



Liliana Figueiredo Pinto

TOXOPLASMOSE CONGÉNITA: DESAFIOS NO DIAGNÓSTICO PRÉ-NATAL E PÓS-NATAL

Monografia desenvolvida sob a orientação científica da Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues de Sousa,
no âmbito do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

**Toxoplasmose Congénita:
Desafios no Diagnóstico Pré-natal e Pós-natal**

Monografia desenvolvida sob a orientação científica da Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues de Sousa, no âmbito do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Liliana Figueiredo Pinto

Setembro de 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Liliana Figueiredo Pinto, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2010145327, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 11 de Setembro de 2015

(Liliana Figueiredo Pinto)

A Tutora da Monografia

(Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues de Sousa)

A Aluna

(Liliana Figueiredo Pinto)

Agradecimentos

É com a maior alegria e satisfação que expresso os meus mais sinceros agradecimentos a todos aqueles que contribuíram, de uma forma ou de outra, para este marco da minha vida, prestando-lhes assim a minha homenagem.

À minha mãe e pai, pelo constante apoio, afeto e confiança, que me encoraja a ultrapassar qualquer adversidade, sem eles nada disto seria possível.

À minha orientadora Professora Doutora Maria do Céu Sousa, pela calma transmitida e pela disponibilidade, orientação e esclarecimentos prestados na elaboração desta monografia.

Às minhas irmãs, pela constante alegria, espontaneidade e cumplicidade reveladas ao longo de todos estes anos.

Ao Válter, pela sua presença, carinho, alegria, confiança e motivação persistentes, apoiando-me em todos os momentos.

A todos os professores da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, pela sua dedicação e esforço na transmissão de conhecimentos das mais diversas áreas.

Aos meus amigos, que me acompanharam ao longo desta jornada, pelo constante companheirismo e apoio demonstrado, contribuindo para o meu crescimento enquanto pessoa.

À grandiosa cidade do conhecimento, Coimbra. *“Uma vez Coimbra, para sempre saudade!”*

ÍNDICE

Abreviaturas.....	6
Resumo	7
Abstract.....	7
1. Introdução.....	8
2. <i>Toxoplasma gondii</i>	8
2.1 Ciclo de vida e infecção	8
2.2 Toxoplasmose.....	10
3. Diagnóstico da Toxoplasmose	11
3.1 Métodos Diretos.....	12
3.1.1 Exames Histológicos: Sangue, LCR, Biópsia de órgãos/tecido	12
3.1.2 Isolamento em cultura <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	12
3.1.3 Detecção de Ácidos Nucleicos - PCR	13
3.1.4 Detecção direta de antígenos	14
3.2 Métodos Indiretos.....	14
3.2.1 Cinética de anticorpos.....	14
3.2.2 Dye-Test (DT) – teste do corante ou reação de Sabin e Feldman	17
3.2.3 IFI – Imunofluorescência Indireta.....	17
3.2.4 Testes de Aglutinação.....	18
3.2.5 ISAGA – ImmunoSorbent Agglutination Assay	18
3.2.6 ELISA –Enzyme Linked Immuno Assay	19
3.2.7 Immunoblotting.....	20
3.3 Diagnóstico da Toxoplasmose na Grávida	21
3.4 Diagnóstico Pré-Natal.....	24
3.5 Diagnóstico Pós-Natal.....	25
4. Discussão/Conclusão	28
5. Expectações para o futuro / papel do farmacêutico	30
6. Bibliografia.....	31

ABREVIATURAS

2-ME – 2-Mercaptoetanol

DT – Dye-Test

IFI – ImunoFluorescência Indireta

IB – Immunoblot

Ig – Imunoglobulina

Igs – Imunoglobulinas

IgG-IB – Teste de Immunoblot para IgG

IgM-IB – Teste de Immunoblot para IgM

ELISA – Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

ISAGA – ImmunoSorbent Agglutination Assay

PCR – Polimerase Chain Reaction

EIA – Enzyme Immuno Assay

TC – Toxoplasmosse Congénita

qPCR – quantitative PCR, isto é, real time PCR

RESUMO

A infecção por *Toxoplasma gondii* possui uma distribuição global, e as políticas em relação às estratégias de diagnóstico diferem substancialmente entre os países. A toxoplasmose é geralmente assintomática e autolimitada, não havendo necessidade de tratamento. Contudo, quando se trata de mulheres grávidas ou indivíduos imunodeprimidos, a infecção pode causar complicações graves e até fatais. Um diagnóstico laboratorial é particularmente importante para as mulheres grávidas, pois permite a tomada de decisões terapêuticas atempadamente sem comprometer o feto. O diagnóstico da toxoplasmose congênita fundamenta-se na serologia materna e do recém-nascido, bem como na detecção direta do parasita no líquido amniótico e no sangue do recém-nascido. Os numerosos métodos serológicos são sensíveis e específicos, todavia a sua interpretação requer bastante experiência. Atualmente, a evidência direta do parasita é fornecida por métodos moleculares, nomeadamente a técnica de PCR.

ABSTRACT

Infection with *Toxoplasma gondii* has a worldwide distribution, and its policy in relation to diagnostic strategies vary among countries. Toxoplasmosis is usually asymptomatic and self-limited, with no need for treatment. However, when it comes to pregnant women and immunosuppressed patients, this infection can cause severe and even fatal complications. An accurate diagnosis is particularly important for pregnant women because it allows the therapeutic decision-making in a useful time without compromising the fetus. The diagnosis of congenital toxoplasmosis is based on the maternal and newborn serology, as well as the direct detection of the parasite in the amniotic fluid and in the newborn's blood. The multiple serological methods are sensitive and also specific, however their interpretation requires experience to avoid some pitfalls that comes with the results. Direct evidence of the parasite is currently provided by molecular methods, especially PCR.

I. INTRODUÇÃO

O parasitismo é definido como a associação entre seres vivos onde existe unilateralidade de benefícios. O hospedeiro passa a constituir o meio ecológico onde vive o parasita, observando-se uma dependência metabólica. O parasita *Toxoplasma gondii* é um protozoário, intracelular obrigatório, que infecta uma grande variedade de animais de sangue quente, incluindo o homem, sendo considerado um dos agentes infecciosos mais prevalentes a nível global e a sua taxa de seroprevalência varia de aproximadamente 10% a 90%, aumentando com a idade^[1, 2].

A infecção por *Toxoplasma gondii*, denominada toxoplasmose, é mais comum em climas quentes e em altitudes mais baixas do que em climas frios e regiões montanhosas. Esta distribuição está, provavelmente, relacionada com a existência de condições que favorecem a esporulação e a sobrevivência dos ooquistos^[3]. Também existem variações de prevalência em áreas geográficas semelhantes devido a diferenças de exposição. A elevada prevalência da infecção em França tem sido relacionada com a preferência por ingestão de carne crua ou mal cozida. No entanto, a elevada prevalência na América Central tem sido relacionada com a elevada existência de gatos de rua, num clima que favorece a sobrevivência de ooquistos (uma das formas contaminantes sobre a qual se pode apresentar o parasita)^[3].

2. TOXOPLASMA GONDII

2.1 CICLO DE VIDA E INFEÇÃO

Os membros da família Felidae, como os gatos domésticos, são o único hospedeiro definitivo do ciclo de vida deste parasita, isto é, apenas neles ocorre a fase de reprodução sexuada, e são, portanto, o maior reservatório de infecção^[3].

O ciclo de vida deste parasita (Figura 1) envolve 3 estádios infetantes:

- taquizoítos, forma invasiva que rapidamente prolifera e destrói as células infetadas aquando de uma infecção aguda;
- bradizoítos, que se multiplicam lentamente nos tecidos formando quistos;
- ooquistos, forma excretada nas fezes dos felinos que resulta da reprodução sexuada.

Os gatos domésticos, que estão confinados em casa e se alimentam somente de comida para gatos, desprovida de formas contaminantes de *T. gondii*, apresentam menos propensão de serem infetados^[3]. No homem, a ingestão de quistos ou de ooquistos maduros, resulta na sua rutura e consequente invasão das células do epitélio intestinal, onde sofrem um ciclo de divisão assexuada. *T. gondii* é notável na sua capacidade de invadir uma multiplicidade de

células hospedeiras e assim, dissemina-se facilmente por todo o corpo^[3].

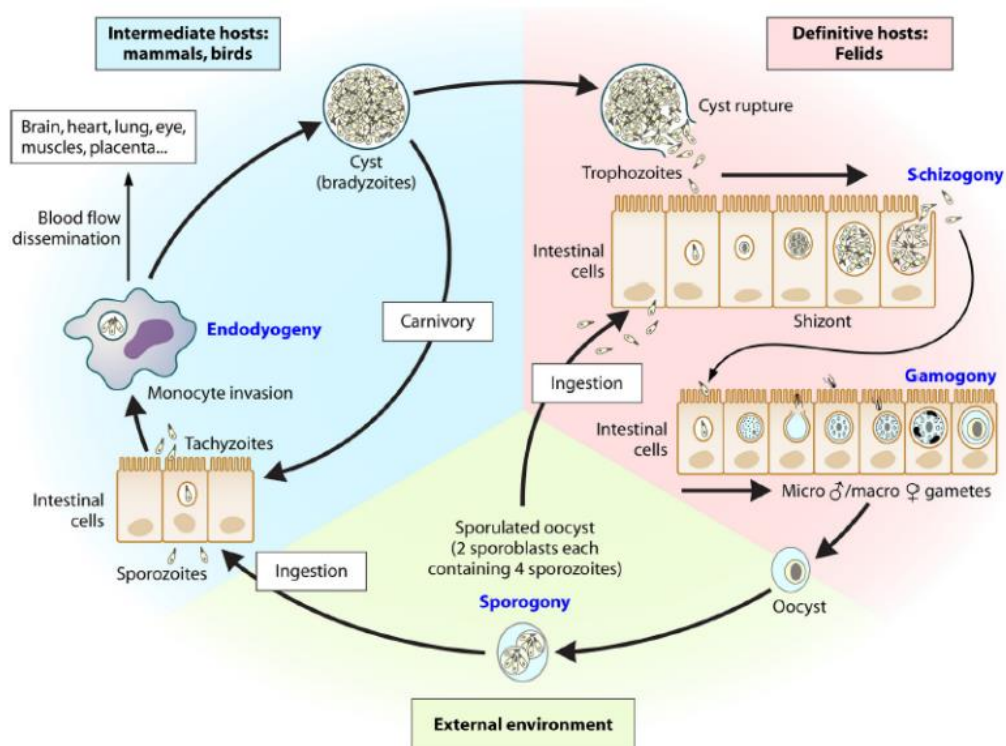


Figura I - Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*^[4]

A adesão à membrana da célula hospedeira é um pré-requisito para a infeção. A invasão celular depende de uma interação complexa entre a superfície da célula hospedeira e o parasita, um processo denominado “*gliding motility*”, promovido por interações actina-miosina e rearranjos dinâmicos do citoesqueleto do parasita^[4].

