

**IMUNOGLOBULINAS ANTÍGENO-ESPECÍFICOS EM AMOSTRAS DE  
FLUIDOS CORPORAIS DE BINÔMIO MÃE-FILHO RELACIONADOS  
COM A INGESTÃO DE CISTOS TECIDUAIS VERSUS OOCISTOS NA  
INFECÇÃO TOXOPLÁSMICA.**

**BIANCA MAGNELLI MANGIAVACCHI**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO  
CAMPOS DOS GOYTACAZES**

**2016**

**Imunoglobulinas antígeno-específicos em amostras de fluidos corporais de binômio mãe-filho relacionados com a ingestão de cistos teciduais *versus* oocistos na infecção toxoplásmica.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia do Centro de Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia.

**Orientadora: Prof. Dra. Lilian Maria Garcia Bahia do  
Oliveira**

**Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro  
Campos dos Goytacazes  
2016**

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes Instituições:

**Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela concessão da bolsa de Pós-Graduação nível Doutorado;

**Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ)** processo Processo E-26/110.869/2009;

**Laboratório de Biologia do Reconhecer, na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF)**, em cujo laboratório esta pesquisa foi realizada;

**Santa Casa de Misericórdia de Belém do Pará e ao Programa de Amamentação – PROAME**, onde foram realizadas as coletas de amostras do município de Belém, sob a orientação e colaboração da Prof. Dra. Clea Nazaré Carneiro Bichara;

**Secretaria da Educação do Município de Campos dos Goytacazes**, que viabilizou as visitas, palestras e coletas em escolas e creches do município para o inquérito realizado em 2014;

**Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA)**, onde foram realizados os ELISAS anti-antígeno TgERP ;

*Dedico este trabalho à Dalva de Oliveira Magnelli (avó in memorian), Regina Coeli Magnelli (mãe), Paula Magnelli Mangiavacchi e Karla Magnelli Mangiavacchi (irmãs), Leonardo da Silva Jacomini (esposos) e Liv Magnelli Jacomini (filha). Pessoas essenciais nesta trajetória tão importante da minha vida. Obrigada pela dedicação, paciência, ensinamentos, entusiasmo, carinho e cuidado. A eles, todo o meu amor e gratidão!*

**“Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe. Só levo a certeza de que muito pouco eu sei, que nada sei....”**

**Almir Sater**

# AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que está sempre ao meu lado dando força para superar cada etapa importante na minha formação profissional e pessoal.

À minha mãe, Regina Coeli, e minha avó, Dalva (*in memoriam*), por ter permitido que eu estivesse realizando os meus sonhos mesmo com tantas dificuldades, distâncias, saudades e meu humor inconstante de sempre. AMO MUITO VOCÊS!

Agradeço às minhas irmãs e amigas, Karla e Paula, por fazerem os meus dias mais felizes por estarem perto de mim sempre! Amo vocês!

Ao meu namorado, amigo, esposo, companheiro, Leonardo da Silva Jacomini, por estar sempre me apoiando e por ter me dado a maior felicidade de todo mundo: a nossa filha LIV.  
AMO-TE!

À minha orientadora, Prof. Dra. Lílian Maria Garcia Bahia Oliveira, por acreditar no meu potencial, pela chance de aprendizado e possibilidade de crescimento pessoal e profissional ao longo desses 13 anos de trabalho.

Aos amigos do LBR, aqueles que ainda estão e ou que já partiram para outras universidades, muito obrigada pelos momentos de ajuda e companheirismo durante os experimentos, além dos momentos agradáveis de descontração.

Aos amigos da sala 201, 203 ou ainda 204-b, Prof. Dra. Alba Lucínia, Dra. Flávia, Liliani, Dra. Marcela Boechat, Dra. Livia Mattos, Me. Rhônia França, Me. Ricardo Guerra, Me. Juliana Azevedo, a “new generation”: Yuri, Rebeka, Letícia, Leonardo, Caíque, muito obrigada pela ajuda nos experimentos, pelos momentos de dificuldades e pelos momentos de alegria, risadas e bate-papo. Amo todos vocês!

A Dra. Clea Nazaré Carneiro Bichara, meu agradecimento especial, por ter recebido com tanto carinho e por ter auxiliado todos os momentos nas coletas de campo em Belém. Agradeço ainda a toda equipe do PROAME, especialmente na figura do Capitão que nos acompanhou em todas as visitas nas casas, e Dona Esmeralda que realizou as coletas de

sangue dos bebês, ao Danilo que nos levou as visitas. A todos da comunidade de Guamá e da creche Frei Daniel. Muito obrigada a todos!

A Secretaria de Educação de Campos dos Goytacazes, na figura da Prof. Joilza, que aceitou o desenvolver do nosso projeto nas escolas e creches do município onde pudemos desenvolver palestras voltadas a comunidade e ainda realizar a coleta das amostras desse e de outros trabalhos do nosso grupo de pesquisa. A todas as diretoras das unidades escolares que nos receberam e acolheram prontamente a nossa proposta e o nosso projeto. A todos os técnicos e técnicas de enfermagem que auxiliaram nas coletas de sangue. A Núbia Alencar pelo suporte. A ASTRAM pela liberação dos veículos e motoristas. Aos amigos do laboratório que auxiliaram na aplicação dos questionários. Muito obrigada a todos!

Um agradecimento especial ao Prof. Dr. Eurico Camargo Neto pela realização dos testes de ELISA convencional das amostras de soro dos pacientes desse estudo.

Agradeço ao Prof. Dr. Renato Augusto Da Matta, a Prof. Dra. Alba Lucínia Peixoto Rangel e a Dra. Annelise Maria Wilken de Abreu, que aceitaram prontamente a participar da banca examinadora desta tese. Bem como aos professores Dr. Franz Borges Viana e Dr. Jorge Hudson Petretski por terem aceitado o convite.

Agradeço a Dra. Livia Mattos Martins por ter aceitado revisar essa tese e ainda mais do que isso, por fazer parte todos os dias dos momentos mais felizes e dos momentos mais tristes desse processo de doutoramento porque sobretudo estivemos sempre juntas apoiando uma a outra. Amiga você foi uma das grandes descobertas nessa universidade! Sempre e para Sempre!

Agradeço ainda a Dra. Flavia Pereira Vieira por ter aceitado realizar os experimentos de ELISA na USDA que foram fundamentais para os resultados desse trabalho. Flavinha, um ciclo se fecha! Foram 12 anos de trabalhos e colaborações, mas nesses últimos anos estivemos mais próximas e compartilhando experiências, dores e amores. Espero e desejo todo o sucesso do mundo a você! Sempre e para Sempre!

Enfim, a todos os pacientes no município de Campos dos Goytacazes e Belém, o meu muito obrigado, pois se não fossem vocês este trabalho não seria realizado.

# Sumário

<b>I. INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
1. <b>ESTADO DA ARTE</b>	<b>15</b>
1.1. <i>Histórico</i>	15
1.2. <i>Toxoplasma gondii</i>	17
1.3. <i>Epidemiologia</i>	20
1.4. <i>Fatores de risco para a toxoplasmose</i>	23
1.5. <b>IMUNIDADE CONTRA <i>Toxoplasma gondii</i></b>	<b>25</b>
1.5.1. <b>RESPOSTA IMUNE MEDIADA POR CÉLULAS</b>	<b>25</b>
1.5.2. <b>RESPOSTA IMUNE HUMORAL</b>	<b>27</b>
1.6. <i>Diagnóstico</i>	29
<b>II. JUSTIFICATIVA</b>	<b>33</b>
<b>III. OBJETIVOS</b>	<b>35</b>
3.1. <i>Objetivo Geral</i>	35
3.2. <i>Objetivos Específicos</i>	35
<b>IV. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>36</b>
4.1. <i>Áreas de estudo</i>	36
4.2. <i>População a ser estudada</i>	38
4.2.1. <i>Seleção dos indivíduos em Belém</i>	39
4.2.2. <i>Seleção dos indivíduos em Campos dos Goytacazes</i>	39
4.3. <i>Amostras de soro</i>	41
4.4. <i>Teste de quimioluminescência pra IgG e IgM anti-<i>T. gondii</i></i>	41
4.5. <i>Amostras de fezes e leite materno</i>	41
4.5.1. <i>Extração de imunoglobulinas de extratos fecais e do leite materno</i>	41
4.6. <i>Amostras de Saliva</i>	42
4.7. <i>Separação dos binômios mãe-filho</i>	42
4.8. <i>Detecção de Anticorpos IgG anti-TgERP nas amostras de soro, saliva, leite materno e fezes dos indivíduos por ELISA</i>	43
4.9. <i>Questionário de fatores de risco para toxoplasmose</i>	43
4.10. <i>Análises estatísticas</i>	44
<b>V. RESULTADOS</b>	<b>46</b>
5.1. <b>Avaliação da Situação de Infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> em Crianças de 0 a 6 anos de Idade provenientes de Belém do Pará e Campos dos Goytacazes (RJ).</b>	<b>46</b>
5.1.1. <i>Detecção de anticorpos IgG e IgM anti-<i>T. gondii</i> por meio de kits convencionais em amostras de soro</i>	46



<b>5.2. Cálculo de Especificidade e Sensibilidade e aplicação de curvas ROC para os testes ELISA utilizando o antígeno TgERP.</b>	<b>50</b>
<b>5.3. Avaliação dos níveis de imunoglobulinas antígeno específicos em amostras de fluidos corporais de binômio mãe-filho</b>	<b>55</b>
5.3.1. Detecção de anticorpos anti- <i>T. gondii</i> em amostras de soro de binômio mãe-filho por ELISA convencional	55
5.3.2. Detecção de imunoglobulinas específicas para antígenos de Esporozoítos (anti-TgERP) em amostras de soro de binômios mãe-filho por ELISA	56
5.3.3. Detecção de imunoglobulinas específicas para antígenos de Esporozoítos (anti-TgERP) em amostras de saliva de binômio mãe-filho por ELISA	57
5.3.4. Detecção de imunoglobulinas específicas para antígenos de Esporozoítos (anti-TgERP) em amostras de leite materno e fezes de binômios mãe-filho por ELISA	58
<b>5.4 Correlação entre os níveis de imunoglobulinas antígeno específicas em amostras de fluidos corporais de binômio mãe-filho</b>	<b>59</b>
<b>5.5. Análise dos fatores de risco no binômio mãe-filho – análise preliminar</b>	<b>63</b>
5.5.1. Análise dos fatores de risco em crianças	63
5.5.2. Análise dos fatores de risco em mães	65
<b>VI. DISCUSSÃO</b>	<b>67</b>
<b>VII. CONCLUSÃO</b>	<b>81</b>
<b>VIII. REFERÊNCIAS</b>	<b>83</b>

