
- 4 Nicolle C, Manceaux L. (1909). Sur un protozoaire nouveau du gondi. *Comptes Rendus des Séances de l'Academie des Sciences* 1909;148:369–372.
- 5 Robert-Gangneux F, Dardé ML. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev* 2012;25:264-96.
- 6 Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev* 1998;11:267-99.
- 7 de Souza W, Martins-Duarte ES, Lemgruber L, Attias M, Vommaro RC. Structural organization of the tachyzoite of *Toxoplasma gondii*. *Scientia Medica* 2010;20:131-143
- 8 Maenz M, Schlüter D, Liesenfeld O, Schares G, Gross U, Pleyer U. Ocular toxoplasmosis past, present and new aspects of an old disease. *Prog Retin Eye Res* 2014;39:77-106.
- 9 Dubey JP. The history of *Toxoplasma gondii*--the first 100 years. *J Eukaryot Microbiol* 2008;55:467-75.

- 10 Galisteo Jr AJ. *Toxoplasma gondii* vs radiação ionizante: Estudo da imunidade intestinal em camundongos C57Bl/6j experimentalmente vacinados com taquizoítos irradiados [dissertação]. São Paulo (SP): Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares; 2004.
- 11 Montoya JG, Rosso F. Diagnosis and management of toxoplasmosis. *Clin Perinatol* 2005;32:705-26.
- 12 Robert-Gangneux F. It is not only the cat that did it: how to prevent and treat congenital toxoplasmosis. *J Infect* 2014;68:125-33.
- 13 Dubey JP, Frenkel JK. Cyst-induced toxoplasmosis in cats *J Protozool* 1972;19:155-77.
- 14 Kaye A. Toxoplasmosis: diagnosis, treatment, and prevention in congenitally exposed infants. *J Pediatr Health Care* 2011;25:355-64.
- 15 Neves DP. *Parasitologia Humana*, 11 ed. Atheneu;2005.
- 16 Weiss LM, Dubey JP. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *Int J Parasitol* 2009;39:895-901.
- 17 Janků, J. Pathogenesa a pathologická anatomie tak nazvaného vrozeného kolombu žluté skvrny voku normálně velikem a microphthalmickém s nalezem parazitu v sítnici. *Časopis lékařů českých* [Pathogenesis and pathologic anatomy of the “congenital coloboma” of the macula lutea in an eye of normal size, with microscopic detection of parasites in the retina] 1923;62:1021–1143.
- 18 Torres CM. Morphologie d'un nouveau parasite de l'homme, Encephalitozoon chagasi, N. sp., observe dans un cas de meningo-encephalo-myelite congenital avec myosite et myocardite. *C R Soc Biol* 1927;97:1787–1790.

- 19 Wolf A, Cowen D, Paige B. Human toxoplasmosis: occurrence in infants as an encephalomyelitis verification by transmission to animals. *Science* 1939;89:226-7.
- 20 Mattos Cde C, Spegiorin LC, Meira Cda S, Silva Tda C, Ferreira AI, Nakashima F et al. Anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in pregnant women and their newborn infants in the region of São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil. *Sao Paulo Med J* 2011;129:261-6.
- 21 Oréfice F, Filho RC, Barboza AL, Oréfice JL, Calucci D. Toxoplasmose ocular adquirida Toxoplasmose ocular pós-natal. *Rev Bras Oftalmol* 2010;69:184-207.
- 22 Cordeiro CA, Moreira PR, Dutra WO, Young L, Campos WR, Oréfice F. et al. Immunology of the toxoplasmic retinochoroiditis. *Arq Bras Oftalmol* 2010;73:548-51.
- 23 Bichara CN, Canto GA, Tostes Cde L, Freitas JJ, Carmo EL, Póvoa MM, et al. Incidence of congenital toxoplasmosis in the City of Belém, State of Pará, Northern Brazil, determined by a neonatal screening program: preliminary results. *Rev Soc Bras Med Trop* 2012;45:122-4.
- 24 Sroka S, Bartelheimer N, Winter A, Heukelbach J, Ariza L, Ribeiro H, et al. Prevalence and Risk Factors of Toxoplasmosis among Pregnant Women in Fortaleza, Northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2010;83:528-33.
- 25 Bittencourt LH, Lopes-Mori FM, Mitsuka-Breganó R, Valentim-Zabott M, Freire RL, Pinto SB, et al. Seroepidemiology of toxoplasmosis in pregnant women since the implementation of the Surveillance Program of Toxoplasmosis Acquired in Pregnancy and Congenital in the western region of Paraná, Brazil. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2012;34:63-8.
- 26 Nogueira V, Liverani M. Toxoplasmose ocular. *Oftalmologia* 2014;38:225-232.