A entrada na célula é um processo rápido (15 a 30 seg). O parasita forma uma associação forte, intitulada junção móvel, entre a sua extremidade apical e a membrana celular da célula hospedeira. Esta junção movimenta-se desde a extremidade apical até à extremidade posterior do parasita, levando à internalização do parasita num vacúolo parasitóforo. De modo a impedir a fusão deste com lisossomas ou qualquer outra vesícula citoplasmática, o parasita modifica as características bioquímicas da membrana do vacúolo parasitóforo por remoção da maioria das proteínas transmembranares do hospedeiro. Além disso, desenvolve-se uma rede complexa de túbulos membranares que se estendem até ao lúmen vacuolar, a qual se presume favorecer as trocas de nutrientes entre o parasita e o citoplasma da célula hospedeira. A membrana do vacúolo parasitóforo está igualmente associada às mitocôndrias da célula hospedeira, contribuindo para o metabolismo do parasita^[4].

Dentro do vacúolo, o parasita divide-se por um processo de endodiogénia, um processo invulgar no qual são produzidas duas células-filha no interior da célula mãe, que é

posteriormente incorporada pelas descendentes. Após múltiplas divisões, o vacúolo aumenta de volume de tal forma que ocupa grande parte da célula hospedeira, tornando-a fisicamente incapaz de suportar mais desenvolvimento parasitário e dá-se a ruptura da membrana da célula com libertação de taquizoítos, que invadem as células adjacentes e continuam o processo de infecção^[4].

Os taquizoítos transformam-se em bradizoítos e formam-se os quistos teciduais, mais comumente no músculo esquelético, miocárdio e cérebro. Estes quistos, usualmente, permanecem durante toda a vida do hospedeiro e é a partir destes que a recrudescência da doença clínica pode ocorrer se o hospedeiro se tornar imunodeprimido^[3].

2.2 TOXOPLASMOSE

Nos países desenvolvidos, os estudos têm sugerido que a seroprevalência diminuiu nas últimas décadas. No entanto, em países sob rápida industrialização, como a China, a demanda por carne tem aumentado enormemente o que pode, com o tempo, aumentar o risco de exposição ao *T. gondii*^[1].

A toxoplasmose pode ser contraída de diversas formas. As duas maiores vias de transmissão no homem são: a via oral e a via vertical/congénita, em oposição às transfusões sanguíneas e transplantes de órgãos contendo quistos de bradizoítos^[3].

A infecção humana pode então resultar do manuseamento ou ingestão de carne crua ou mal passada que contenham quistos, ou, por outro lado, do contacto direto com gatos ou com água e comida contaminada com ooquistos por eles excretados. É importante realçar que são necessários cerca de cinco dias para que os ooquistos excretados pelos gatos se tornem esporulados e, conseqüentemente, infecciosos^[1, 3]. Como o contágio da infecção é de certo modo fácil e atendendo que na mulher grávida a infecção pode ser bastante perigosa para o feto, uma correta higiene alimentar é de extrema importância como medida preventiva da infecção (Figura 2).

A infecção congénita (TC) resulta de uma infecção primária durante a gravidez. Quando a grávida é infetada, os taquizoítos podem colonizar células da placenta e, assim, ter acesso ao compartimento fetal, sendo a infecção transmitida ao feto, o que pode acarretar problemas graves como a morte fetal, aborto espontâneo, coriorretinite ou a síndromes que incluem malformações e défices neurológicos e neurocognitivos^[1, 3, 4]. A incidência global estimada é de 190 100 casos anuais (95% IC: 179 300 – 206 300), apontando para uma incidência de 1,5 casos por 1000 nados vivos^[1].

A frequência da transmissão vertical aumenta com a idade gestacional de 20% para 70%^[5]

enquanto que, a gravidade das consequências clínicas diminui^[4]. Assim, grande parte das crianças infetadas ainda no útero são, geralmente, assintomáticas no parto, no entanto, pelo início da idade adulta, podem manifestar-se sintomas neurológicos ou retinocoroidite^[5].

A frequência e gravidade das sequelas varia ainda com o genótipo de *T. gondii*. Na Europa o genótipo predominante é o tipo II, podendo ser encontrado o genótipo III nas zonas mais a sul. Estes genótipos geralmente traduzem-se numa infeção assintomática^[1].^[1]

Estes efeitos podem ser minimizados ou evitados se a infeção por *T. gondii* for diagnosticada em tempo útil e a terapêutica for instituída^[1, 3]. A deteção precoce de uma infeção primária por *T. gondii* é, portanto, crítica para a mãe e para o feto^[2].

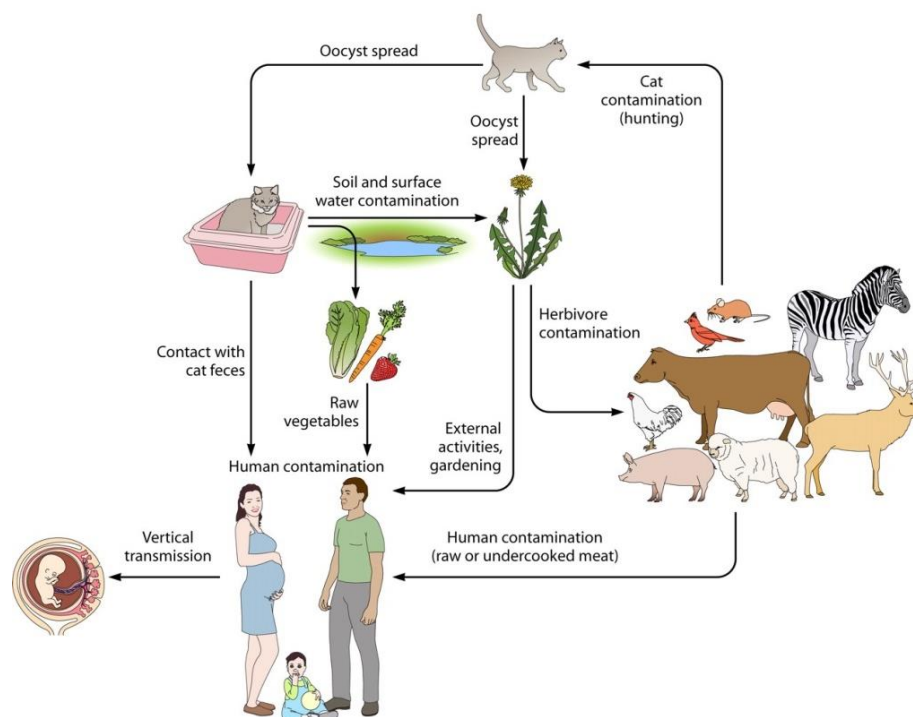


Figura 2 - Vias de transmissão de *Toxoplasma gondii*^[4]

3. DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE

O diagnóstico da toxoplasmose pode ser alcançado pela demonstração do parasita em amostras biológicas ou pela deteção de anticorpos específicos^[6].

Uma vez que o histórico clínico pode não ser informativo, todos os testes laboratoriais devem ser considerados como parte de um puzzle, onde cada peça tem um significado específico. Algumas peças podem, por vezes, parecer fora do sítio, o que demonstra que a interpretação final só pode ser entendida se considerarmos os testes como um todo^[6].

O diagnóstico da infeção materna por *T. gondii*, bem como da TC, requer, então, vários

testes serológicos, e muitas vezes também de PCR, e deve ser centralizada em laboratórios de referência e hospitais universitários^[5].

Os resultados podem ser afetados por dificuldades na interpretação, dependendo do indivíduo e do contexto clínico: mulheres grávidas ou recém-nascidos, tratados ou não tratados^[6]. No diagnóstico laboratorial da toxoplasmose, os métodos imunoenzimáticos são os mais amplamente utilizados e a precisão destes testes varia com o método utilizado^[7]. Contudo, a evidência direta do parasita é muito importante, em especial utilizando-se os métodos de diagnóstico molecular.

3.1 MÉTODOS DIRETOS

3.1.1 Exames Histológicos: Sangue, LCR, Biópsia de órgãos/tecido

A visualização direta de taquizoítos, com as técnicas de coloração de Giemsa ou Diff-Quick, confirma a presença do parasita e, portanto, evidencia a existência da infecção. No entanto, é uma técnica pouco utilizada e em sua substituição pode isolar-se o parasita por inoculação de culturas *in vitro* ou *in vivo*. Porém, a detecção direta do ADN do parasita é um método que apresenta maior sensibilidade^[7].

3.1.2 Isolamento em cultura *in vitro* e *in vivo*

O isolamento *in vitro* do parasita é realizado através da inoculação de culturas de células com as amostras biológicas suspeitas de estarem infetadas, como por exemplo líquido amniótico. As células geralmente utilizadas são células *MRC5* ou células *Vero* (encontrando-se já comercializadas culturas preparadas destas células para inoculação), sendo apenas necessário incubar a 37°C com a amostra. A identificação posterior do desenvolvimento do parasita pode ser realizada por microscopia invertida, por examinação com técnicas de coloração acima referidas ou por imunofluorescência indireta descrita mais à frente^[8]. Apesar de se obterem resultados de uma forma mais rápida do que com o isolamento *in vivo*, o processo *in vitro* está atualmente em desuso.