## ANEXOS

Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa

Termo de Consentimento Livre Esclarecido

Questionário socioepidemiológico Projeto IgA

Artigo Epidemiology and Infection

## Resumo

A toxoplasmose é prevalente em várias regiões do Brasil e do mundo. Neste trabalho estudamos a prevalência da infecção em duas regiões distantes geograficamente entre si: no norte do Rio de Janeiro (campos dos Goytacazes) e em Belém do Pará. Ambas são áreas hiperendêmicas para a toxoplasmose, nestes locais afetando de maneira mais importante a população de baixo poder aquisitivo. O objetivo desse estudo foi investigar a prevalência da infecção em estudo de coorte por meio da avaliação de anticorpos antígeno específicos em amostras de soro, saliva, leite materno e fezes de mães, recém-nascidos e crianças até 64 meses nestas duas regiões. Foi investigado também por meio de questionário os fatores de risco que poderiam estar relacionados com a presença da infecção na população estudada. Um total 192 binômios mãe-filho foram avaliadas. Anticorpos presentes em amostras de fluidos corporais (saliva leite, fezes) foram testadas para a presença de anticorpos específicos contra antígenos da fase esporozoíta do *Toxoplasma gondii*, designada como TgERP, sendo esta proteína relacionada a embriogênese do parasito. A prevalência da infecção toxoplásmica no binômio mãe-filho também foi calculada pelo teste de ELISA TgERP e comparada com os resultados dos testes de ELISA convencional que avaliou a presença de IgG e IgM anti- *T. gondii* em todas as amostras de soro. O cut-off para o ELISA TgERP foi calculado utilizando: 1) a curva ROC, que é capaz de determinar a especificidade e sensibilidade do teste a partir do ponto de corte escolhido e 2) o critério arbitrário de 3 valores de desvio padrão de testes com pacientes soronegativos para *T. gondii* em testes convencionais. A prevalência estimada pelo teste de ELISA convencional em crianças de 0 a 64 meses de idade foi de 6,25-13,4%, já entre as mães a prevalência encontrada foi de 71%. A prevalência encontrada no teste de ELISA TgERP em crianças de 2 a 59 meses de idade na cidade de Campos dos Goytacazes foi superior entre as crianças, variando entre 31,25 e 41% (curva ROC), respectivamente para a presença das imunoglobulinas IgG e IgA anti-TgERP. Já para as análises utilizando o cálculo do desvio padrão, os resultados de prevalência foram similares ao encontrado para os níveis de IgG anti- *T. gondii* ou seja (6,25%-3,45%, para IgG e IgA anti-TgERP respectivamente). Avaliando os fatores de risco, foi encontrada a relação entre a presença de poço, o local da moradia (área urbana ou área rural) e a infecção toxoplásmica por ingestão de oocistos (avaliada por anticorpos anti-TgERP). O número de crianças na residência apresentou em relação direta com a presença da IgG anti-*T. gondii* avaliado pelo ELISA convencional. Todos esses resultados demonstram que a utilização de TgERP como nova forma para identificação da via de infecção por *T. gondii*, permite sua aplicação em investigações epidemiológicas e diagnósticas em humanos. Além disso, a utilização de amostras biológicas como a saliva que se mostrou eficaz, tem a vantagem de apresentar uma alternativa metodológica sem a necessidade de procedimentos médicos invasivos, e de poder ser utilizado em grande escala em estudos epidemiológicos.

**Palavras-chaves:** *Toxoplasma gondii*, Imunoglobulinas, saliva, diagnóstico, oocistos.

## Abstract

Toxoplasmosis is prevalent in several regions of Brazil and the world. In this study it was investigated the prevalence of toxoplasmosis infection in two distant geographically Brazilian cities one in the north of Rio de Janeiro state (Campos dos Goytacazes) and another in the state of Pará, Belém. Both are hyper endemic areas for toxoplasmosis, and more importantly affecting the population of low income. The aim of this study was to investigate the prevalence of infection in a cohort study by evaluating specific antigen antibodies in serum, saliva, breast milk and feces of mothers, newborns and children up to 64 months in these two regions. It was also investigated by a questionnaire the risk factors that could be related to the presence of infection in the population studied. A total 192 mother-child binomials were evaluated. Antibodies present in body fluid samples (saliva, milk, feces) were tested for the presence of specific antibodies against antigens of the sporozoite stage of *T. gondii*, designated as TgERP, which are embryogenesis related proteins of the parasite. The prevalence of *T. gondii* infection in the mother and child was also calculated by TgERP ELISA test and compared to the results of conventional ELISA tests that assessed the presence of IgG and IgM anti-*Toxoplasma gondii* in all serum samples. The cut-off for the ELISA TgERP was calculated using two parameters: 1) the ROC curve, which determines the specificity and sensitivity of the test from the cutoff chosen and 2) the arbitrary criterion of 3 times standard deviations values from seronegative patients for *T. gondii* in conventional tests. The prevalence estimated by conventional ELISA test in children 0-64 months of age was 6.25 to 13.4%, while among mothers prevalence was 71%. The prevalence found in TgERP ELISA test in children 2-59 months old in the city of Campos dos Goytacazes was higher among children, ranging between 31.25 and 41% (ROC curve), respectively for the presence of IgG immunoglobulins and IgA anti-TgERP. As for the analysis using the calculation of standard deviation, prevalence results were similar to those found for levels of IgG anti-*Toxoplasma gondii* namely, (6.25% -3.45% for IgG and IgA anti-TgERP respectively). Assessing the risk factors by questionnaires, it was found a relationship between the presence of wells and the location of the housing (urban area or rural area) and *T. gondii* infection by ingestion of oocysts (evaluated anti-antibodies anti- TgERP). The number of children in dwellings presented direct relation with the presence of anti-*T. gondii* IgG assessed by conventional ELISA. All these results demonstrate that the use of TgERP as a new tool for the identification of *T. gondii* infection pathway, allows its application in diagnostic and epidemiological investigations in humans. Furthermore, the use of biological samples such as saliva, which is effective, has the advantage to present an alternative methodology without the need for invasive medical procedures, and can be used in large-scale epidemiological studies.

**Keywords:** *Toxoplasma gondii*, Immunoglobulins, saliva, diagnosis, oocysts

## Índice de Figuras e Tabelas

Figura 1: Fontes de contaminação pelo <i>T. gondii</i> em humanos.....	19
Figura 2: Cinética da resposta de anticorpos em indivíduos imunocompetentes. (Extraído e traduzido de Robert-Gangneux & Dardè, 2012).....	28
Figura 3: Mapa esquemático do município de Campos dos Goytacazes, no Estado do Rio de Janeiro, e seus distritos (extraído e modificado do Google Maps).....	37
Figura 4: Mapa esquemático do município de Belém, no Estado do Pará, e seus distritos (extraído e modificado do Google Maps).....	37
Figura 5: Prevalência de anticorpos IgG e IgM em 192 amostras de soro materno presentes no binômio mãe-filho dos municípios de Campos dos Goytacazes e Belém do Pará, sendo mães de crianças de 0 a 6 meses (26 indivíduos), 7 a 12 meses (20 indivíduos), 13 a 24 meses (25 indivíduos), 25 a 36 meses (44 indivíduos), 37 a 48 meses (54 indivíduos) e acima de 49 meses (23 indivíduos). ....	47
Figura 6: Prevalência de anticorpos IgG e IgM específicos anti- <i>T. gondii</i> em amostras de soro provenientes dos municípios de Campos dos Goytacazes e Belém crianças de 0 a 6 meses (26 indivíduos), 7 a 12 meses (20 indivíduos), 13 a 24 meses (25 indivíduos), 25 a 36 meses (44 indivíduos), 37 a 48 meses (54 indivíduos) e acima de 49 meses (23 indivíduos). ....	48
Figura 7: Análise da curva ROC para estabelecimento do valor de <i>cut off</i> capaz de discriminar entre os níveis sérico de IgG anti-TgERP em crianças soropositivas e soronegativas para a toxoplasmose.....	51
Figura 8: Análise da curva ROC para estabelecimento do valor de <i>cut off</i> capaz de discriminar entre os níveis salivares de IgA anti-TgERP em crianças soropositivas e soronegativas para a toxoplasmose.....	51
Figura 9: Análise da curva ROC para estabelecimento do valor de <i>cut off</i> capaz de discriminar entre os níveis sérico de IgG anti-TgERP em mães soropositivas e soronegativas para a toxoplasmose.....	52
Figura 10: Análise da curva ROC para estabelecimento do valor de <i>cut off</i> capaz de discriminar entre os níveis salivares de IgA anti-TgERP em mães soropositivas e soronegativas para a toxoplasmose.....	52
Figura 11: Curvas de prevalência para a toxoplasmose de acordo com o teste de ELISA convencional e ELISA TgERP para amostras de binômio mãe-filho residente em Campos dos Goytacazes.....	54