- 27 Vidal JE, Hernandez AV, de Oliveira AC, Dauar RF, Barbosa SP Jr, Focaccia R. Cerebral toxoplasmosis in HIV-positive patients in Brazil: clinical features and predictors of treatment response in the HAART era. *AIDS Patient Care STDS* 2005;19:626-34
- 28 Rodrigues JP, Frei F, Navarro IT, Silva LP, Marcelino MY, de Andrade-Junior HF et al. Seroepidemiological analysis of toxoplasmosis in college students. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 2015;21:1.
- 29 Liu Q, Wang ZD, Huang SY, Zhu XQ. Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. *Parasit Vectors* 2015;8:292.
- 30 Dhakal R, Gajurel K, Pomares C, Talucod J, Press CJ, Montoya JG. Significance of a Positive Toxoplasma Immunoglobulin M Test Result in the United States. *J Clin Microbiol* 2015;53:3601-5.
- 31 Reis MM, Tessaro MM, d'Azevedo PA. Perfil sorológico para toxoplasmose em gestantes de um hospital public de Porto Alegre. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2006;28:158-64
- 32 Tanyuksel M, Guney C, Araz E, Saracli MA, Doganci L. Performance of the immunoglobulin G avidity and enzyme immunoassay IgG/IgM screening tests for differentiation of the clinical spectrum of toxoplasmosis. *J Microbiol* 2004;42:211-5.
- 33 Gontijo da Silva M, Clare Vinaud M, de Castro AM. Prevalence of toxoplasmosis in pregnant women and vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in patients from basic units of health from Gurupi, Tocantins, Brazil, from 2012 to 2014. *PLoS One*. 2015;10:e0141700.

- 34 Petersen E, Liesenfeld O. Clinical disease and diagnosis. In: WEISS LM, KIM K, (eds). *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan: perspectives and methods. Elsevier/ Academic Press: Amsterdam 2007:81-100.
- 35 Jones JL, Bonetti V, Holland GN, Press C, Sanislo SR, Khurana RN, et al. Ocular toxoplasmosis in the United States: recent and remote infections. *Clin Infect Dis* 2015;60:271-3.
- 36 Murat JB, Hidalgo HF, Brenier-Pinchart MP, Pelloux H. Human toxoplasmosis: which biological diagnostic tests are best suited to which clinical situations? *Expert Rev Anti Infect Ther* 2013;11:943-56.
- 37 Roc ML, Palacián MP, Lomba E, Monforte ML, Rebaje V, Pinilla MJR. Diagnóstico serológico de los casos de toxoplasmosis congenital. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2010:517-519.
- 38 Bessières MH, Berrebi A, Rolland M, Bloom MC, Roques C, Cassaing S, et al. Neonatal screening for congenital toxoplasmosis in a cohort of 165 women infected during pregnancy and influence of in utero treatment on the results of neonatal tests. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2001:37-45.
- 39 Delhaes L, Year H, Ache S, Tsatsaris V, Houfflin-Debarge V. Contribution of molecular diagnosis to congenital toxoplasmosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013;76:244-7.
- 40 Teixeira LE, Kanunfre KA, Shimokawa PT, Targa LS, Rodrigues JC, Domingues W, et al. The performance of four molecular methods for the laboratory diagnosis of congenital toxoplasmosis in amniotic fluid samples. *Rev Soc Bras Med Trop* 2013;46:584-8.