Por outro lado, o isolamento *in vivo* do parasita é realizado em ratos pela injeção intraperitoneal de tecidos, sangue ou outros fluídos recolhidos. As várias estirpes de *Toxoplasma* apresentam diferentes tipos de infecção, podendo os ratos manifestar uma infecção aguda com muitos parasitas ou uma infecção crónica com a formação de quistos no cérebro. Os animais são sacrificados ao fim de várias semanas, realizam-se testes serológicos para a pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma* e analisam-se fragmentos do cérebro a fim de detetar os quistos do parasita^[8]. Estas técnicas requerem equipamento especial, bem como

semanas de incubação, o que se traduz em baixo rendimento, todavia permitem o armazenamento e identificação das estirpes, sendo útil para estudos epidemiológicos^[7].

Apesar de confiáveis, ambas as técnicas apresentam algumas desvantagens como o facto de requererem laboratórios especializados e de falharem se os parasitas não estiverem viáveis^[9].

3.1.3 Detecção de Ácidos Nucleicos - PCR

A *Polymerase Chain Reaction* (PCR) consiste numa técnica de amplificação de sequências de ADN *in vitro*. Este é um método revolucionário desenvolvido por Kary Mullis na década de 1980^[10]. Baseia-se na capacidade da enzima ADN-polimerase de sintetizar uma nova cadeia de ADN complementar de uma cadeia molde. A enzima mais utilizada é a TAQ-polimerase (a partir de *Thermus aquaticus*) embora a PFU-polimerase (a partir de *Pyrococcus furiosus*) também seja amplamente utilizada devido à sua maior fidelidade durante a replicação.

A técnica de PCR foi inicialmente desenvolvida para o diagnóstico da TC no líquido amniótico, sendo a demonstração direta do parasita nos tecidos ou noutros fluidos através da PCR um avanço importante para o diagnóstico da toxoplasmose. A deteção precoce do ADN de *T. gondii* no sangue permitiu antecipar o diagnóstico quando em comparação com os resultados radiológicos e histológicos^[2]. Através desta metodologia, foi também possível reduzir drasticamente o tempo necessário para determinar a presença do parasita, relativamente ao tempo necessário para obter resultados no isolamento *in vitro* e *in vivo*^[6].

Ambos os ensaios de PCR, convencionais e quantitativos (qPCR), estão descritos, para vários alvos genéticos: BI^[6], rRNA 18S^[11] e uma sequência repetitiva de ADN de 529 pb^[12]. A amplificação por PCR do gene BI, repetido 35 vezes, tem sido utilizada com sucesso para diagnosticar uma infeção congénita e é, de momento, a sequência alvo mais utilizada^[6]. O teste, quando comparado com inoculação em murganhos, apresentou sensibilidade semelhante^[9].

Mais recentemente, a amplificação da sequência repetitiva de ADN de 529 pb tem sido utilizado como teste confirmatório da infeção por *Toxoplasma*. Esta sequência é mais repetida do que o gene BI, cerca de 200 a 300 vezes, e é altamente conservada. Esta região do genoma de *T. gondii* tem sido relatada como sendo um alvo muito específico e sensível para o diagnóstico^[2]. É recomendado por vários autores, apesar de terem sido levantadas dúvidas quanto à sua integridade em algumas estirpes^[12].

A técnica de PCR é também importante para avaliar a prevalência da reativação de *Toxoplasma*^[2].

O diagnóstico molecular apresenta um desempenho difícil de comparar devido à falta de

aplicação de normas internacionais uniformizadoras. Sem essa uniformização, muitas equipas têm desenvolvido seu próprio método, o que, utilizando três genes alvo, bem como diferentes tipos de deteção e inúmeras técnicas de extração de ADN, resulta numa multiplicidade de combinações possíveis^[7].

3.1.4 Deteção direta de antigénios

A deteção de antigénios circulantes não é utilizada, devido ao facto da deteção de ADN parasitário esclarecer as mesmas questões que a deteção direta de antigénios^[7]. No entanto, alguns autores consideraram que poderia ser de interesse e pondera-se a utilidade futura desta metodologia como *kit* rápido de diagnóstico^[7, 13].

3.2 MÉTODOS INDIRETOS

Os testes serológicos de determinação de anticorpos específicos anti-*Toxoplasma* continuam a ser, atualmente, a primeira linha de diagnóstico de infeção atual, recente ou passada^[6].

Os métodos serológicos são habitualmente desenvolvidos para a deteção de anticorpos IgG e IgM, que continuam a ser os isotipos mais utilizados no campo do diagnóstico da toxoplasmose^[7]. Testes para IgG e IgM específicas em várias amostras de soro colhidas com intervalos de 3 semanas são a abordagem inicial na triagem de infeção por *T. gondii*. Testes posteriores e um diagnóstico conclusivo irão depender destes resultados iniciais^[6].

Os testes serológicos são os métodos de diagnóstico mais utilizados e existe uma grande variedade de kits comercialmente disponíveis para a deteção de *Toxoplasma* com uma multiplicidade de taxas de sensibilidade e especificidade, criando uma vasta gama de opções para os analistas^[3].

3.2.1 Cinética de anticorpos

Existem 5 classes de imunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. A sua classificação prende-se com diferenças estruturais da cadeia pesada do anticorpo e com diferenças antigénicas^[3]. Estes anticorpos exibem diferente cinética quando há uma infeção por *T. gondii* (Figura 3).

IgM

Tipicamente, as IgM são consideradas como os primeiros anticorpos na infeção aguda, uma vez que são produzidos durante a primeira semana após a infeção. Normalmente tornam-se indetetáveis após alguns meses. Contudo, a maioria das técnicas recentes são sensíveis o suficiente para detetar IgM em quantidades residuais de longa duração, conduzindo a erros de interpretação dos resultados serológicos. Por este motivo, a presença de IgM não é

automaticamente interpretada como sinal de infecção aguda, mas despoleta a realização de testes complementares, como o título de IgG, a sua avidéz e a repetição dos testes após 1-3 semanas^[7].

A presença de IgM específicas do toxoplasma em mulheres grávidas é indicativa de infecção recente, porque as IgM têm um tempo de vida relativamente curto. Contudo, podem continuar detetáveis no sangue durante um longo período de tempo, mesmo após o fim da gravidez^[1].

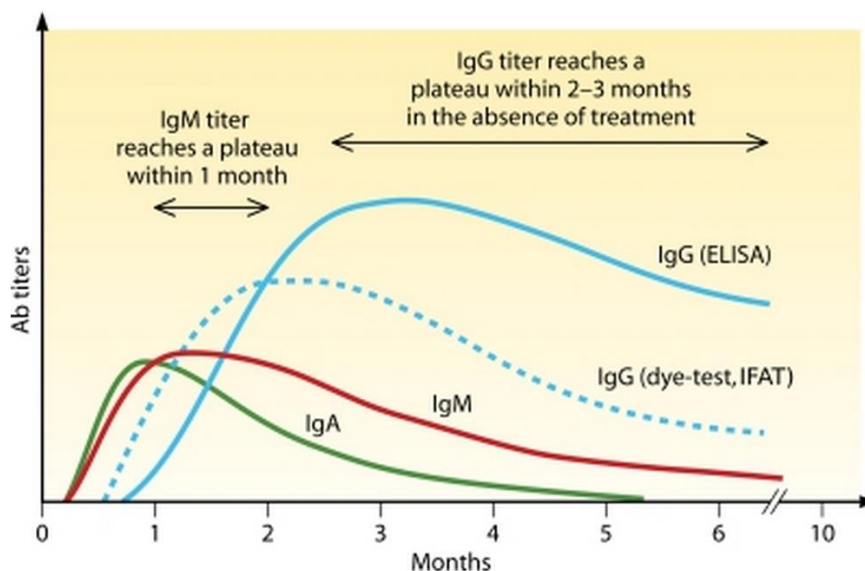


Figura 3 - Cinética de anticorpos numa infecção por *Toxoplasma gondii*^[4]

IgA

As IgA apresentam cinética semelhante às IgM, no entanto, são menos utilizadas em testes de rotina^[7]. Alguns autores consideram os testes de IgA benéficos, no sentido em que estes anticorpos representam o primeiro pico de anticorpos no decurso da infecção^[14]. Todavia, outras publicações não consideram que a análise do perfil de IgA seja uma mais-valia quer para o diagnóstico quer para a datação da infecção^[15]. Os testes de IgA parecem ter maior utilidade aquando do diagnóstico de infecção nos recém-nascidos, embora a sua precisão seja questionada^[16, 17].

IgG

Dependendo da técnica utilizada, as IgG podem se detetadas 2-3 semanas após as IgM. Primeiramente, há um aumento repentino destas Ig, seguido-se uma diminuição ligeira, até que, se estabilizam num valor que permite a sua deteção de modo persistente. Apesar das IgG serem os últimos anticorpos a serem produzidos, são de extrema importância, pois a sua produção permite estabelecer um diagnóstico seguro de infecção primária na grávida (IgM+/IgG+)^[4, 7].

Avidez de IgG

O que é a avidéz de um anticorpo? O termo avidéz (ou afinidade funcional) indica a força de ligação de uma população de anticorpos ao antígeno, e é preferível ao termo afinidade. O índice de avidéz corresponde à razão entre a constante de associação e a constante de dissociação da formação do complexo imunológico antígeno-anticorpo^[5].

Geralmente, a avidéz de IgG é inicialmente baixa após o desafio antigénico primário, mas vai aumentando ao longo das semanas e meses subsequentes. Tal facto, pode atribuir-se à seleção de células-B específicas do antígeno, que, com o tempo, vão aumentando a sua especificidade e, conseqüentemente, a sua força de ligação ao antígeno^[5, 6].

A datação da infeção na grávida é deduzida a partir da avidéz, porque, na fase inicial, os anticorpos tendem a ligar-se com menos força aos antígenos, contrariamente àquilo que acontece com os anticorpos de uma fase mais tardia da infeção^[7].