Figura 12: Detecção de IgG e IgM por ELISA convencional de acordo com a faixa etária das crianças e suas respectivas mães residentes no município de Campos dos Goytacazes e Belém.....	56
Figura 13: Detecção de IgG por ELISA anti-TgERP de acordo com a faixa etária das crianças residentes no município de Campos dos Goytacazes. ....	57
Figura 14: Detecção de IgA por ELISA anti-TgERP de acordo com a faixa etária das crianças residentes no município de Campos dos Goytacazes. ....	58
Figura 15: Detecção de IgA por ELISA anti-TgERP em amostras de fezes e leite materno de acordo com a faixa etária das crianças residentes nos municípios de Campos dos Goytacazes e Belém.....	59
Figura 16: Correlação entre os níveis de anticorpos específicos de diferentes isotipos.....	60
Figura 17: Correlação entre os níveis de anticorpos específicos de diferentes isotipos. ....	61
Figura 18: Correlação entre os níveis de anticorpos específicos de diferentes isotipos. ....	62
Figura 19: Correlação entre os níveis de anticorpos específicos de diferentes isotipos. ....	63
Tabela 1: Número de amostras coletadas para a avaliação da presença de anticorpos em cada uma das localidades.....	38
Tabela 2: Grupo de indivíduos envolvidos no estudo segundo a sorologia para a toxoplasmose, localidade e faixa etária.....	40
Tabela 3: Separação dos binômios em grupos de estudo por faixa etária.....	42
Tabela 4: Prevalência de anticorpos IgG e IgM específicos anti- <i>T. gondii</i> em amostras de soro de crianças provenientes dos municípios de Campos dos Goytacazes e Belém separados por faixa etária.....	50
Tabela 5: Valores de Especificidade, Sensibilidade e Razão de Verossimilhança para os testes com amostras de soro, saliva, leite materno e fezes utilizando antígenos TgERP. ....	53
Tabela 6: Resultados da análise univariada em crianças mostrando as variáveis estatisticamente significantes para a soropositividade da toxoplasmose para antígenos específicos.....	65

## I. INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma zoonose amplamente distribuída em humanos e animais homeotérmicos sendo prevalente em diversas regiões do planeta e de grande importância veterinária e médica, por causar aborto ou doença congênita em seus hospedeiros intermediários (Dubey *et al.*, 2012). O Brasil é um dos países com maior prevalência da doença em seres humanos; em diversos estados, em particular no norte fluminense, o risco de se adquirir a toxoplasmose está vinculado à situação de pobreza, falta de saneamento básico e baixa escolaridade (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003).

A importância epidemiológica relativa dos diferentes modos de infecção no que diz respeito à transmissão horizontal de *T. gondii*, ou seja, pela ingestão de cistos teciduais em carne malcozida ou crua, ou pela ingestão de alimentos ou água contaminados com oocistos esporulados de fezes de gato, permanece desconhecida (Jiang *et al.*, 2012, VanWormer *et al.*, 2013, Smith 2013). Em termos epidemiológicos, utilizando sorologia convencional, que reconhece antígenos de taquizoítos, não é possível determinar a via predominante (ocistos ou cistos de tecido) de transmissão (Jones & Dubey 2010).

O diagnóstico sorológico com a identificação de cistos ou oocistos de *T. gondii* como o modo de transmissão por meio de um ELISA utilizando uma proteína recombinante, isto é, a proteína relacionada com a embriogênese de esporozoítos (TgERP) (Hill *et al.*, 2011), e, mais recentemente, a proteína recombinante CCp5A, permitiu a diferenciação entre dois modos de infecção (Santana *et al.*, 2015). Nesse sentido o nosso estudo se propôs a avaliar a prevalência da toxoplasmose utilizando o teste de ELISA convencional e ELISA TgERP de forma investigativa em amostras de fluidos corporais de binômio mãe-filho expostos ao risco de infecção por *T. gondii*.

### 1. ESTADO DA ARTE

#### 1.1. Histórico

A Toxoplasmose é uma doença parasitária descrita independentemente por Splendore no Brasil, em coelhos, e por Nicolle e Manceaux, na Tunísia (Ferguson

2009). Em julho de 1908, Alfonso Splendore descreveu um parasita que havia causado a morte por paralisia em um coelho e o denominou *Toxoplasma cuniculli*. Charles Nicolle e Louis Manceaux, em outubro de 1908, observaram o parasita em células mononucleares do baço e fígado de um roedor norte-africano, o gundi (*Ctenodactylus gundi*). Primeiramente, tentaram denominá-lo *Leishmania gondii* pela semelhança do novo parasita com os protozoários do gênero *Leishmania*. No entanto, no ano seguinte, decidiram com base em critérios morfológicos que o parasita não se tratava de um organismo do gênero *Leishmania*. Propôs-se, então, o nome *Toxoplasma* e renomeou-se o parasita encontrado como *Toxoplasma gondii*, devido a identificação nominal incorreta, por Nicolle & Manceaux, do hospedeiro que por ele foi denominado *Ctenodactylus gondii*. Portanto, cabe a Splendore e também a Nicolle e Manceaux a descoberta e os primeiros registros científicos do *Toxoplasma gondii* (Ferguson 2009).

O primeiro caso em seres humanos foi relatado em 1923, pelo oftalmologista Janku. Este registrou o primeiro caso de Toxoplasmose ocular em uma criança de 11 meses de idade que apresentava um quadro de hidrocefalia congênita (Remington 2011). Entretanto, a Toxoplasmose como doença em humanos só passou a ter impacto na medicina em 1937 com os trabalhos de Wolf e Cowen nos Estados Unidos (Guimarães 1943) que descreveram um caso fatal de encefalite granulomatosa, causada pelo *T. gondii*, em uma criança de 3 dias de vida. De 1937 a 1942, Wolf, Cowen e colaboradores contribuíram para que a Toxoplasmose fosse reconhecida como doença importante em humanos ao publicarem uma série de trabalhos relativos ao reconhecimento e reclassificação do parasita de outros casos já publicados. Com estes trabalhos ficou estabelecido que a Toxoplasmose é também uma doença transmitida congenitamente, pois apesar das mães serem assintomáticas, estas apresentavam anticorpos IgG anti-*T.gondii* indicando a transmissão congênita (Ferguson 2009).

A forma adquirida da Toxoplasmose foi inicialmente descrita por Pinkerton e Weinman (Weiss & Dubey 2009), em um adulto jovem com doença generalizada. Os primeiros estudos epidemiológicos da Toxoplasmose somente puderam ser realizados após 1948, posteriormente à publicação de Sabin e Feldman (Sabin & Feldman 1948) sobre a metodologia do *dye test*. A partir de

então foi possível demonstrar que a toxoplasmose é uma infecção comum ao homem em todo o mundo. Apesar da caracterização da doença no homem e nos animais, as principais vias de contaminação ainda continuaram desconhecidas até metade da década de 1960.

Embora a via congênita e a alimentar (carnivorismo) fossem importantes na transmissão do *Toxoplasma gondii*, não se podia explicar a infecção em indivíduos estritamente vegetarianos e animais herbívoros (Dubey, 2008). Esse fato pôde ser esclarecido quando o ciclo de vida do *T. gondii* foi elucidado após descobrir-se que fezes de gato podiam conter uma forma resistente do protozoário, que causava infecção quando ingerido por hospedeiros intermediários, justificando assim a infecção em indivíduos vegetarianos (Ferguson 2009).

No entanto, somente na década de 70 (Frenkel *et al.*, 1970) o ciclo de vida do *T. gondii* foi desvendado com a descoberta da fase sexual do parasita no intestino delgado do gato. Esta descoberta foi fundamental para que se pudesse avançar em pesquisas epidemiológicas sobre o modo de transmissão da infecção ao homem.

## **1.2. *Toxoplasma gondii***

*T. gondii* é um parasita intracelular obrigatório que possui três formas evolutivas em seu ciclo de vida: (1) os esporozoítos (presentes no interior dos oocistos que são eliminados nas fezes dos hospedeiros definitivos), (2) os cistos teciduais (que contem e liberam os bradizoítos) e (3) os taquizoítos (Dubey, 2002).

Os taquizoítos são a forma de multiplicação rápida do parasita dentro de vacúolos nas células hospedeiras e são capazes de infectar a maioria das células fagocíticas e não fagocíticas. Esse termo foi criado por Frenkel em 1973 (Dubey, 2008) para descrever esse estágio evolutivo do parasita que se encontra presente em muitos tipos de células dos hospedeiros intermediários e nas células não epiteliais intestinais dos hospedeiros definitivos. A presença dessa forma



infectante nos fluidos corporais e/ou tecidos é marcador de infecção aguda ou reativação da infecção latente (Kim & Weiss 2008).

Após um número desconhecido de divisões e por mecanismos ainda não muito bem esclarecidos os taquizoítos podem formar cistos teciduais. Esses cistos podem variar de tamanho e em número de bradizoítos no seu interior. Os bradizoítos são a forma de multiplicação lenta do parasita que ocorre no interior dos cistos teciduais, sendo também descrito por Frenkel em 1973 (Dubey 2009). Embora eles possam se desenvolver em diversos órgãos, eles são mais comumente encontrados no tecido muscular e nervoso, incluindo cérebro e olhos (Remington 2011). Os cistos teciduais permanecem infectivos nas carnes mesmo quando refrigerados por mais de 11 dias a  $-7^{\circ}\text{C}$ , sendo necessários congelamentos superiores a  $-12^{\circ}\text{C}$  por até 3 dias para que possam matar cistos (Dubey 1988). Temperaturas superiores a  $67^{\circ}\text{C}$  imediatamente matam os cistos teciduais (Dubey *et al.*, , 1990).

O oocisto é o zigoto, resultante do processo de reprodução sexuada no epitélio intestinal do gato onde ocorre a fusão do gameta masculino, microgameta, com o gameta feminino, macrogameta, formando uma estrutura envolta por dupla membrana, que contém em seu interior dois esporocistos, cada um contendo quatro esporozoítos. Os oocistos são eliminados nas fezes desses animais num período de 7 a 20 dias (Dubey *et al.*, 1998). Um único hospedeiro definitivo pode eliminar mais de 100 milhões de oocistos não esporulados no ambiente.

O oocisto não esporulado mede de dez a doze milímetros de diâmetro enquanto o esporulado mede de onze a treze milímetros de diâmetro (Dubey *et al.*, 1998). Esses oocistos se tornam infectivos por sua esporulação em 1 a 21 dias após serem liberados no ambiente e/ou água dependendo das condições de temperatura, umidade e oxigênio (Jones & Dubey 2010). Eles são capazes de sobreviver por até 106 dias a  $-10^{\circ}\text{C}$  e por 9 ou 32 dias em temperaturas de  $40^{\circ}\text{C}$  e  $35^{\circ}\text{C}$  respectivamente, porém são mortos por 1-2 minutos a  $55-60^{\circ}\text{C}$  (Jones & Dubey 2010). A parede oocística é altamente impermeável o que torna este muito resistente a tratamentos químicos e físicos, especialmente a tratamentos realizados para purificação da água, como cloração e ozônio (Dumètre *et al.*, 2008)

*T. gondii* apresenta 2 ciclos: um ciclo sexual no epitélio intestinal dos felídeos e um ciclo extra intestinal assexuado nos animais infectados (Frenkel *et al.*, 1970). Os oocistos são liberados no ambiente pelos felídeos através das fezes. Os hospedeiros intermediários, incluindo os humanos, geralmente adquirem a infecção pela ingestão de cistos teciduais presentes em carnes cruas ou mal passadas de animais infectados, por oocistos presentes no solo, alimentos ou água contaminados ou através da infecção transplacentária que ocorre em decorrência da passagem da infecção por *T. gondii* da mãe para o feto (Ferguson 2009) (figura 1). Há ainda outras formas de infecção por este parasita, tais como através de transfusão de sangue e células, transplante de órgãos e acidentes em laboratórios devido à manipulação de animais infectados ou material contaminado.