- 41 Ivovic V, Vujanic M, Zivkovic T, Klun I, Djurkovic-Djakovic O. Molecular Detection and Genotyping of *Toxoplasma gondii* from Clinical Samples. Molecular Detection and Genotyping of *Toxoplasma gondii* from Clinical Samples, Toxoplasmosis - Recent Advances. 2012; <http://www.intechopen.com/books/toxoplasmosis-recent-advances/molecular-detection-and-genotyping-of-toxoplasma-gondii-from-clinical-samples>
- 42 Sterkers Y, Ribot J, Albaba S, ISSERT E, Bastien P, Pratlong F. Diagnosis of congenital toxoplasmosis by polymerase chain reaction on neonatal peripheral blood. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;71:174-6.
- 43 Okay TS, Yamamoto L, Oliveira LC, Manuli ER, Andrade Junior HF, Del Negro GM. Significant performance variation among PCR systems in diagnosing congenital toxoplasmosis in São Paulo, Brazil: analysis of 467 amniotic fluid samples. *Clinics* 2009;64:171-6.
- 44 Mesquita RT, Vidal JE, Pereira-Chioccola VL. Molecular diagnosis of cerebral toxoplasmosis: comparing markers that determine *Toxoplasma gondii* by PCR in peripheral blood from HIV-infected patients. *Braz J Infect Dis* 2010;14:346-50.
- 45 Pappas G, Roussos N, Falagas ME. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *Int J Parasitol* 2009;39:1385-94.
- 46 Câmara JT, Silva MG, Castro AM. Prevalence of toxoplasmosis in pregnant women in two reference centers in a city in Northeast Brazil. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2015;37:64-70.
- 47 Regina-Silva S, Fortes-Dias CL, Michalsky ÉM, França-Silva JC, Quaresma PF, da Rocha Lima AC, Teixeira-Neto RG, Dias ES. Evaluation of parasitological examination, kDNA polymerase chain reaction and rK39-based



- immunochromatography for the diagnosis of visceral leishmaniasis in seropositive dogs from the screening-culling program in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2014;47:462-8.
- 48 Ferreira AIC, Mattos CCB, Frederico FB, Meira CS, Almeida Jr.GC, Nakashima F, et al. Risk factors for ocular toxoplasmosis in Brazil. *Epidemiology and Infection*. 2014;18:1-7.
- 49 Moura FL, Amendoeira MR, Bastos OM, Mattos DP, Fonseca AB, Nicolau JL, et al. Prevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection among pregnant and postpartum women attended at public healthcare facilities in the City of Niterói, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013;46:200-7.
- 50 Gonçalves MA, Mattos CdeC, Spegiorin LC, Oliani DC, Oliani AH, Mattos LC. Seropositivity rates for toxoplasmosis, rubella, syphilis, cytomegalovirus, hepatitis and HIV among pregnant women receiving care at a public health service, São Paulo state, Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2010;14:601-5.
- 51 Aleixo AL, Benchimol EI, Neves EdeS, Silva CS, Coura LC, Amendoeira MR. Frequency of lesions suggestive of ocular toxoplasmosis among a rural population in the State of Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009;42:165-9.
- 52 Lopes FM, Mitsuka-Breganó R, Gonçalves DD, Freire RL, Karigyo CJ, Wedy GF, et al. Factors associated with seropositivity for anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in pregnant women of Londrina, Paraná, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104:378-82.

- 53 Bóia MN, Carvalho-Costa FA, Sodr  FC, Pinto GMT, Amendoeira MRR. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among indian people living in Iauaret , São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brazil. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo 2008;50:17-20.
- 54 Spalding SM, Amendoeira MR, Klein CH, ribeiro LC. Serological screening and toxoplasmosis exposure factors among pregnant women in South of Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 2005;38:173-7
- 55 Dard  ML. *Toxoplasma gondii*, “new” genotypes and virulence. Parasite 2008;15:366-71.
- 56 Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. J Infect Dis 1995;172:1561-6.
- 57 Walzer KA, Boyle JP. A single chromosome unexpectedly links highly divergent isolates of *Toxoplasma gondii*. MBio 2012;3:e00284-11.