O índice de avidéz permite a classificação da amostra como baixa (índice de avidéz <0,4), borderline (índice de avidéz 0,4-0,6) ou alta (índice de avidéz >0,6). Um índice de avidéz baixo não exclui uma infeção aguda e um índice de avidéz elevado exclui infeção primária nas últimas 16 semanas^[2].

Após a sua introdução como método de diagnóstico, a medição da avidéz das IgG provou ser um processo extremamente útil para a datação da infeção, eliminando a necessidade de esperar por uma análise cinética. A sua combinação com os ensaios serológicos convencionais fornece informação prestável tanto como primeira linha de diagnóstico, como na confirmação dos resultados de outros testes, havendo já vários testes automatizados e comercializados^[5, 7].

Os testes de avidéz de IgG são altamente sensíveis e com estas técnicas foi possível demonstrar-se que grande parte das mulheres que apresentem IgM+ e IgG+ durante a gravidez, na realidade, não apresenta uma infeção recente^[5]. Contudo, a exclusão de infeção recente (nos últimos 4 meses, para a maioria), quando os resultados traduzem uma elevada avidéz de IgG, é a única utilização validada para estes testes. Pois, apesar de ter sido sugerido que um valor baixo de avidéz se traduzisse num diagnóstico de infeção recente, a cinética de maturação dos anticorpos quanto à sua avidéz pode ser lenta. Por conseguinte, uma baixa avidéz de IgG pode ser um resultado que persista por mais de um ano, inviabilizando assim o diagnóstico de infeção recente. A percentagem de infeções que estes testes são capazes de detetar revelou ser altamente variável, dependendo do tipo de estudo e das populações estudadas, de cerca de 20% até mais de 90%^[7, 18].

IgE

Quanto às IgE, hoje em dia são pouco utilizadas por serem consideradas menos sensíveis e, portanto, menos informativas que as restantes Ig para o diagnóstico neonatal. Porém, é específica de infecção aguda, podendo ser útil para datar a infecção^[7].

3.2.2 Dye-Test (DT) – teste do corante ou reação de Sabin e Feldman

O Dye-Test (DT), descrito em 1948 por Sabin e Feldman, foi o primeiro método serológico desenvolvido. Por vezes conhecido como o teste de detecção de IgG, na realidade deteta o total das Igs específicas, permitindo o diagnóstico tanto numa fase inicial como numa fase crónica^[19].

O seu princípio baseia-se na citólise do parasita *Toxoplasma*, mediada pelo complemento, na presença de anticorpos específicos. O azul de metileno é usualmente o revelador. Assim, o citoplasma do parasita apresentará coloração na ausência de anticorpos e se estiverem presentes anticorpos, haverá citólise do taquizoíto e, conseqüentemente, não se observa coloração^[20].

Atualmente, apenas pode ser implementado em alguns laboratórios de referência devido à sua complexidade técnica (inativação do soro analisado; adição do complemento a partir de soro fresco sem anticorpos específicos anti-*Toxoplasma*) e à necessidade de manter uma estirpe altamente virulenta em laboratório^[7]. Porém, continua a ser o método de referência para uma série de estudos de validação de novos métodos^[7, 19].

3.2.3 IFI – Imunofluorescência Indireta

Os ensaios de imunofluorescência indireta (IFAs ou IFIs) são considerados métodos clássicos de referência. Recorrem a taquizoítos inteiros fixos a lâminas de vidro que são incubadas com diluições em série das amostras de soro. Após lavagens sucessivas, e a fim de se revelar o ensaio, utilizam-se anticorpos IgG ou IgM anti-humano marcados com um fluoróforo. Estes ligam-se aos anticorpos humanos, presentes no soro, que ficaram ligados ao parasita^[7].

A titulação das IgG (UI/ml) é conseguida por comparação com a última diluição positiva de um controlo de referência em cada série. A titulação das IgM é fornecida pelo inverso da última diluição positiva^[7].

O método é relativamente barato e as lâminas podem ser congeladas e armazenadas durante longos períodos de tempo. No entanto, requer equipamento de fluorescência, capacidades técnicas (devido à variabilidade individual na leitura das lâminas) e tempo (porque o método não é automatizado)^[7].

3.2.4 Testes de Aglutinação

A aglutinação direta consiste na adição de diluições em serie de amostras de soro a uma suspensão de parasita em poços com fundo em forma de U. Uma reação positiva obtém-se quando os anticorpos do soro se ligam aos antígenos do parasita, formando complexos que aglutinam, enquanto numa reação negativa há a sedimentação dos parasitas livres. Este método apenas pode ser utilizado como método de rastreio, uma vez que deteta tanto IgG como IgM^[7]. Desmonts e Remington tornaram este ensaio mais sensível, usando tripsina, e mais específico, adicionando 2-mercaptoetanol (2-ME)^[21].

A aglutinação indireta utiliza partículas revestidas com antígenos de *T. gondii*. Na presença de soro contendo anticorpos específicos para *Toxoplasma*, as partículas aglutinam macroscopicamente. As partículas são feitas de plástico, geralmente látex ou poliestireno, podendo também ser utilizados eritrócitos de animais e, nesse caso, denomina-se hemaglutinação^[7].

Os métodos de aglutinação não necessitam qualquer microscópio ou aparelho especial, pois os resultados são visíveis macroscopicamente, apresentam curto tempo de execução e baixo custo^[7]. Contudo, a sensibilidade e a especificidade variam consideravelmente entre os vários kits comercializados. Uma avaliação recente revelou melhor desempenho, particularmente no que respeita às taxas de falsos positivos, para os testes baseados em aglutinação direta ou hemaglutinação indireta, do que, para os ensaios de aglutinação indireta que recorrem ao látex^[22]. Estes métodos são então mais apropriados para fins de rastreio ou como segunda linha de diagnóstico e não isoladamente.

3.2.5 ISAGA – ImmunoSorbent Agglutination Assay

O “immunosorbent agglutination assay” (ISAGA) é um derivado da aglutinação direta. Usa anticorpos recombinantes, direcionados para isotipos específicos de Ig humanas. Estes anticorpos são utilizados como revestimento em poços de análise, nos quais é adicionada a amostra de soro em triplicado, permitindo que todos os anticorpos adiram ao poço. De seguida, adicionam-se os parasitas inteiros e o resultado é lido como se de um ensaio clássico de aglutinação direta se tratasse, isto é, considera-se positivo quando os parasitas aderem ao poço e negativo quando estes sedimentam. A cada reação, incluindo sedimentações intermediárias, é atribuída uma pontuação de 0 a 12, sendo o 0 a sedimentação completa e o 12 a adesão completa do parasita^[23]. Uma pontuação de 3-9 indica IgM residual. A juntar à sua elevada sensibilidade, o ISAGA IgM positivo é um dos testes mais rápidos no caso de infeção aguda por *T. gondii*, comparável ao DT ou IFA usados como métodos confirmatórios de referência^[7]. Também foi descrita a utilização de ISAGA

para determinação de IgA e IgE, considerando-se este método como o mais sensível para detecção de IgA^[6, 7]. No entanto, considerou-se que o teste de ISAGA para IgA, apesar de sensível, não poderá substituir o de IgM devido às variações que apresenta, e sendo assim, é mais conveniente a utilização do teste de ISAGA para IgM^[24].

3.2.6 ELISA –Enzyme Linked Immuno Assay

Dos ensaios imunoenzimáticos, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) é o mais conhecido. O método de ELISA indireto é o mais utilizado. Usualmente recorre-se a placas de 96 poços de microtitulação de modo a facilitar a execução e leitura. Cada poço é revestido com o antígeno de interesse, sendo que nos kits comercializados este passo vem já concluído. Os poços são então preenchidos com diferentes diluições do soro do paciente e se estiverem presentes anticorpos específicos contra o antígeno, estes irão ligar-se, ficando também fixos. Apenas os anticorpos específicos se ligarão, realizando-se então, um processo de lavagem com o intuito de remover os restantes não ligados. De seguida, é adicionada uma solução contendo um anticorpo animal (anticorpo secundário), específico de anticorpos humanos, ligado covalentemente a uma enzima. Estes vão fixar-se aos anticorpos primários, realizando-se, novamente, um processo de lavagem para remover os anticorpos não ligados. Para finalizar, adiciona-se um substrato cromogénico. A reação enzimática, entre o substrato e a enzima ligada ao segundo anticorpo, gera um produto de cor visível que pode ser quantificada. A reação é menos intensa quanto maior for a diluição do soro e, consequentemente, menor a captura de anticorpos no poço. O título de anticorpo é a maior diluição que apresenta cor visível. O método “sandwich” funciona de maneira semelhante, no entanto os poços estão revestidos com um anticorpo específico e de seguida adiciona-se o antígeno. É, portanto, um método mais utilizado na pesquisa de antígenos e não de anticorpos. Existe ainda um kit “ready-to-use” de baixo custo, ideal para grandes rastreios a populações de poucos recursos^[7, 25].

Cada uma destas técnicas pode ser utilizada para fins qualitativos e quantitativos, no entanto, podem ocorrer falsos-positivos devido a ligações não específicas ou ao longo tempo de espera antes da leitura que conduz a alterações na intensidade da cor^[25].

As técnicas mais recentes automatizadas também utilizam métodos imunológicos semelhantes mas com sistemas de detecção alternativos como por exemplo a quimioluminescência ou eletroquimioluminescência^[7].

A automatização do serodiagnóstico da toxoplasmose, proporcionando boa reprodutibilidade e redução do tempo de teste, possibilitou a sua utilização de maneira sistemática em pacientes considerados de risco (ex. mulheres grávidas e

imunodeprimidos)^[7].

Muitos fabricantes já apresentam testes imunológicos tanto para a detecção como para a quantificação de IgG, IgM, IgA e IgE. Embora possam existir algumas diferenças ao nível da sensibilidade ou especificidade, estes *kits* foram avaliados e comparados com os pré-existentes de modo a garantir que se encontram dentro dos parâmetros de referência. Este é um mercado dinâmico, e como tal, as atualizações dos produtos são bastante frequentes, para que consigam acompanhar os progressos tecnológicos^[25].