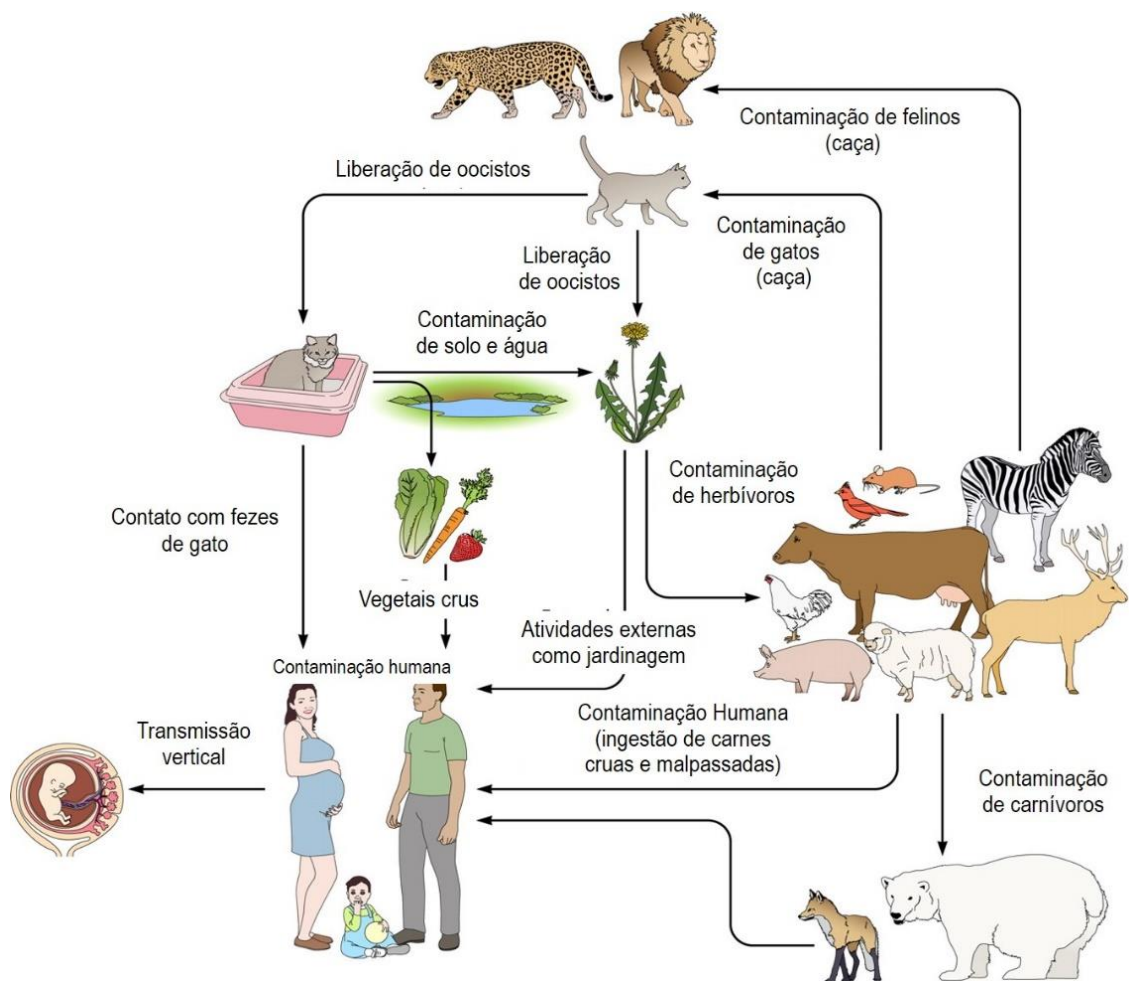


Figura 1: Fontes de contaminação pelo *T. gondii* em humanos. As várias fontes de contaminação alimentar e ambiental estão representadas (extraído e modificado de (Robert-Gangneux & Dardè 2012)

Após a infecção oral esse protozoário cruza a barreira do epitélio intestinal para se disseminar pelo corpo e estabelecer infecção latente (Munoz *et al.*, 2011). Em geral, a infecção é assintomática, no entanto, pode ocorrer no adulto quadro agudo febril com linfadenopatia, e em crianças a forma subaguda, com encefalomielite e retinocoroidites (Remington 2011). Neste último grupo faz-se importante distinguir entre a doença congênita ou neonatal e a infecção pós-natal.

### 1.3. Epidemiologia

A toxoplasmose possui ampla distribuição mundial, porém sua incidência é maior em áreas tropicais e diminui com o aumento da latitude (Petersen 2007). No âmbito mundial, a prevalência da toxoplasmose costuma estar compreendida entre 20% e 50% ou mais. No Brasil, a prevalência da doença situa-se entre 50% e 80% (Pappas *et al.*, 2009).

No Município de Campos dos Goytacazes mostrou-se que em determinadas áreas, o consumo de água de rios/lagos contaminada pode ser uma importante forma de transmissão da doença (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003). Este estudo epidemiológico apontou altas prevalências em boa parte da população, principalmente nos indivíduos de baixa renda e que vivem sob condições de vida precárias (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003). A toxoplasmose em Campos dos Goytacazes é prevalente em 84% da população de baixa renda enquanto que nas populações de médio/baixo e médio/alto poder aquisitivo a prevalência é de 62% e 23% respectivamente (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003). Os principais fatores de risco para a infecção na população de baixa renda bem como para a de médio/baixo poder aquisitivo foram: a ingestão de água não filtrada assim como também água de poço ou ainda de rios ou lagoas. As curvas de prevalências mostram que na população de baixa, bem como de média/baixa renda na faixa de 0 a 9 anos o percentual de positividade está em torno de 60% (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003).

Em estudo anterior, Abreu avaliou a presença de anticorpos IgG anti-*T. gondii* (cistos teciduais) em neonatos e crianças no município de Campos dos Goytacazes e verificou-se que 40% dos bebês possuíam anticorpos específicos até o 5º mês de vida, já do 6º a 36º meses a prevalência de anticorpos

específicos cai 5% com relação ao período anterior, e posteriormente de 37º a 72º meses essa porcentagem passa a ser de 22% (Abreu, 2003).

Nesse mesmo estudo realizou-se, de abril de 1999 a abril de 2002, um rastreamento soroepidemiológico para toxoplasmose congênita através do teste do pezinho com 3478 exames em recém-natos, sendo detectados 26 testes positivos, dos quais 8 se confirmaram como casos de toxoplasmose congênita. No rastreamento soroepidemiológico para toxoplasmose congênita detectou-se a frequência de 0,74% de doença aguda na gestação e a prevalência de 1 caso de toxoplasmose congênita para 434,7 nascidos vivos (1/434) (Abreu, 2003). Esses dados mostraram uma maior prevalência da infecção congênita no município de Campos dos Goytacazes em comparação a outro trabalho no Brasil onde se encontrou a prevalência de 1 para cada 3000 nascidos vivos (Camargo-Neto 2000).

Em Belém foi realizado um estudo clínico epidemiológico de 1.629 pacientes referenciados para investigação laboratorial no Programa de toxoplasmose do Instituto Evandro Chagas (Bichara, 2001). Neste estudo os pacientes foram estratificados em cinco grupos de acordo com a forma clínica, e tiveram uma amostra de soro testada pela imunofluorescência indireta com pesquisa de anticorpos IgM e IgG. A soroprevalência geral encontrada foi 78%, assim distribuída: toxoplasmose na gravidez 80,8%, toxoplasmose linfadenítica/febril 72,3%, toxoplasmose ocular 90,3%, toxoplasmose e HIV 78,9% e toxoplasmose congênita 69,2% (Bichara, 2001). A maioria dos pacientes tinha de 15 a 24 anos e a soroprevalência aumentou com a idade observando-se ainda uma associação significativa entre sexo feminino e toxoplasmose, mesmo após exclusão das pacientes grávidas. O risco potencial para a infecção pelo *T. gondii* através do contato com gatos, cães e aves não foi importante, entretanto, houve associação significativa entre o hábito de comer carne crua ou malpassada e toxoplasmose. A distribuição da soroprevalência na área estudada foi homogênea, mostrando que a população está respondendo igualmente aos fatores de riscos (Bichara, 2001).

A infecção toxoplásmica em crianças apresenta prevalência mundial variando de 11% nos Estados Unidos (Jones *et al.*, 2007) até mais de 80% em

alguns locais no Brasil (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003). Essa prevalência pode estar associada a fatores culturais, socioeconômicos e ambientais. A infecção pode ser adquirida pela ingestão de cistos teciduais contendo bradizoítos presentes em carnes cruas ou malcozidas, pela ingestão de oocistos presentes em água, frutas, verduras contaminadas ou ainda pelo contato direto com as fezes do gato ou solo contaminado (Robert-Gangneux & Dardè 2012)

A relação entre o aumento da prevalência da toxoplasmose com o aumento da idade da população pode ser explicada pelo fato da infecção ser geralmente assintomática e muitos casos acabam por não ser identificados, provavelmente subestimando a real prevalência da doença (Boia *et al.*, 2008). Remington descreveu que se considerarmos taxas de soroconversão baseado nos riscos anuais de infecção de 10%, por exemplo, para crianças com 1 ano de idade que são soronegativas para a toxoplasmose, teremos nesse mesmo grupo uma probabilidade de prevalência de 0,865 quando elas completarem 20 anos de idade (Remington 2011). Nesse caso, conclui-se que quanto menor for o risco de infecção por ano maior será a chance de ocorrer a infecção adquirida em adultos jovens, inclusive entre mulheres em idade fértil se essa taxa de infecção for mantida constante.