## **6. Anexos**

---

## **6.1. Manuscrito 4**

---

**Frequency of the anti-*Toxoplasma gondii* antibodies class IgA, IgM and IgG in high risk pregnancy women, Brazil**

**Murata FMA** – IgA, IgM, IgG anti-*Toxoplasma gondii* antibodies, Brazil

**Fernando Henrique Antunes Murata<sup>[1],[4]</sup>, Marina Neves Ferreira<sup>[4],[5]</sup>, Natália Sahyoun Camargo<sup>[1]</sup>, Gabriela Soria Santos<sup>[1]</sup>, Lígia Cosentino Junqueira Franco Spegiorin<sup>[2],[3],[4]</sup>, Aparecida Perpétuo Silveira-Carvalho<sup>[1],[4]</sup>, Vera Lucia Pereira-Chioccola<sup>[6]</sup>, Luiz Carlos de Mattos<sup>[1],[4]</sup>, Cinara Cássia Brandão de Mattos<sup>[1],[4]</sup>**

*[1]. Immunogenetics Laboratory, Department of Molecular Biology, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil. [2] Hospital da Criança e Maternidade, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil. [3]. High Risk Antenatal Outpatient Clinic and Fetal Medicine Service, Fundação Faculdade Regional de Medicina – Hospital de Base – FUNFARME, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil. [4]. FAMERP Toxoplasma Research Group, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil. [5]. Instituto de Biociências Letras e Ciência Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil. [6]. Laboratory of Molecular Biology of Parasites and Fungi, Instituto Adolfo Lutz – IAL, São Paulo, São Paulo, Brazil. [7].*

**Corresponding author:** Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>a</sup> Cinara de Cássia Brandão de Mattos. FAMERP Toxoplasma Research Group – Dept<sup>o</sup> Biologia Molecular/Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, Vila São Pedro. 15090-000 - São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

**Phone:** 55 17 3201-5897

**E-mail:** [cinara.brandao@famerp.br](mailto:cinara.brandao@famerp.br); [cinara.brandao@live.com](mailto:cinara.brandao@live.com)

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We offer our deepest thanks to the Biotechnology Research Institute of Auckland University of Technology, New Zealand, particularly Professor Stephen Henry to provide library access.

## **FINANCIAL SUPPORT**

This study was supported by research grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP #2012/07716-9 LCM; #2013/15879-8 to FHAM; #2014/01706-7 to MNF; #2014/09496-1 to VLPC); by the Brazilian Ministry of Science, Technology and Innovation – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PIBIC-CNPq #135144/2014-0; #135229/2014-6), by Fundação de Apoio à Pesquisa e Extensão de São José do Rio Preto (FAPERP to FHAM #175/2015 and to MNF #129/2015) and by institutional research grant BAP-FAMERP. The opinions, assumptions, and conclusions or recommendations expressed in this material are responsibility of the authors and do not necessarily reflect the views of FAPESP.

## **AUTHOR'S CONTRIBUTIONS**

CCBM corresponding author, head of the FAMERP Toxoplasma Research Group, was responsible to concept and design of the study; LCJFS selected the patients and develop the clinical diagnosis; FHAM MNF NSC GSS APFS develop the laboratorial diagnosis; FHAM VLPC LCM and CCBM were responsible for the analysis and manuscript writing. The authors approved the final version of the manuscript.

**Abstract**

**Introduction:** Toxoplasmosis during pregnancy can be severe, thus serological diagnosis is essential in characterizing the disease.

**Methods:** IgA, IgM and IgG anti-*Toxoplasma gondii* antibodies were checked in 64 high risk pregnant women by ELISA (DiaSorin, Italy).

**Results:** 43 (69.4%) were positive for IgA, 31 (50.0%) for IgG and 57 (91.9%) for IgM; 4 (4.5%) were positive for IgA and negative for IgM; 10 (16.1%) were negative for IgA and IgM but IgG positive.

**Conclusion:** The investigation of these antibodies classes can support the diagnosis of infection in pregnant women contributing to the clinical management.

**Key-words:** *Toxoplasma gondii*; acute infection; high risk pregnancy.

Congenital toxoplasmosis is a serious disease that occurs when the *Toxoplasma gondii* parasite crosses the placenta barrier and reaches the fetus during pregnancy<sup>(1) (2) (3)</sup>. The severity of the disease may be associated with the type of acquired strain, with the immune status of the mother and with the gestational period in which maternal infection and fetal transmission occurred<sup>(1) (4)</sup>.