Estudos demonstraram que o teste de avidéz de IgG por ELISA, quando usado como um teste confirmatório, juntamente com os testes de ELISA para IgG e IgM, é útil na distinção de uma infeção adquirida recentemente de uma infeção crónica, em mulheres grávidas^[2].

3.2.7 Immunoblotting

Com o objetivo de avaliar perfis imunológicos, foram desenvolvidas técnicas imunológicas qualitativas e semi-quantitativas de imunoblot (IB)^[7]. Este método combina eletroforese de antigénios do *T.gondii* em condições desnaturantes e um teste de anticorpos específicos^[6].

O mais amplamente utilizado é o Western Blot e é comercializado como tiras de nitrocelulose obtidas a partir de uma eletrotransferência a partir de um gel de eletroforese contendo antigénios de *T. gondii* já separados em bandas. A metodologia é análoga à da técnica de ELISA: as tiras são sequencialmente incubadas com a amostra de soro a analisar, um conjugado anticorpo anti-humano-enzima, podendo ser específico para um determinado isotipo de Ig, e finalmente um substrato que precipita formando uma banda corada^[7].

As diferenças antigénicas detetadas, específicas da estirpe, ajudam a explicar diferentes padrões eletroforéticos observados entre indivíduos diferentes^[6].

Esta técnica pode ser utilizada para comparar o perfil serológico da mãe e do recém-nascido ou o soro com outro fluido (ex. humor aquoso), bem como método confirmatório para detecção de IgG. Assim, possibilita detetar se há síntese de determinado anticorpo por parte do recém-nascido ou se foi transmitido pela mãe. Do mesmo modo, permite aferir se existe produção local do anticorpo (ex. intra-ocular). Esta interpretação é conseguida por análise comparativa das bandas formadas, tanto em número como em intensidade de cor^[7]. A TC é confirmada quando o perfil do recém-nascido apresenta bandas reativas que não estão presentes no perfil serológico da mãe^[6].

A associação de IgG-IB e IgM-IB com a análise serológica clássica demonstrou-se vantajosa no diagnóstico da TC^[26]. De modo a confirmar o diagnóstico, foi sugerida a colheita de amostra para análise aquando do nascimento e novamente após 4-6 semanas^[27]. O teste de IB, em recém-nascidos, foi considerado, inclusive, mais sensível do que o ELISA^[28]. Estudos

estimam que para o diagnóstico da TC, o IB atinge uma sensibilidade de 92,6% e uma especificidade de 89,1%^[29]. Outros apontam para uma especificidade de 97-100% e sensibilidade de 96-98% no teste de Western blot^[9].

O IB permite detetar valores baixos de IgG e portanto tem grande utilidade na confirmação precoce da infeção. Por outro lado, o teste de IgG-IB é cada vez mais utilizado com método de referência e tende, portanto, a substituir o DT, porque apresenta uma sensibilidade elevada e maior exequibilidade^[7].

Um outro método, ELIFA (enzyme-linked immunofiltration assay) é utilizado com as mesmas indicações, mas foi também substituído pelo IB nos laboratórios de diagnóstico mais especializados^[29].

3.3 DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE NA GRÁVIDA

Em virtude da diversidade ou da ausência de sintomas, o diagnóstico de infeção por *Toxoplasma* durante a gravidez é baseado na serologia materna.

Em mulheres grávidas, a interpretação dos resultados serológicos é basicamente efetuada da mesma forma que noutros pacientes imunocompetentes, mas a estratégia e as consequências são específicas^[7]. Os efeitos da infeção materna são determinados pela fase da gravidez: se a infeção primária ocorrer no início da gestação pode advir uma doença clínica grave no feto, por outro lado, se a infeção ocorrer no terceiro trimestre, geralmente, irá apresentar-se-á subclínica aquando do nascimento^[5].

A triagem serológica das mulheres grávidas depende da prevalência de *T. gondii* e das políticas de saúde no país. Por exemplo, na França as mulheres seronegativas são testadas mensalmente, enquanto na Áustria, Bélgica, Noruega e em algumas regiões da Itália, há um programa de reavaliação em intervalos de 3 meses. Por outro lado, na Polónia, Dinamarca, Suécia e os EUA não têm nenhum programa de triagem pré-natal^[4].

É recomendado um teste de IgG e um teste sensível de IgM, tendo a medição da avidéz de IgG um papel posterior de confirmação^[5].

No geral, o procedimento começa com o teste de IgM e IgG e só depois o teste de avidéz de IgG devido ao facto de o teste de avidéz ser dependente da presença de IgG específica. Os testes confirmatórios (DT ou IB para IgG e ISAGA para IgM) ou uma combinação de testes pode ser necessário para confirmar o estado imunológico ou seroconversão^[7].

IgG- e IgM-

Um indivíduo é considerado suscetível à infeção quando os anticorpos específicos não são

detectados em amostras de soro. Assim, as mulheres grávidas que estão em risco de contrair a infecção primária necessitam de vigilância serológica regular para detetar uma seroconversão. A frequência deste controlo é variável, dependendo dos programas de rastreio adotados em diferentes países. A monitorização materna cessa, geralmente, durante o terceiro trimestre ou mesmo, antes do parto. No entanto, a infecção pode ser adquirida no final da gravidez, permanecendo a grávida seronegativa no momento do parto^[6]. Um estudo relatou um caso de toxoplasmose neonatal grave, demonstrada por IgG, IgM e PCR do tecido placentário positivos, num recém-nascido cuja mãe permaneceu durante toda a gravidez com IgG e IgM negativas^[30]. A taxa de transmissão da mãe para o feto é superior a 70% durante o último trimestre de gravidez, e o recém-nascido poderá estar infetado sem quaisquer sintomas clínicos ao nascimento. Na ausência de terapêutica imediata e adequada, o recém-nascido pode desenvolver sequelas graves mais tarde^[6]. Atualmente, recomenda-se um maior controlo serológico após o parto para todas as mulheres grávidas seronegativas^[6].

IgG- e IgM+

A presença de IgM e ausência de IgG são geralmente indicativos de uma fase aguda da infecção, contudo devem ser realizados novos testes passadas 3 semanas. Por vezes, as mulheres grávidas são apenas seropositivas para IgM, permanecendo as IgG indetetáveis durante o acompanhamento serológico. Neste caso, presumivelmente tratam-se de anticorpos IgM naturais, que se acredita reagirem com os antígenos de *T. gondii*, mesmo na ausência de infecção. Os anticorpos naturais são predominantemente da classe IgM, e apenas ocasionalmente da classe IgG. São raramente encontradas em recém-nascidos e lactentes com idade <6 meses, no entanto, nas mulheres grávidas podem estar presentes em toda a gestação, ou durante apenas um período limitado de tempo. Em tais casos, devido ao lento aumento dos títulos de IgG observados por testes convencionais de ELISA, é aconselhável empregar testes adicionais com a utilização de todo o parasita como um antígeno, por exemplo, DT, IFI ou testes de aglutinação. A súbita seropositividade da IgM durante o curso da gravidez deve alertar o médico para começar um tratamento terapêutico antes da confirmação da infecção, numa tentativa de evitar a transmissão para o feto^[6]. Foi provado que o tratamento pré-natal dentro de 4 semanas após a seroconversão reduz o risco de lesões intracranianas quando comparado com a ausência de tratamento^[31]. No entanto, o tratamento terapêutico, em particular com pirimetamina e sulfadiazina, pode bloquear a produção de IgG. Nesses casos, o padrão serológico pode permanecer inalterado^[6].

Convém ressaltar que um pico da produção de anticorpos IgA ocorre após uma infecção

primária, logo após a detecção de IgM. Como as IgA não são consideradas de ocorrência natural, a presença simultânea de IgM e IgA indica uma infecção primária^[6].

IgG+ e IgM-

A detecção de IgG sem IgM define ao padrão serológico clássico de uma infecção passada. Uma mulher grávida imunocompetente com demonstração serológica de infecção crônica, não é considerada em risco de dar à luz um recém-nascido com infecção congênita^[6]. Portanto, a demonstração de IgG na ausência de IgM em mulheres antes da concepção ou no início da gravidez (primeiro trimestre) constitui uma garantia de proteção fetal contra o *T. gondii*^[7].

Contudo, um título negativo IgM na presença de IgG no terceiro trimestre, não exclui a hipótese de uma infecção aguda no início da gravidez. Isto pode ocorrer em alguns pacientes que apresentam um rápido declínio no título de IgM, o que demonstra a importância de um acompanhamento da evolução serológica da mãe ao longo de toda a gestação.

Por outro lado, foram descritos poucos casos de infecção em recém-nascidos de mães previamente imunes a *T.gondii*, sendo considerados como exceções. Curiosamente, nalguns casos, os anticorpos IgA também estavam presentes, tendo sido sugerido que, provavelmente, se trataram de reinfeções ligadas à ingestão acidental de oocistos de uma estirpe diferente, ou particularmente virulenta, de *Toxoplasma gondii*^[6].

Em contrapartida, os anticorpos IgG podem ocorrer naturalmente, embora seja raro, e podem aparecer durante qualquer trimestre da gravidez. Nestes casos, nas sucessivas amostras de soro, não são detetadas IgM nem IgA, e as IgG têm valores de avididade variáveis. No nascimento, os recém-nascidos apresentarão os mesmos níveis de IgG e o mesmo perfil serológico, por *western blot*, que as suas mães. Ao completar o primeiro ano de vida, as crianças apresentarão seronegatividade sem ter sido necessário qualquer tipo de tratamento^[6].

IgG+ e IgM+

Uma das situações mais difíceis ocorre quando IgG e IgM são positivos e o perfil serológico pré-gravidez é desconhecido. É recomendada a recolha de uma segunda amostra de sangue após 3 semanas, mas raramente se observam diferenças significativas nos títulos de IgG e IgM^[6].