Trabalhos presentes na literatura relatam prevalências entre crianças de 0 a 15 anos de idade que variam de 0% até 81% dependendo das questões socioeconômicas e culturais de cada região. As maiores prevalências encontram-se em países presentes entre os trópicos, como o Brasil, Etiópia, Gabão, São Tomé e Príncipe, Quênia, Bolívia e Venezuela, onde as prevalências variam de 29% podendo chegar até 81% (Paradisi *et al.*, 1989, Duong *et al.*, 1992, Chacin-Bonilla *et al.*, 2001, Boia *et al.*, 2008, Negash *et al.*, 2008, Fan *et al.*, 2012, Dubey *et al.*, 2012). Na faixa de 0 a 5 anos é onde encontramos as menores prevalências, porém em algumas áreas consegue-se encontrar prevalências de até 44% mostrando que determinadas populações se encontram constantemente expostas a infecção desde a infância (Ricciardi *et al.*, 1973, Paradisi *et al.*, 1989, Amendoeira *et al.*, 2003, Salahi-Moghaddam & Hafizi 2009).

#### 1.4. Fatores de risco para a toxoplasmose

Muitos fatores estão relacionados com a prevalência da infecção toxoplásmica em humanos. As regiões tropicais apresentam maior soroprevalência principalmente por possuírem clima ameno e úmido que favorece a sobrevivência dos oocistos no ambiente. Os hábitos de higiene e alimentares relacionados com as questões culturais ou socioeconômicas, como o consumo de carnes cruas, os tipos de carnes consumidas, hábitos de lavagem de verduras e frutas em geral, o tipo de água consumida (se tratada ou não tratada) e a exposição ao contato com solo contaminado com oocistos acabam influenciando a grande variabilidade da soroprevalência na população mundial.

A relação entre ter gatos e o aumento do risco de infecção pelo *T. gondii* já está bem descrita na literatura (Etheredge 1995, Rey & Ramalho 1999, Etheredge *et al.*, 2004, Lopes *et al.*, 2008, Sharif *et al.*, 2010, Dattoli *et al.*, 2011, Fan *et al.*, 2012, Khalil *et al.*, 2012). Os gatos apresentam um grande contato com seus donos e na maioria dos casos apresentam contato com o exterior da casa aumentando assim a oportunidade de adquirirem a infecção. Uma vez infectados, e os oocistos sendo então eliminados nas suas fezes contaminarão o ambiente do gato e conseqüentemente o interior da residência. Alguns estudos demonstraram que a maioria dos gatos apresentam o hábito de dormir com seus donos, inclusive com crianças (Chomel & Sun 2011).

Alguns estudos, principalmente na América Latina, sugerem que a infecção toxoplásmica está relacionada com o contato com o solo contaminado com oocistos. Ainda existem relatos da literatura de contaminação de reservatórios de água por fezes de felinos em surtos epidemiológicos (Bowie *et al.*, 1997, De Moura *et al.*, 2006). O problema maior encontra-se nas áreas onde a reprodução de gatos é grande pois gatos não imunes podem ser introduzidos na população continuamente fazendo com que haja uma eliminação constante de oocistos (Etheredge *et al.*, 2004).

Os oocistos de *T. gondii* são altamente resistentes a fatores diversos do ambiente, inclusive situações de congelamento (Jones & Dubey 2010). Os oocistos presentes na água não são eliminados com métodos químicos, como cloração, e dificilmente são eliminados com tratamentos físicos, como raios ultravioletas e por esse motivo, medidas preventivas devem ser tomadas como

não consumir água não tratada de rios, lagos, lagoas ou poços, mesmo quando em atividades recreativas (Jones & Dubey 2010).

Em muitos países a aquisição da toxoplasmose está relacionada com o aumento da idade, no entanto, essa relação pode variar bastante entre os países e, principalmente, se considerarmos o status socioeconômico da população. Estudos de epidemiologia da toxoplasmose relatam que crianças que vivem em condições precárias de higiene provavelmente se contaminarão com oocistos de *T. gondii*, principalmente na água que é usada tanto para consumo pela própria população ou por contato direto a água em outros locais (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003, Ertug *et al.*, 2005, Jones & Dubey 2010). A ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos têm sido considerado a mais importante forma de infecção na população de baixo poder econômico em alguns estudos (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003, Karanis *et al.*, 2007, 2013).

Existem poucos trabalhos na literatura que avaliam a relação entre a toxoplasmose adquirida na infância e a questão econômica como fator de risco para a aquisição da doença diretamente (Stagno & Thiermann 1973, Bahia-Oliveira *et al.*, 2003, Francisco *et al.*, 2006, Jones *et al.*, 2007, Liao *et al.*, 2009, Dattoli *et al.*, 2011) ou indiretamente (Rey & Ramalho 1999).

A questão socioeconômica como fator de risco não é avaliada como fator direto de infecção em alguns trabalhos, porém avaliam fatores de risco que estão relacionados com baixas condições sanitárias, como ausência de água encanada e/ou tratada, ausência de sistema de esgoto na residência, baixa escolaridade das mães, número alto de crianças na residência (Rey & Ramalho 1999, Etheredge *et al.*, 2004, Jones *et al.*, 2005, Dattoli *et al.*, 2011). No entanto alguns estudos não conseguem justificar a alta prevalência da toxoplasmose pelas vias de transmissão mais comuns, principalmente em populações que apresentam hábitos alimentares diferenciados (Amendoeira *et al.*, 2003).

## 1.5. IMUNIDADE CONTRA *Toxoplasma gondii*

### 1.5.1. RESPOSTA IMUNE MEDIADA POR CÉLULAS

Fatores como tamanho do inoculo, a virulência, o *background* genético, sexo, e estado imunológico parecem afetar diretamente o curso inicial da infecção toxoplásmica em humanos (Montoya & Liesenfeld 2004).

A Toxoplasmose em humanos é adquirida principalmente por ingestão oral de cistos teciduais presentes em carnes contaminadas e/ou oocistos provenientes de solo ou água contaminada (Kasper *et al.*, 2004). Uma vez ingerido, a parede do cisto/oocisto de *T. gondii* é digerida no intestino delgado, e então os taquizoítos infectam as células epiteliais, e se disseminam pelo hospedeiro, em particular, para o músculo e sistema nervoso central (Lambert & Barragan 2010).

O epitélio intestinal apresenta-se como uma barreira fisiológica e imunológica na detenção de micro-organismos e substâncias estranhas. O *Toxoplasma* tem desenvolvido muitas estratégias para não somente se ligar a estas células como também para invadir e se disseminar pelo epitélio (Buzoni-Gatel & Werts 2006). Os leucócitos polimorfonucleares (PMN), conhecidos como os primeiros tipos celulares a alcançarem um sítio de infecção, exercem sua atividade antimicrobiana através da fagocitose e inativação de patógenos usando seus mecanismos de citotoxicidade. Além disso, as PMNs produzem IL-12 e TNF- $\alpha$  bem como quimiocinas quando estimuladas por antígenos de *T. gondii* que induzem o recrutamento e ativação de macrófagos e células dendríticas (Cohen & Denkers 2015).

A infecção de células dendríticas ou macrófagos da lâmina própria pelo *T. gondii* induz uma série de eventos da resposta imune inata que leva ao processo de remoção do parasita (Buzoni-Gatel *et al.*, 2006) visto que, uma vez estimuladas estas células podem ser diretamente microbicidas e produtoras de citocinas como IL-12 e TNF- $\alpha$  (Buzoni-Gatel & Werts 2006). Estas citocinas agem em conjunto induzindo as células NK a secretarem IFN- $\gamma$ , que por sua vez intensifica a ativação de macrófagos infectados e ativam macrófagos não-infectados, estimulando o seu metabolismo oxidativo. Acredita-se que a ativação primária destas células seja de grande importância para o controle da rápida proliferação dos taquizoítos, visto que estas apresentam um mecanismo de



defesa ao parasita independente de células T, precedendo assim a ativação da imunidade específica (Filisetti & Candolfi 2004).

Para iniciar a resposta imune específica, a apresentação de antígenos é requerida. Os enterócitos podem trabalhar como células apresentadoras de antígenos (APCs) e promover a ativação dos linfócitos. No entanto, células dendríticas e macrófagos que infiltram o epitélio infectado também possuem o papel de células apresentadoras de antígenos para ativação de células T CD4+. As citocinas produzidas por enterócitos infectados e também por células dendríticas estimulam a ativação de células T, bem como de células T NK (NKT) e NK a secretarem IFN- $\gamma$ . Isto promove a liberação do *T. gondii* (Buzoni-Gatel & Werts 2006).

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> são peças importantes no jogo da resistência contra o *T. gondii* desenvolvida pelo hospedeiro. A resistência está fortemente relacionada com a resposta Th1, promovida por IFN- $\gamma$  e IL-12 produzidas pelas células da resposta imune inata. A ação combinada dessas citocinas e outros mecanismos imunológicos protegem o hospedeiro contra a rápida proliferação de taquizoítos e subseqüentes alterações patológicas (Montoya & Liesenfeld 2004). Além disso, o controle da infecção toxoplásmica resulta também da sinergia entre os linfócitos T CD4<sup>+</sup> e linfócitos T CD8<sup>+</sup> (Casciotti *et al.*, 2002).

Células T CD8<sup>+</sup> tanto de camundongos como de humanos secretam IFN- $\gamma$  e exibem *in vitro* citotoxicidade dirigida às células infectadas (Casciotti *et al.*, 2002). Células Th1 CD4<sup>+</sup> produzem IFN- $\gamma$  e IL-2, sendo IL-2, responsável pela ativação de células NK e células T as quais são citotóxicas para as células-alvo infectadas com o *T. gondii*. Células Th2 produzem IL-4, IL-5 e IL-10 que estão associadas à baixa regulação da resposta imune mediada por célula. Posteriormente, estes subgrupos de células T são capazes de regular cruzadamente as atividades uma das outras. Por exemplo, IL-10 inibe a produção de IFN- $\gamma$ , e este inibe a proliferação de células Th2 (Kasper *et al.*, 2004).