The presence of anti-*T. gondii* antibodies is an important factor in determining the period of infection. Antibodies of the IgA and IgM class are associated with recent infection (acute infection) while the IgG class is associated with late infection (chronic infection)<sup>(5) (6) (7) (8)</sup>. The individual analysis of these antibodies do not differentiate the infection time, since IgA and IgM antibodies may be positive for several months or undetectable in acute infections.

The seroprevalence in pregnant women have been reported worldwide<sup>(1) (3) (7)</sup>, and the classes IgG and IgM anti-*T. gondii* being the most used.

There are few reports of the IgA class of *T. gondii* antibodies in the literature of the presence of these antibodies for the diagnosis of disease. This paper describes the frequency of antibodies IgA, IgG and IgM anti-*Toxoplasma gondii* in high-risk pregnant women.

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Faculdade de Medicina de Rio Preto – FAMERP (CAAE 32259714.8.0000.5415). Were analyzed 62 serum samples from high-risk pregnant women with suspected toxoplasmosis and / or who had IgM antibodies at any time during pregnancy; the pregnant women were attended and clinically evaluated at High Risk Antenatal Care and Fethal Medicine Outpatients Clinics from the Fundação Faculdade Regional de Medicina, Hospital de Base – FUNFARME, São José do Rio Preto, São Paulo state, Brazil.



The peripheral blood samples were collected in dried tube to obtain serum and the sera were stored at -20°C until the time of its use to identify IgM, IgA and IgG antibodies against *T. gondii*. The reactions were performed by ELISA with commercial assay ETI – TOXOK-A (IgA), ETI – TOXOK-G (IgG) and ELISA ETI – TOXOK-M (IgM) (DiaSorin, Italy) according to the manufacture instructions.

The mean ages of the pregnant women were 24.9 ±6.9 (min 14; max 43). The table 1 shows the results for the anti-*T. gondii* antibodies analysis; the table 2 shows the serological profile for the *T. gondii* antibodies.

Considering the severity of the toxoplasmosis in the pregnancy period and the contribution of the serological diagnosis to identify the disease, this study investigated the frequency of the IgM, IgA and IgG anti-*T. gondii* antibodies to identify the infection in high risk pregnancy attended in a tertiary teaching hospital by Brazilian public health service.

The most of the studies reported the use of the IgA antibodies only to identify cases of the congenital infection. These antibodies have been shown as a really good marker to detect and identify the congenital form of the disease, once (in case of infection) the IgM antibodies class can be identified in the beginning of the gestation and be no detected in the baby at the birth <sup>(3) (9) (10)</sup>.

Besides, there are few reports describing the use of IgA supporting the diagnosis in pregnant women, especially in Brazil.

As shown in table 1, the detection of IgM antibodies was more frequent than IgA (91.9% and 69.4% respectively). However in 4 samples (6.5%) were detected the presence of the IgA with the absence of the IgM antibodies and this results are in agreement with the reported by Fricker-Hidalgo and cols (2013), which identified 5 positive samples for IgA and negatives for IgM <sup>(11)</sup>.

Were found 10 (16.1%) samples with positive IgA and negative IgM with positive IgG. This results are according with other study, demonstrating the importance in clinical diagnosis of toxoplasmosis at gestational period <sup>(12)</sup>.

The difficulties for the diagnosis of toxoplasmosis has been described because there is no specific policy in Brazil and no patterns in commercial assays to identify the infection supporting the physicians in the management of the different forms of the disease <sup>(10) (12)</sup>.

Villard and cols (2015) described a new proposition to screen the toxoplasmosis in France, highlighting the importance of the choice of serological method for identifying the infection and subsequent prevention of the disease, particularly in pregnant women. In this study they describe the importance of the interpretation of the results and the association of the presence of the IgA and IgM antibodies characterizing the maternal acute infection. In Brazil most of the public health service will not develop more than one serological assay during antenatal care; most of them will not offer the avidity assay to determine (estimate) the date of the maternal infection <sup>(10)</sup>.

Our study shows that the identification of the IgA anti-*T. gondii* antibodies as well the routinely assayed IgM and IgG antibodies supports the diagnosis of toxoplasmosis in pregnant contributing with the clinical.