As IgM podem ser detetadas por um longo período de tempo após uma infecção aguda, e, por conseguinte, um resultado positivo não pode discriminar entre infecção aguda, recente ou passada. Datar o início da infecção é crucial em mulheres grávidas, especialmente porque a aquisição pós-concepcional representa um grande risco para o feto.

Para esta finalidade, outros testes podem ser utilizados, tais como a detecção de IgA e determinação da avididade de IgG. O ensaio mais sensível para a detecção de IgA é o ISAGA. No entanto, em alguns indivíduos a IgA tem sido detectada durante mais de 1 ano e, numa pequena percentagem de infeções agudas, não é detectada. Portanto, um resultado positivo de IgA não indica necessariamente uma infeção aguda e um resultado negativo de IgA não exclui uma infeção aguda^[6].

Quando a serologia da mãe apresenta IgG específicas de alta avididade durante o primeiro trimestre, isto significa que já se encontra imunizada e que a infeção ocorreu há bastante tempo (há mais de 4 meses). Nestes casos, os fetos têm baixo risco de contrair TC e, portanto, não são necessárias intervenções^[5]. Por outro lado, um resultado de baixa avididade não é indicativo de uma infeção recente nem passada^[7], devido às diferenças que os indivíduos apresentam entre si, no que diz respeito ao tempo de maturação dos anticorpos^[6]. Além disso, foi sugerido que o tratamento poderia modificar a maturação dos anticorpos, embora resultados contraditórios tenham sido reportados^[32].

A detecção de anticorpos IgE tem sido também proposta como uma forma de definir o estágio da infeção, porque a IgE é encontrada somente em amostras de soro de pacientes com infeção aguda. Contudo, a duração da seropositividade da IgE é mais curta do que a da IgM e IgA. Estudos demonstraram que a IgE apresenta longa persistência com títulos bastante elevados em 100% dos seroconvertidos com manifestações da doença, e títulos baixos em 85,7% das infeções assintomáticas. Além disso, observaram um ressurgimento das IgE concomitantemente com o aumento de IgG durante a reativação^[6].

3.4 DIAGNÓSTICO PRÉ-NATAL

Quando se confirma a seroconversão de uma mulher grávida seronegativa, é recomendado fazer-se o diagnóstico pré-natal, isto é, pesquisar se existe TC, ou seja, se o feto foi infetado. Dependendo dos centros de diagnóstico, este procedimento pode não ser seguido quando o diagnóstico de infeção por *T. gondii* ocorreu no início da gravidez (<6 semanas) ou no final da gravidez (>36 semanas)^[7].

O diagnóstico pré-natal recorre a testes de imagiologia, nomeadamente ecografias, de modo a detetar anomalias fetais, como a dilatação dos ventrículos cerebrais. Contudo, os métodos mais confiáveis para o diagnóstico pré-natal são métodos diretos: PCR, inoculação de murganhos, culturas *in vitro* e, por vezes, pesquisa de antígenos, todos realizados no líquido amniótico ou no sangue fetal^[9]. A inoculação de murganhos é considerada teste padrão no diagnóstico fetal da toxoplasmose^[7]. A PCR (alvos BI, SAG-I, ADNr) realizada no líquido

amniótico após as 18 semanas de gestação é considerada mais sensível e mais rápida do que os procedimentos de diagnóstico convencionais^[9].

Se a transmissão fetal é confirmada, devem considerar-se mudanças na terapêutica. Pode mesmo ser discutida a interrupção da gravidez quando já são detetadas lesões clínicas no feto^[7]. O tratamento pré-natal pode ser controverso, em certa medida, mas uma análise retrospectiva recente apoia o papel de rastreio mensal pré-natal e subsequente tratamento de infecções primárias nas grávidas, o que foi associado a uma diminuição da taxa de transmissão e uma melhoria do resultado clínico infantil^[33].

3.5 DIAGNÓSTICO PÓS-NATAL

Aquando do nascimento, os recém-nascidos infetados podem apresentar sintomas leves ou moderados que, juntamente com os resultados analíticos, corroborem com um diagnóstico de TC. Todavia, nos recém-nascidos que não apresentam sintomatologia, não pode ser excluída a hipótese de infecção por *T. gondii*^[7]. Uma causa possível da falta de sintomas associados à doença é a transmissão congénita ter ocorrido numa fase tardia da gestação.

É necessário um acompanhamento clínico e biológico de longa duração para os recém-nascidos cuja mãe sofreu de toxoplasmose durante a gestação, pois estando infetados, mesmo que se apresentem assintomáticos, permanecem em risco de desenvolver lesões oculares durante a infância e adolescência, conduzindo a deficiência visual^[7].

O recém-nascido é sujeito a exames clínicos, parasitológicos e serológicos. Os exames clínicos baseiam-se na avaliação da sintomatologia apresentada, bem como de exames radiológicos como a TAC para pesquisa de quistos e lesões cerebrais.

Os exames parasitológicos baseiam-se na pesquisa direta de antígenos ou no isolamento do parasita, analisando-se a placenta ou amostras de sangue do recém-nascido através de PCR ou da inoculação de murganhos^[7]. O isolamento do organismo a partir do líquido amniótico, do sangue fetal ou da placenta é um teste específico, contudo pode ser pouco sensível e são necessárias 4 a 6 semanas para dar o resultado. A técnica de PCR apresenta-se promissora, porém, até agora, não ganhou um papel de destaque no diagnóstico pós-natal^[5].

Os testes serológicos iniciam-se no nascimento, quando são colhidas amostras de sangue materno, fetal e do cordão umbilical. Nelas são pesquisadas Igs específicas anti-*Toxoplasma*, nomeadamente IgM, IgG e IgA. Nos primeiros 3 a 10 dias de vida pesquisa-se a presença de anticorpos sintetizadas pelo recém-nascido^[7]. O diagnóstico serológico da infecção congénita é difícil, pois as IgG maternas são passivamente transferidas e nem todas as crianças, infetadas congenitamente, são capazes de produzir níveis detetáveis de IgA ou IgM

específicas. É portanto recomendado combinar a pesquisa das várias Ig e, mesmo assim, é necessário ter cuidado na interpretação dos resultados^[5, 9].

As IgA e IgM maternas não são transmissíveis através da placenta, porém podem contaminar o sangue do recém-nascido durante o parto e conduzir a falsos resultados^[17].

Observando-se a evolução de crianças infetadas congenitamente, todas apresentaram uma maturação significativa dos anticorpos IgG (avidez de IgG) no acompanhamento pós-natal. Contudo, comparando com o seu valor decisivo no diagnóstico da infecção aguda recentemente adquirida, o valor da determinação da avidez de IgG no diagnóstico pós-natal é menor. Durante os primeiros meses de vida, a quantidade de IgG materna diminui enquanto a quantidade de IgG endógena do recém-nascido infetado persiste ou aumenta. O resultado da avidez de IgG no recém-nascido representa, assim, uma mistura de IgG materna e IgG da própria criança e portanto, é influenciada por vários fatores, tais como: o tempo de amostragem e o título de avidez tanto da mãe como da criança^[5].

Para ultrapassar este obstáculo, desenvolveram-se novos métodos como ELIFA e IB, que podem distinguir os anticorpos maternos de anticorpos sintetizados pelo recém-nascido e podem ser aplicados a amostras colhidas no momento do nascimento ou durante os primeiros dias de vida^[17]. Por exemplo, a técnica de Western blot permite comparar o soro materno com o do recém-nascido, evidenciando as diferenças nas bandas formadas^[9]. Quando utilizado em conjunto com métodos convencionais para detecção de Igs específicas, estes novos métodos conseguem melhorar o diagnóstico da TC logo a partir do primeiro mês de vida^[17]. A combinação de Western blot (IgG e IgM) com ISAGA (IgM) obtém a máxima sensibilidade no diagnóstico de TC nos primeiros dias de vida^[28].

Os resultados podem apresentar-se de quatro formas:

IgG- e IgM-

Um padrão serológico negativo pode ser um fenómeno transitório na TC como consequência do tratamento materno e neonatal, particularmente quando a infecção materna ocorreu durante os dois primeiros trimestres da gravidez. Em tais casos, o diagnóstico inicial de TC não deve ser posto em causa, o acompanhamento e tratamento de rotina devem ser continuados. Frequentemente, o período transitório seronegativo é seguido por uma recidiva serológica, muitas vezes após a interrupção do tratamento. O consequente aumento dos títulos de anticorpos não foi associado com aumento do risco para a criança^[6].

Se os resultados forem negativos, mantém-se a vigilância serológica durante 8 a 12 meses, até as IgG específicas maternas se tornarem indetetáveis, de modo a garantir a anulação das contaminações. Os anticorpos maternos geralmente desaparecem em 5-8 meses^[4].

IgG- e IgM+

Como já discutido anteriormente, a detecção de IgM, mas não de IgG, pode ocorrer no nascimento, no caso de infecção materna muito tardia no que diz respeito ao curso da gravidez. Anticorpos IgA e IgG são geralmente detectados em amostras de soro subsequentes. No caso da detecção de IgM e/ou IgA no recém-nascido, o teste deve ser repetido dentro de 10 dias após o nascimento, a fim de excluir a contaminação por anticorpos maternos^[6].

IgG+ e IgM -

Ao nascimento, a detecção de IgG sem qualquer outro marcador serológico positivo é indicativo de: infecção congênita após infecção materna durante o primeiro ou segundo trimestre de gravidez; infecção de recém-nascidos cujas mães foram tratadas durante a gravidez; ou ainda ausência de infecção devido à presença de IgG não específicas^[6].

No caso da infecção materna ter sido numa fase precoce da gravidez, o recém-nascido poderia estar na fase sub-aguda da infecção, momento em que a produção de IgM e IgA já ocorreu. No caso de infecção materna durante o segundo trimestre, os anticorpos IgA podem ser detectados na ausência dos IgM, porque é maior o tempo de persistência das IgA em comparação com IgM no recém-nascido (contrariamente ao que é observado em adultos). Contudo, é aconselhável testar amostras de soro para IgA, dada a maior sensibilidade desta classe de Igs como um marcador da doença congênita. Se houver detecção de IgA no recém-nascido, o teste deve ser repetido dentro de 10 dias, a fim de excluir contaminações com anticorpos maternos^[6].