Portanto, uma grande variedade de citocinas é produzida em consequência da resposta imune do hospedeiro contra o *T. gondii*. Estas citocinas podem atuar no curso da infecção controlando tanto o crescimento dos parasitas, quanto a magnitude da resposta imune contra o mesmo. Assim, uma resposta imune

efetiva contra os parasitas pode se tornar lesiva para o hospedeiro gerando processos de autoagressão caso ela não seja devidamente balanceada (Kasper *et al.*, 2004).

### 1.5.2. RESPOSTA IMUNE HUMORAL

A resposta humoral em indivíduos imunocompetentes é caracterizada pela proliferação de linfócitos B que são ativados contra antígenos, sendo necessária a participação das células T CD4<sup>+</sup> Th2, através da produção de citocinas tais como IL-4. Estes linfócitos inicialmente produzem as imunoglobulinas da classe M (IgM) que podem ser detectados já na primeira semana após a infecção, atingindo título máximo por volta de 1 mês após a infecção, quando passam a declinar e, em geral, com variação individual, conseguem ser detectados após 1 ano, graças ao uso de técnicas altamente sensíveis (Filisetti & Candolfi 2004)(figura 2). Em alguns pacientes, os anticorpos IgM podem ser detectáveis entre 7 à 12 anos após a infecção aguda (Bobić *et al.*, 1991, Swanzy *et al.*, 1997, Meek *et al.*, 2001).

A produção das imunoglobulinas da classe G (IgG) pode ser detectada, dependendo do teste sorológico, dentro de 8 a 12 dias após a infecção inicial pelo *T. gondii*, atingindo sua concentração máxima entre 2 a 3 meses, quando então declinam até um ponto estável, mas continuarão positivos indefinidamente, durante toda a fase crônica da toxoplasmose (Robert-Gangneux & Dardé 2012) (figura 2). A imunoglobulina A (IgA) e a imunoglobulina E (IgE) são também detectados no soro dos indivíduos infectados pelo parasita. Ambos os anticorpos IgA e IgE anti-*T. gondii* têm valor diagnóstico para a fase aguda da infecção, assim como a IgM específica contra *T. gondii*. Na maioria dos casos, após a fase aguda quando o IgG continua alto e o IgM persiste (IgM residual), os anticorpos IgA e IgE desaparecem (entre 6 a 12 meses) e não são detectados durante a fase crônica da doença (Paul 1997, Ashburn *et al.*, 1998, Kodym *et al.*, 2007).

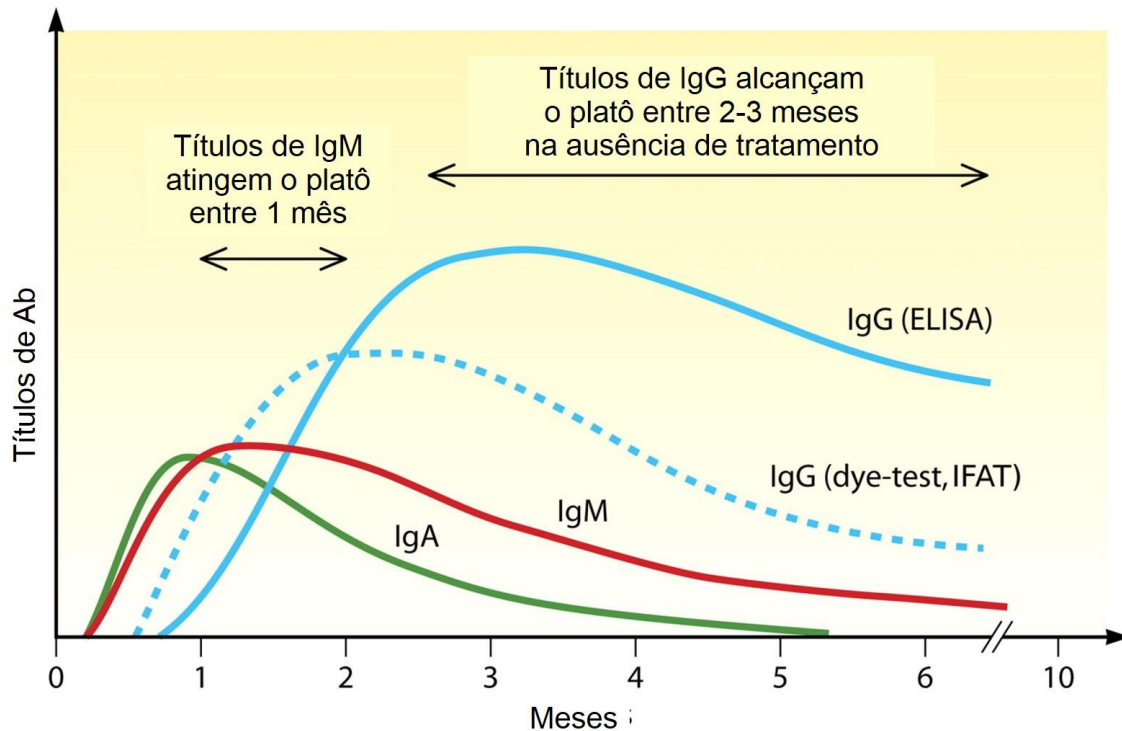


Figura 2: Cinética da resposta de anticorpos em indivíduos imunocompetentes. (Extraído e traduzido de Robert-Gangneux & Dardè, 2012)

Durante a fase aguda da toxoplasmose humana, inclusive na toxoplasmose congênita, a SAG1 ou P30, proteína majoritária presente na superfície do *T. gondii*, parece estar envolvida no ataque inicial do parasita às células hospedeiras (Mineo *et al.*, 1993, Wang & Yin 2014). Frequentemente anticorpos são produzidos contra esta e outras proteínas do *T. gondii* durante a infecção aguda e a detecção destes anticorpos, inclusive no feto e no neonato, representam a base para o diagnóstico sorológico da toxoplasmose (Mineo *et al.*, 1993). Anticorpos IgA anti-P30 são encontrados na maioria dos recém-natos após infecção congênita, e anticorpos IgE também estão presentes nos primeiros 2 meses de vida (Wang & Yin 2014), mas anticorpos IgM anti-P30 são encontrados em poucos casos (Wilson *et al.*, 2010). Isto demonstra que troca isotípica de IgM para IgA e IgE já acontece no útero. Como para a produção de anticorpos IgE é necessária a produção de IL-4 ou IL-13 pelas células T CD4<sup>+</sup> Th2 este fato sugere que as células T CD4<sup>+</sup> estejam também funcionando para esta finalidade no feto.

O sistema imune de mucosa dos neonatos está exposto a uma grande diversidade de micro-organismos, proteínas estranhas e componentes químicos e sua resistência a infecções dependem tanto dos fatores de proteção provenientes da mãe, incluindo o leite materno, quanto do desenvolvimento de sua própria imunidade (Field 2005). O sistema imune neonatal funciona diferente de um adulto. Ao nascer, seu sistema imune apresenta poucas ou nenhuma célula B produtora de IgA, tendo apenas células produtoras de IgM e IgG (Kelly & Coutts 2000). A imunidade de mucosa se desenvolve rapidamente no período pós-natal, conforme a criança entra em contato com antígenos microbianos e da dieta (Kelly & Coutts 2000, Hanson 2007), sendo esses anticorpos detectáveis entre 1 semana e 2 meses de vida (Ygberg & Nilsson 2012, Calder 2013).

Anticorpos já se encontram no soro de neonatos antes de qualquer contato com patógenos (Ygberg & Nilsson 2012). Os níveis de IgG total fetal são comparáveis aos níveis de IgG total maternos. Ao nascer, a habilidade de responder a proteínas antigênicas é alta e pouco menor a glicoproteínas e polissacarídeos. Essa habilidade de resposta cresce gradualmente de 6-9 meses de idade para as glicoproteínas e 12-24 meses para polissacarídeos (Ygberg & Nilsson 2012).

### **1.6. Diagnóstico**

Devido a toda complexidade existente com a apresentação de diversas formas clínicas faz com que o diagnóstico seja essencialmente importante e necessita de atualização constante (Candolfi *et al.*, 2007).

O diagnóstico sorológico para toxoplasmose é empregado com maior frequência do que outros métodos diagnósticos. Nesses testes são analisados os títulos de imunoglobulinas específicas contra o parasita. Os diagnósticos são realizados mais comumente através do ELISA, todavia o “dye test” (Sabin & Feldman 1948) é considerado método “padrão ouro” na Toxoplasmose.

Muitos métodos foram desenvolvidos nos últimos anos, no entanto, atualmente, a maioria dos laboratórios usam a técnica de ELISA para a rotina de detecção de anticorpos IgG e IgM específicos contra antígenos de taquizoítos enquanto que outras técnicas são realizadas em laboratórios de referência em

situações onde se necessita uma interpretação mais precisa dos resultados (Weiss & Dubey 2009)

A produção de anticorpos contra *T. gondii* começa entre 15 a 40 dias após a infecção. Uma a quatro semanas após a infecção ocorre o *switch* de isotipo e se inicia a produção de IgG anti-*T. gondii* (Sensini 2006). Em vigência de IgM específica negativa e em suspeita de infecção, investigam-se outros parâmetros para o diagnóstico de Toxoplasmose aguda, por exemplo, através da elevação do título de IgG após três semanas do diagnóstico inicial (Candolfi *et al.*, 2007). Deve-se saber que a análise de IgG isoladamente tem pouco valor diagnóstico para a fase aguda, mesmo que apresente alto título, podendo ser apenas indicativo de Toxoplasmose na fase crônica (Candolfi *et al.*, 2007). A análise de IgA anti-*T. gondii* pode ser outro critério de diagnóstico suplementar, podendo ser detectadas na fase aguda, concomitantemente ou não à IgM (Remington 2011).

Infecções de até três meses podem ser estimadas com parâmetro da avidéz de IgG associado aos níveis de IgM e IgA específicos contra o parasita (Contreras *et al.*, ). No recém-nascido, a resposta humoral pode auxiliar o diagnóstico, sendo muito importante, para este fim, o exame tanto do soro da criança como da mãe. Na presença de sinais clínicos sugestivos de toxoplasmose, altos títulos de anticorpos IgG no recém-nascido, aliados a um perfil materno de infecção recente tem alto valor preditivo positivo de toxoplasmose congênita, mas que deverá ser comprovado pela positividade, na criança, de teste para anticorpos IgM ou pela evidenciação do *T. gondii* (Jaisson-Hot *et al.*, 2001).