**Competing interest:** The authors have declared that no competing interests exist.

Table 1: Serological analysis of the IgA, IgM and IgG antibodies anti-*T. gondii* by ELISA, in 62 high risk pregnant women, São José do Rio Preto, São Paulo state, Brazil.

Assay	POS		NEG	
	N	%	N	%
ELISA IgA	43	69.4	19	30.6
ELISA IgM	57	91.9	5	8.1
ELISA IgG	31	50.0	31	50.0

Table 2: Serological profile of the IgA, IgM and IgG anti-*T. gondii* antibodies by ELISA in 62 high risk pregnant women, São José do Rio Preto, São Paulo state, Brazil.

Serological profile	n	%
IgA+IgG+IgM+	27	43.5
IgA+IgM-IgG+	4	6.5
IgA-IgM+IgG+	16	25.8
IgA-IgM-IgG+	10	16.1

## References

1. Dubey JP, Lago EG, Gennari SM, Su C, Jones JL. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology* 2012;139:1375-424. doi: 10.1017/S0031182012000765.
2. Kaye A. Toxoplasmosis: diagnosis, treatment, and prevention in congenitally exposed infants. *J Pediatr Health Care* 2011;25:355-64. doi: 10.1016/j.pedhc.2010.04.008.
3. Roc ML, Palacián MP, Lomba E, Monforte ML, Rebaje V, Revillo Pinilla MJ. Serologic diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010;28:517-9. doi: 10.1016/j.eimc.2009.11.004.
4. Bichara CN, Canto GA, Tostes CL, Freitas JJ, Carmo EL, Póvoa MM et al. Incidence of congenital toxoplasmosis in the City of Belém, State of Pará, Northern Brazil, determined by a neonatal screening program: preliminary results. *Rev Soc Bras Med Trop* 2012;45:122-4. doi:10.1590/S0037-86822012000100024.
5. Dhakal R, Gajurel K, Pomares C, Talucod J, Press CJ, Montoya JG. Significance of a Positive Toxoplasma Immunoglobulin M Test Result in the United States. *J Clin Microbiol* 2015;53:3601-5. doi: 10.1128/JCM.01663-15.
6. Montoya JG, Rosso F. Diagnosis and management of toxoplasmosis. *Clin Perinatol* 2005;32:705-26. doi:10.1016/j.clp.2005.04.011.
7. Reis MM, Tessaro MM, D'Azevedo PA. Toxoplasma-IgM and IgG-avidity in single samples from areas with a high infection rate can determine the risk of mother-to-child transmission. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2006;48:93-8. doi:10.1590/S0036-46652006000200007
8. Tanyuksel M, Guney C, Araz E, Saracli MA, Doganci L. Performance of the immunoglobulin G avidity and enzyme immunoassay IgG/IgM screening tests for differentiation of the clinical spectrum of toxoplasmosis. *J Microbiol* 2004;42:211-5.

9. Bessières MH, Berrebi A, Rolland M, Bloom MC, Roques C, Cassaing S et al. Neonatal screening for congenital toxoplasmosis in a cohort of 165 women infected during pregnancy and influence of in utero treatment on the results of neonatal tests. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001;94:37-45. doi:10.1016/S0301-2115(00)00300-6.
10. Villard O, Cimon B, L'Ollivier C, Fricker-Hidalgo H, Godineau N, Houze S et al. Serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection: Recommendations from the French National Reference Center for Toxoplasmosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2016;84:2233. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2015.09.009.
11. Fricker-Hidalgo H, Cimon B, Chemla C, Darde ML, Delhaes L, L'ollivier C et al. *Toxoplasma* seroconversion with negative or transient immunoglobulin M in pregnant women: myth or reality? A French multicenter retrospective study. *J Clin Microbiol* 2013;51:2103-11. doi: 10.1128/JCM.00169-13.
12. Vasconcelos-Santos DV, Machado Azevedo DO, Campos WR, Oréfice F, Queiroz-Andrade GM, Carellos EV et al. Congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil: results of early ophthalmologic examination of a large cohort of neonates. *Ophthalmology* 2009;116:2199-205. doi: 10.1016/j.opthta.2009.04.042.