Em caso de suspeita de infecção materna e consequente tratamento terapêutico, a resposta imune do feto pode ser bloqueada ou retardada, com o consequente atraso na produção dos marcadores sorológicos preditivos.

Persistência ou aumento de IgG durante o primeiro ano de vida continua a ser a forma mais confiável de diagnosticar infecção congênita, no entanto, é um procedimento demorado. Se apenas os anticorpos IgG forem detectados, é fundamental distinguir se estes têm origem materna e foram transmitidos passivamente, ou se representam síntese recente por parte do feto infetado. Neste último caso, o tratamento terapêutico deve ser iniciado o mais rapidamente possível, depois do nascimento, de modo a evitar sequelas tardias^[6].

IgG+ e IgM +

A detecção de IgM em amostras de soro neonatal é indicativa de infecção congênita. No entanto, o teste deve ser repetido dez dias depois do nascimento para excluir anticorpos

maternos contaminantes. Para definir uma infecção congênita, o teste de ISAGA demonstrou ser mais sensível do que os testes imunoenzimáticos. Este padrão sorológico pressupõe que a infecção materna foi adquirida no terceiro trimestre da gravidez se as IgA também forem detetadas; ou, no último mês de gravidez se as IgA ainda não estão presentes^[6].

A IgE também foi encontrada em amostras de soro de recém-nascidos infetados congenitamente, mas a sua sensibilidade de detecção é menor do que a da IgM e IgA. O surgimento de IgE específica durante o tratamento pós-natal é considerado um sinal de má adesão ou dosagem inadequada. Contudo, a determinação simultânea dos valores de IgM, IgA e IgE melhora o rendimento do diagnóstico. Tal como para IgM e IgA, também o teste para IgE deve ser repetido 10 dias após o nascimento, para excluir a contaminação materna^[6].

No que diz respeito à avididade de IgG, geralmente não é avaliada no recém-nascido, porque é semelhante à da mãe. No entanto, tem-se observado que, na ausência de transmissão materno-fetal, o índice de avididade permanece estável até ao desaparecimento dos anticorpos maternos transmitidos passivamente. Em contrapartida, o índice de avididade de IgG mostra um aumento significativo nas crianças infetadas congenitamente^[6].

A TC é caracterizada pela persistência de IgG específica após o primeiro ano de vida. Atualmente, todas as crianças com TC identificadas pela triagem pré-natal ou neonatal são acompanhadas clinicamente durante toda a infância^[7].

4. DISCUSSÃO/CONCLUSÃO

A infecção primária durante a gravidez, bem como a infecção congênita, constituem grandes desafios ao nível do diagnóstico.

Avanços importantes foram feitos na aquisição de conhecimento sobre a estrutura antigénica e genómica de *T. gondii*, originando uma grande variedade de testes, agora disponíveis, o que permitirá uma melhor definição da fase de infecção^[6].

Estes testes têm o potencial de diminuir a necessidade de acompanhamento serológico e de intervenções terapêuticas desnecessárias em mulheres grávidas, resultado de uma preocupação desencadeada por um diagnóstico erróneo, particularmente no início da gravidez. Por outro lado, em pacientes com suspeita de infecção ativa, um resultado falso-negativo pode conduzir a um atraso fatal no tratamento.

Como o parasita é intracelular, em detrimento de pesquisar o parasita de forma direta, usualmente pesquisa-se a reação do hospedeiro a *T. gondii* através de técnicas de imunodiagnóstico. Estudos mostram que definir a infecção é muito fácil aquando da presença

de seroconversão ou serologia negativa persistente. O desafio é interpretar a detecção de IgM específica em mulheres grávidas^[34]. A demonstração de um aumento significativo nos títulos de anticorpos em amostras de soro em série é demorado e esse tempo é precioso no início do tratamento terapêutico para prevenir a transmissão e/ou para limitar os danos para o feto. Neste momento, os resultados de novos testes serológicos devem ser adicionados ao “quebra-cabeça” e encaminhados para um laboratório de referência. Os benefícios derivados desta estratégia foram demonstrados noutro estudo, o qual relata a diminuição, em 50%, do número de abortos desnecessários nas mulheres com IgM positiva em testes realizados em laboratórios periféricos, após a realização de testes confirmatórios em laboratório de referência e a sua correta interpretação^[35].

É de ressaltar, também, o papel importante que a determinação da avidéz de IgG possui na datação da infecção, auxiliando na distinção entre infecções recentes ou antigas. De acordo com os resultados de um teste confirmatório por PCR, a sensibilidade do teste ELISA para IgM foi 100,0% e a sua especificidade foi de 77,8%, enquanto o teste da avidéz de IgG apresentou sensibilidade de 93,8% e especificidade de 100,0%.^[2]

Conclui-se que nenhum teste laboratorial realizado isoladamente é autossustentado e, portanto, deve-se sempre combinar pelo menos dois testes diferentes ou definir uma estratégia sequencial, por exemplo, um método com uma elevada sensibilidade como teste de triagem, e em seguida, um teste altamente específico para confirmação, sempre adaptados a cada situação clínica.

Um outro problema que advém destes testes é a falta de padronização entre eles. Apesar das normas internacionais, que são utilizadas para calibrar os *kits* serológicos, os títulos de anticorpos são variáveis entre os diferentes métodos no que diz respeito a uma mesma amostra, possivelmente devido a diferenças de epítomos e às características dos anticorpos utilizados por estes métodos. Mesmo admitindo que os resultados dos testes obtidos são válidos, a interpretação correta dos resultados requer experiência, além disso, a comparação de títulos de dois soros apenas deve ser possível quando o mesmo método foi utilizado^[7, 36].

No que diz respeito às técnicas de diagnóstico direto da infecção, os exames histológicos de amostras biológicas bem como as culturas *in vivo* e *in vitro* foram ultrapassados pelas técnicas de diagnóstico molecular, nomeadamente PCR, sendo que, atualmente, só detêm aplicabilidade em contexto de investigação. No diagnóstico da TC no feto, a pesquisa de ADN parasitário no líquido amniótico por PCR é uma das técnicas mais indicadas.

Não se pode menosprezar a importância de avaliar conjuntamente o estado imunológico da mãe e do feto de modo a confirmar se realmente houve transmissão vertical.

5. EXPECTAÇÕES PARA O FUTURO / PAPEL DO FARMACÊUTICO

Tendo em conta os sólidos conhecimentos no âmbito da parasitologia e da instrumentação analítica que o farmacêutico possui, considero que é o profissional de saúde que mais abrangência tem em todo o processo do diagnóstico. O farmacêutico está apto para intervir desde o planeamento e desenvolvimento da técnica de diagnóstico, passando pela sua introdução no mercado ou execução em laboratórios de referência, até à avaliação crítica e comparativa dos resultados obtidos. De um outro ponto de vista, é o profissional de saúde ao qual a população se dirige primeiramente para aconselhamento, desempenhando então um papel importante na prevenção da doença.

Uma possível fonte de pesquisa e inovação no domínio farmacêutico será de resposta à necessidade de ferramentas de diagnóstico mais avançadas para a toxoplasmose aguda (infecção primária ou reativação) em grávidas bem como em pacientes imunodeprimidos devido ao número crescente de transplantes de órgãos e de medula óssea. Contudo, o desenvolvimento de métodos com níveis de deteção inferiores traria uma excessiva sensibilidade capaz de detetar antígenos ou ADN de parasitas em pessoas saudáveis, cronicamente infetadas. Novos testes terão que superar validações rigorosas para avaliar todos estes limites de deteção e a sua real utilidade.

Além disso, a deteção facilitada de *T. gondii* na urina já foi abordada, utilizando a deteção de antígenos^[37] ou qPCR^[38]. Um outro rumo a seguir poderá então contemplar a avaliação de materiais biológicos alternativos e o seu valor ao nível do diagnóstico, abrindo o caminho para novas escolhas a aplicar no acompanhamento do doente.

No que diz respeito ao rastreio das mulheres grávidas para a infeção por *T. gondii*, é muito difícil prever a evolução das políticas, uma vez que as considerações económicas e éticas, que intrinsecamente diferem entre os países, precisam ser tomados em conta. Contudo, os prós e contras da existência de rastreio durante a gravidez, bem como a forma como esse rastreio é conduzido, devem ser debatidos.

6. BIBLIOGRAFIA

1. TORGERSON, P.R.; MASTROIACOVO, P. - **The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review**. Bull World Health Organ. 91, 7 (2013), p. 501-8.
2. HASHOOSH, D.A.; MAJEED, I.A. – **Comparison of two assays in the diagnosis of toxoplasmosis: immunological and molecular**. East Mediterr Health J. 20, 1 (2014), p. 46-50.
3. GARCIA, L.S.; FRITSCH, T.R.; GRADY, K.K.; HEALY, G.R.; MCAULEY, J.; ROCHA, A.; WILSON, M.; WONG, J. – **Clinical Use and Interpretation of Serologic Tests for Toxoplasma gondii**. Approved Guideline CLSI document M36-A. 24, 6, 2004. ISBN 1-56238-523-2
4. ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M.L. – **Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis**. Clin Microbiol Rev. 25, 2 (2012), p. 264-96.
5. LAPPALAINEN, M.; HEDMAN, K. – **Serodiagnosis of toxoplasmosis. The impact of measurement of IgG avidity**. Ann Ist Super Sanita. 40, 1 (2004), p. 81-8.
6. SENSINI, A. – **Toxoplasma gondii infection in pregnancy: opportunities and pitfalls of serological diagnosis**. Clin Microbiol Infect. 12, 6 (2006), p. 504-12.
7. MURAT, J.B.; HIDALGO, H. F.; BRENIER-PINCHART, M. P.; PELLOUX, H. – **Human toxoplasmosis: which biological diagnostic tests are best suited to which clinical situations?** Expert Rev Anti Infect Ther. 11, 9 (2013), p. 943-56.
8. DEROUIN, F.; MAZERON, M.C.; GARIN, Y.J. – **Comparative study of tissue culture and mouse inoculation methods for demonstration of Toxoplasma gondii**. J Clin Microbiol. 25, 9 (1987), p. 1597-600.
9. PIERGILI FIORETTI, D. – **[Problems and limitations of conventional and innovative methods for the diagnosis of Toxoplasmosis in humans and animals]**. Parassitologia. 46, 1-2 (2004), p. 177-81.
10. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION – **Polymerase Chain Reaction (PCR)**. [Acedido a 1 de julho de 2015] Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>
11. MACPHERSON, J.M.; GAJADHAR, A.A. – **Sensitive and specific polymerase chain reaction detection of Toxoplasma gondii for veterinary and medical diagnosis**. Can J Vet Res. 57, 1 (1993), p. 45-8.
12. STERKERS, Y.; VARLET-MARIE, E.; CASSAING, S.; BRENIER-PINCHART, M. P.; BRUN, S.; DALLE, F.; DELHAES, L.; FILISETTI, D.; PELLOUX, H.; YERA, H.; BASTIEN, P. –