Os títulos de anticorpos IgG caem progressivamente, nos recém-nascidos não infectados, até negatização em prazos de poucos meses a um ano (Jaisson-Hot *et al.*, 2001). Porém, nos infectados estes títulos são permanentes ou ascendentes, com exceção dos casos de imaturidade imunológica, quando a criança com toxoplasmose não produz anticorpos, havendo queda dos títulos, podendo chegar a negatização por esgotamento dos anticorpos de transferência passiva, para se elevarem em seguida à medida do despertar da resposta humoral (Remington 2011).

O diagnóstico definitivo da toxoplasmose congênita nos recém-nascidos pode ser obtido a partir de: (1) Isolamento do parasita em camundongos inoculados com sangue periférico ou liquor do recém-nascido ou ainda de

placenta humana. *T. gondii* dificilmente pode ser demonstrado em sangue periférico após duas semanas de vida; (2) Presença de anticorpos específicos da classe IgM e/ou IgA ou persistência de anticorpos da classe IgG depois dos 12 meses de idade. A análise comparativa de IgG específicos no binômio mãe-filho auxilia no diagnóstico de infecção fetal particularmente quando IgM ou IgA não são detectados. A técnica de *Western Blot* apresenta-se como uma técnica importante aonde a comparação de bandas de proteínas podem indicar a presença da infecção em neonatos (Stroehle *et al.*, 2005).

Existem muitas técnicas que avaliam a presença de anticorpos na fase inicial da infecção como a quimioluminescência e ensaios imunoenzimáticos no entanto a maioria desses testes avaliam apenas uma pequena variedade de antígenos do parasita, muitos destes utilizando parasitas inteiros fixados, proteínas solubilizadas ou proteínas recombinantes de taquizoítos (Lass *et al.*, 2009). Além disso, existem poucos métodos que avaliem a presença de anticorpos contra diferentes fases do ciclo de vida do parasita (Hill *et al.*, 2011).

Do ponto de vista médico e epidemiológico o desenvolvimento de novas técnicas com maior sensibilidade e acurácia se fazem de suma importância. Estudos que utilizam proteínas recombinantes apresentam grande potencial diagnóstico (Buffolano *et al.*, 2005; Kotresha and Noordin, 2010; Hill *et al.*, 2011) além disso sendo mais específicos inclusive sendo capazes de determinar as possíveis fontes de infecção (Hill *et al.*, 2011, Santana *et al.*, 2015, Vieira *et al.*, 2015).

Hill e colaboradores em 2011 descreveram um método de diagnóstico com a identificação de anticorpos específicos contra uma proteína da fase esporozoíto (ocisto), a proteína TgERP, onde a presença de anticorpos é detectada em 6 a 8 meses após a infecção por ingestão de oocistos (Hill *et al.*, 2011) sendo um método de diagnóstico importante em estudos onde sabidamente existe uma forte tendência a fatores de risco para a infecção toxoplásmica pela ingestão de oocistos (Hill *et al.*, 2011). A ausência de testes diagnósticos que avaliem as possíveis fontes de infecção acaba por impedir que medidas de prevenção no sentido de intervenção por programas educacionais possam minimizar os riscos associados a toxoplasmose (Munoz-Zanzi *et al.*, 2010).

Outro ponto a ser discutido está no uso de amostras biológicas que apresentem a mesma sensibilidade e especificidade de resultados com que são produzidos nos testes atuais com amostras de soro dos pacientes. A saliva tem sido utilizada como fonte de anticorpos específicos, e principalmente para crianças, constitui-se como método não invasivo quando comparado a coleta de sangue (Chahed Bel-Ochi *et al.*, 2013).

Os anticorpos IgA juntamente com IgM e IgG contra antígenos derivados de formas taquizoíta de *T. gondii* são frequentemente detectados em soros de pacientes na fase precoce e crônica da toxoplasmose (Correa *et al.*, 2007). A presença de anticorpos IgG e IgA anti-*T. gondii* na saliva e outros fluidos corporais também tem sido relatada (Loyola *et al.*, 1997, Lynch *et al.*, 2009, Chahed Bel-Ochi *et al.*, 2013, Sampaio *et al.*, 2014, Oliveira *et al.*, 2015). No entanto, o papel específico de IgA contra *T. gondii* na cavidade oral humana permanece indefinida. O isolamento e/ou a detecção de *T. gondii* viável a partir da saliva humana, também tem sido relatada (Levi *et al.*, 1968, Amendoeira & Coutinho 1982, Loyola *et al.*, 1997), assim, a presença de IgA contra os antígenos de oocistos esporulados de *T. gondii* na saliva de doentes expostos ao risco de infecção pelo *T. gondii* é plausível e uma questão em aberto para investigação.

## II. JUSTIFICATIVA

A toxoplasmose é uma doença multifatorial e, por conseguinte o seu impacto sobre a saúde humana pode ser influenciado por fatores inerentes ao indivíduo, ao parasito, ao meio ambiente bem como pelo contexto social e cultural da população afetada. A infecção quando adquirida na vida intrauterina pode causar desde abortos até malformações neurológicas e/ou acometimentos visuais graves (Remington 2011). Em indivíduos imunocompetentes a infecção é geralmente assintomática, no entanto alguns indivíduos podem apresentar quadro de linfadenopatia ou ocorrência de lesão ocular (Remington *et al.*, 2004). No Brasil, estudos de base populacional em diferentes regiões mostram que o quadro de lesão ocular pode variar de 2,6-17,7%, em indivíduos de 10 a 50 anos de idade, podendo atingir valores ainda maiores, acima de 25% em indivíduos expostos a alto risco de infecção (Bahia-Oliveira *et al.*, 2012). Estima-se que 10 a 20% dos pacientes com infecção adquirida e que 70 a 90% dos pacientes com infecção congênita desenvolvem a doença ocular (Souza & Berlfort Jr 2014). Há ainda indícios de que a infecção crônica tenha relação com doenças mentais, em especial a esquizofrenia e alterações de comportamento (Flegr 2013a, b).

Dados epidemiológicos sobre a toxoplasmose no município de Campos dos Goytacazes, bem como em outros estudos realizados no Brasil (Petersen *et al.*, 2001, Bichara, 2001, Bahia-Oliveira *et al.*, 2003) evidenciam que a prevalência da infecção em crianças é menor do que se supunha, havendo a necessidade de se estudar em maiores detalhes a prevalência da infecção na infância principalmente em regiões onde se observa alta prevalência da toxoplasmose na população em geral

A toxoplasmose é considerada uma doença negligenciada da pobreza devido a sua associação com a população de baixo poder aquisitivo e pelas opções terapêuticas serem restritas, e não disponíveis universalmente nas áreas mais pobres do mundo. A questão socioeconômica em populações com baixo poder aquisitivo aumenta o risco de infecção pelo *T. gondii* devido à contaminação ambiental e de mananciais contaminados por oocistos de *T gondii* (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003, Cavalcante *et al.*, 2006, Aubert & Villena 2009). A ingestão de água não tratada e ou tratada inadequadamente tem sido associada tanto com a infecção



pelo parasita em áreas endêmicas (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003, Heukelbach *et al.*, 2007, Balasundaram *et al.*, 2010, Sroka *et al.*, 2010, Gallas-Lindemann *et al.*, 2013, Carellos *et al.*, 2014, Krueger *et al.*, 2014) quanto com muitos surtos epidemiológicos relacionados com o *T. gondii* (Benenson *et al.*, 1982, Bowie *et al.*, 1997, De Moura *et al.*, 2006, Karanis *et al.*, 2007).

Estudos epidemiológicos sobre a toxoplasmose que avaliem as fontes de infecção e fatores de risco relacionados com a doença são essenciais visto que a identificação desses parâmetros permite intervenções no nível da saúde pública. No entanto, poucos estudos publicados na literatura têm avaliado os fatores de risco que podem estar associados à doença adquirida em crianças.

Recentemente a investigação sobre o perfil sorológico de indivíduos infectados ou expostos à infecção toxoplásmica em relação às fontes de infecção (cistos teciduais ou oocistos) tem trazido nova luz à necessidade de se investigar a dimensão epidemiológica do modo de infecção pelo *T. gondii* em seres humanos. (Chen *et al.*, 2008; Hill *et al.*, 2011; Santana *et al.*, 2012; Vieira *et al.* 2015, Santana *et al.*, 2015, Bahia-Oliveira *et al.*, 2012). Digno de nota também são os estudos mostrando o diagnóstico e identificação diferencial de antígenos em casos de infecção congênita onde se compara os antígenos diferencialmente reconhecidos nas amostras de soro de neonatos juntamente com o de suas mães (Chumpitazi *et al.*, 1995; Nielsen *et al.*, 2005; Pinon *et al.*, 1996; Remington *et al.*, 1985; Robert-Gangneux *et al.*, 1999).

Neste contexto nos propusemos a investigar a prevalência da infecção toxoplásmica em binômio mãe-filho residente em áreas altamente endêmicas utilizando como critério de avaliação a presença de anticorpos específicos contra antígenos de diferentes fases de vida do *T. gondii*. Também será realizada investigação sobre possíveis fatores de risco que podem estar relacionados com a presença/ausência da infecção a população estudada.

### III. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Visando contribuir para o melhor entendimento sobre as vias e o modo de infecção pelo *T gondii* em crianças, tem-se como objetivo geral: investigar a presença de anticorpos contra antígenos das formas taquizoítas (Elisa convencional) e esporozoítas (Elisa anti-TgERP) em diferentes amostras de fluidos corporais de crianças, e em suas respectivas mães, residentes em duas áreas endêmicas para a toxoplasmose, Campos dos Goytacazes no estado do Rio de Janeiro e Belém no estado do Pará, e investigar os possíveis fatores de risco relacionados com a infecção toxoplásmica nestas populações.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- Investigar a soroprevalência da infecção pelo *T. gondii* em crianças, e suas respectivas mães, residentes nas cidades de Belém do Pará e Campos dos Goytacazes, utilizando métodos de diagnóstico sorológico convencional para a presença de anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii*;
- Avaliar a utilização do teste de ELISA anti-antígeno TgERP como metodologia para diagnóstico sorológico da infecção toxoplásmica;
- Apresentar a soroprevalência da infecção pelo *T. gondii* em crianças, e suas respectivas mães, residentes nas cidades de Belém e Campos dos Goytacazes, utilizando como métodos de diagnóstico a identificação de anticorpos IgG e IgA anti-TgERP pelo método de ELISA;
- Avaliar a presença de anticorpos anti-TgERP em amostras de saliva, leite materno e fezes de mães e crianças;
- Realizar análise preliminar dos possíveis fatores de risco relacionados com a presença da infecção toxoplásmica nos grupos de estudo relacionando estes fatores com a presença de anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii* (Elisa convencional) e anticorpos IgG e IgA anti-TgERP entre as mães e crianças residentes nessas áreas.