- Multicentric comparative analytical performance study for molecular detection of low amounts of *Toxoplasma gondii* from simulated specimens.** J Clin Microbiol. 48, 9 (2010), p. 3216-22.
13. WANG, Y.H.; LI, X.R.; WANG, G.X.; YIN, H.; CAI, X.P.; FU, B.Q.; ZHANG, D.L. – **Development of an immunochromatographic strip for the rapid detection of *Toxoplasma gondii* circulating antigens.** Parasitol Int. 60, 1 (2011), p. 105-7.
 14. KODYM, P.; MACHALA, L.; ROHÁCOVÁ, H.; SIROCKÁ, B.; MALÝ, M. – **Evaluation of a commercial IgE ELISA in comparison with IgA and IgM ELISAs, IgG avidity assay and complement fixation for the diagnosis of acute toxoplasmosis.** Clin Microbiol Infect. 13, 1 (2007), p. 40-7.
 15. FAURE, A.K.; 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. 13, 1 (1999), p. 27-30.
 16. GILBERT, R.E.; THALIB, L.; TAN, H. K.; PAUL, M.; WALLON, M.; PETERSEN, E. – **Screening for congenital toxoplasmosis: accuracy of immunoglobulin M and immunoglobulin A tests after birth.** J Med Screen. 14, 1 (2007), p. 8-13.
 17. PINON, J.M.; DUMON, H.; CHEMLA, C.; FRANCK, J.; PETERSEN, E.; LEBECH, M.; ZUFFEREY, J.; BESSIERES, M.H.; MARTY, P.; HOLLIMAN, R.; JOHNSON, J.; LUYASU, V.; LECOLIER, B.; GUY, E.; JOYNSON, D.H.; DECOSTER, A.; ENDERS, G.; PELLOUX, H.; CANDOLFI, E. – **Strategy for diagnosis of congenital toxoplasmosis: evaluation of methods comparing mothers and newborns and standard methods for postnatal detection of immunoglobulin G, M, and A antibodies.** J Clin Microbiol. 39, 6 (2001), p. 2267-71.
 18. MURAT, J.B.; L'OLLIVIER, C.; FRICKER HIDALGO, H.; FRANCK, J.; PELLOUX, H.; PIARROUX, R. – **Evaluation of the new Elecsys Toxo IgG avidity assay for toxoplasmosis and new insights into the interpretation of avidity results.** Clin Vaccine Immunol. 19, 11 (2012), p. 1838-43.
 19. REITER-OWONA, I.; PETERSEN, E.; JOYNSON, D.; ASPÖCK, H.; DARDÉ, M. L.; DISKO, R.; DREAZEN, O.; DUMON, H.; GRILLO, R.; GROSS, U.; HAYDE, M.; HOLLIMAN, R.; HO-YEN, D.O.; JANITSCHKE, K.; JENUM, P.A.; NASER, K.; OLSZEWSKI, M.; THULLIEZ, P.; SEITZ, H.M. – **The past and present role of the Sabin-Feldman dye test in the serodiagnosis of toxoplasmosis.** Bull World Health Organ. 77, 11 (1999), p. 929-35.

20. SABIN, A.B.; FELDMAN, H.A. – **Dyes as Microchemical Indicators of a New Immunity Phenomenon Affecting a Protozoon Parasite (Toxoplasma).** Science. 108, 2815 (1948), p. 660-3.
21. DESMONTS, G.; REMINGTON, J.S. – **Direct agglutination test for diagnosis of Toxoplasma infection: method for increasing sensitivity and specificity.** J Clin Microbiol. 11, 6 (1980), p. 562-8.
22. VILLARD, O.; CIMON, B.; FRANCK, J.; FRICKER-HIDALGO, H.; GODINEAU, N.; HOUZE, S.; PARIS, L.; PELLOUX, H.; VILLENA, I.; CANDOLFI, E. – **Evaluation of the usefulness of six commercial agglutination assays for serologic diagnosis of toxoplasmosis.** Diagn Microbiol Infect Dis. 73,3 (2012), p. 231-5.
23. DESMONTS, G.; NAOT, Y.; REMINGTON, J.S. – **Immunoglobulin M-immunosorbent agglutination assay for diagnosis of infectious diseases: diagnosis of acute congenital and acquired Toxoplasma infections.** J Clin Microbiol. 15, 5 (1981), p. 486-91.
24. FRANCIS, J.M.; JOYNSON, D.H. – **Duration of specific immunoglobulin A antibody following acute toxoplasmosis as determined by enzyme immunoassay and immunosorbent agglutination assay.** Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 12, 7 (1993), p. 556-9.
25. GAN, S.D.; PATEL, K.R. – **Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay.** J Invest Dermatol. 133, 9 (2013), p. e12.
26. RILLING, V.; DIETZ, K.; KRCZAL, D.; KNOTEK, F.; ENDERS, G. – **Evaluation of a commercial IgG/IgM Western blot assay for early postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis.** Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 22, 3 (2003), p. 174-80.
27. GROSS, U.; LÜDER, C. G.; HENDGEN, V.; HEEG, C.; SAUER, I.; WEIDNER, A.; KRCZAL, D.; ENDERS, G. – **Comparative immunoglobulin G antibody profiles between mother and child (CGMC test) for early diagnosis of congenital toxoplasmosis.** J Clin Microbiol. 38, 10 (2000), p. 3619-22.
28. TISSOT DUPONT, D.; FRICKER-HIDALGO, H.; BRENIER-PINCHART, M. P.; BOSTBRU, C.; AMBROISE-THOMAS, P.; PELLOUX, H. – **Usefulness of Western blot in serological follow-up of newborns suspected of congenital toxoplasmosis.** Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 22, 2 (2003), p. 122-5.
29. CHUMPITAZI, B.F.; BOUSSAID, A.; PELLOUX, H.; RACINET, C.; BOST, M.; GOULLIER-FLEURET, A. – **Diagnosis of congenital toxoplasmosis by immunoblotting and relationship with other methods.** J Clin Microbiol. 33, 6

- (1995), p. 1479-85.
30. ARMSTRONG, L.; ISAACS, D.; EVANS, N. – **Severe neonatal toxoplasmosis after third trimester maternal infection.** *Pediatr Infect Dis J.* 23, 10 (2004), p. 968-9.
 31. GRAS, L.; WALLON, M.; POLLAK, A.; CORTINA-BORJA, M.; EVENGARD, B.; HAYDE, M.; PETERSEN, E.; GILBERT, R. – **Association between prenatal treatment and clinical manifestations of congenital toxoplasmosis in infancy: a cohort study in 13 European centres.** *Acta Paediatr.* 94, 12 (2005), p. 1721-31.
 32. FLORI, P.; TARDY, L.; PATURAL, H.; BELLETE, B.; VARLET, M.N.; HAFID, J.; RABERIN, H.; SUNG, R.T. – **Reliability of immunoglobulin G antitoxoplasma avidity test and effects of treatment on avidity indexes of infants and pregnant women.** *Clin Diagn Lab Immunol.* 11, 4 (2004), p. 669-74.
 33. WALLON, M.; PEYRON, F.; CORNU, C.; VINAULT, S.; ABRAHAMOWICZ, M.; KOPP, C. B.; BINQUET, C. – **Congenital toxoplasma infection: monthly prenatal screening decreases transmission rate and improves clinical outcome at age 3 years.** *Clin Infect Dis.* 56, 9 (2013), p. 1223-31.
 34. PELLOUX, H.; FRICKER-HIDALGO, H.; GOULLIER-FLEURET, A.; AMBROISE-THOMAS, P. – **Detection of anti-Toxoplasma immunoglobulin M in pregnant women.** *J Clin Microbiol.* 35, 8 (1997), p. 2187.
 35. LIESENFELD, O.; MONTOYA, J. G.; TATHINENI, N. J.; DAVIS, M.; BROWN, B. W.; COBB, K. L.; PARSONNET, J.; REMINGTON, J. S. – **Confirmatory serologic testing for acute toxoplasmosis and rate of induced abortions among women reported to have positive Toxoplasma immunoglobulin M antibody titers.** *Am J Obstet Gynecol.* 184, 2 (2001), p. 140-5.
 36. SOUZA, G.F.; CARVALHO, D.; PEDROSA, W.; FRANCK, J.; PIARROUX, R. – **Analytical validation of anti-toxoplasma IgG immunoassays.** *Braz J Infect Dis.* 16, 6 (2012), p. 574-6.
 37. FACHADO, A.; FONSECA, L.; FONTE, L.; ALBERTI, E.; COX, R.; BANDERA, F. – **Toxoplasma gondii antigenuria in patients with acquired immune deficiency syndrome.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 92, 5 (1997), p. 589-93.
 38. SHOJAEI, S.; REZAEI, S.; KESHAVARZ, H. – **Detection of Toxoplasma gondii from sera and urine of experimentally infected mice by PCR.** *Pak J Biol Sci.* 10, 1 (2007), p. 193-5.