## IV. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Áreas de estudo

O estudo foi realizado em dois municípios distintos:

(1) **Campos dos Goytacazes**, localizado na região norte do Estado do Rio Janeiro, à aproximadamente 275 km da capital, uma cidade de clima tropical com temperatura máxima média de 29,4°C e com temperatura mínima média de 20,1°C e altitude de 13 metros sendo o maior município do interior do Estado, com uma área territorial de 4.027 Km<sup>2</sup> e uma população estimada em 2014 de 480.648 habitantes. O município possui quinze distritos: a sede que é o distrito de Campos dos Goytacazes, e mais os distritos de Santo Amaro de Campos, São Sebastião de Campos, Mussurepe, Travessão de Campos, Morangaba, Ibitioca, Dores de Macabu, Goitacazes, Morro do Coco, Santo Eduardo, Serrinha, Tocos, Santa Maria de Campos e Vila Nova de Campos (figura 3) (IBGE, 2014);

(2) **Belém**, localizado no norte do Estado do Pará, sendo a capital desse estado, é a segunda cidade mais populosa da Região Norte, a 11<sup>a</sup> do país, uma cidade de clima quente e úmido, tipicamente equatorial com influência direta da floresta amazônica, apresentando chuvas abundantes durante todo ano possuindo temperatura máxima média de 31,5°C e temperatura mínima média de 22,1°C com um índice pluviométrico de 2921,7 mm/ano. Possui uma área territorial de 1.059,5 Km<sup>2</sup> e uma população estimada em 2014 de 1.432.844 habitantes. A capital paraense possui oficialmente 68 bairros, distribuídos em 8 distritos administrativos: Distrito Administrativo de Belém (DABEL); Distrito Administrativo do Bengui (DABEN); Distrito Administrativo do Entroncamento (DAENT); Distrito Administrativo do Guamá (DAGUA); Distrito Administrativo de Icoaraci (DAICO); Distrito Administrativo de Mosqueiro (DAMOS); Distrito Administrativo de Outeiro (DAOUT); Distrito Administrativo da Sacramenta (DASAC) (figura 4) (IBGE, 2014);

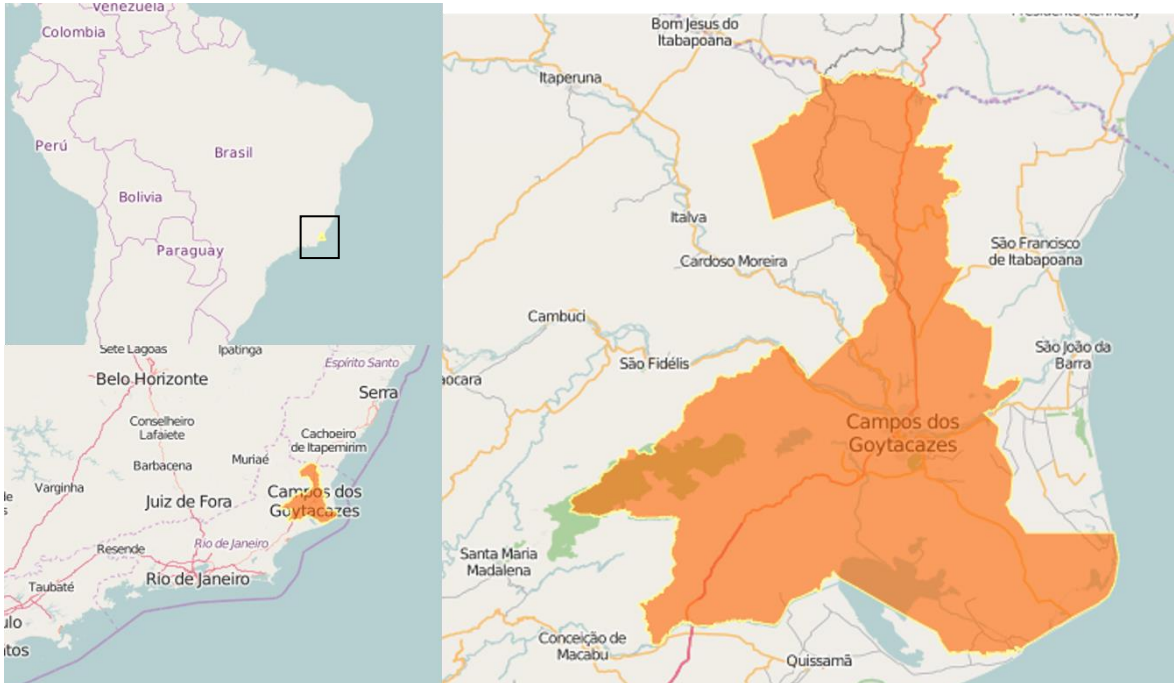


Figura 3: Mapa esquemático do município de Campos dos Goytacazes, no Estado do Rio de Janeiro, e seus distritos (extraído e modificado do Google Maps).

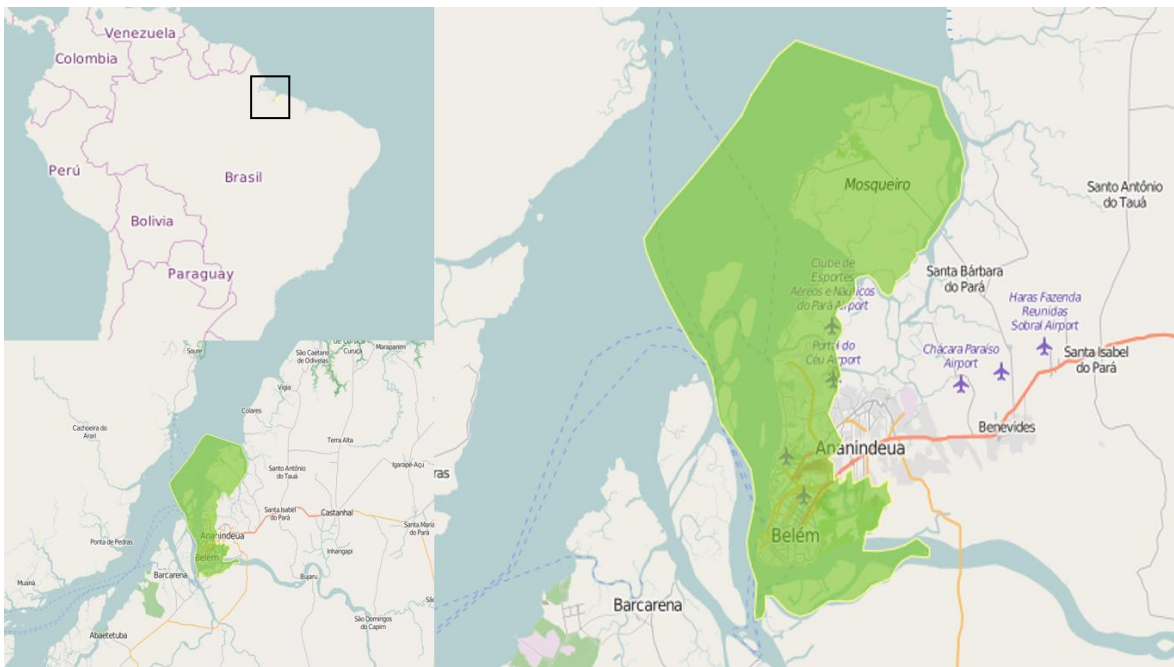


Figura 4: Mapa esquemático do município de Belém, no Estado do Pará, e seus distritos (extraído e modificado do Google Maps).

## 4.2. População a ser estudada

Os indivíduos participantes neste estudo, recém-nascidos e crianças e suas respectivas mães, são provenientes de comunidades carentes do município de Campos dos Goytacazes, no estado de Rio de Janeiro, e do município de Belém, no estado do Pará, áreas endêmicas para a toxoplasmose.

Um termo de consentimento livre esclarecido (Anexo A) foi entregue as mães que ao concordarem em participar do projeto, assinaram permitindo o uso das amostras de fezes, saliva e soro do (s) seu (s) filho (s). Após a explicação do projeto os indivíduos que aceitarem participar do estudo foi feita a coleta de sangue, saliva, fezes e leite materno da mãe e de sangue, saliva e fezes seu filho e responderam ao questionário de socioepidemiológico (Anexo B). O número de amostras coletadas nesse estudo encontra-se na tabela 1.

Tabela 1: Número de amostras coletadas para a avaliação da presença de anticorpos em cada uma das localidades.

		Amostras analisadas				
Localidade		Soro	Leite Materno	Saliva	Fezes	Total
<b>Belém</b>	Mães	125	50	**	74	249
	Crianças	125	–	**	90	215
<b>Campos dos Goytacazes</b>	Mães	123	*	80	36	239
	Crianças	123	–	77	39	239
<b>Total</b>		496	48	157	239	942

\*\* não foram coletadas amostras de saliva em Belém

\* não foram coletadas amostras de leite materno em Campos dos Goytacazes

#### **4.2.1. Seleção dos indivíduos em Belém**

Esse estudo foi resultado de uma colaboração da Santa Casa de Misericórdia de Belém do Pará e da Dra. Clea Carneiro Bichara (UEPA / UFPA / SCMPA) com o nosso grupo de pesquisa. Durante o mês de junho de 2011 foram realizadas as coletas de sangue das mães e seus respectivos filhos sendo os indivíduos selecionados no município em 4 diferentes fontes: (1) Doadoras de leite materno do PROAME da Santa Casa de Misericórdia; (2) Creche Frei Daniel localizada na comunidade no bairro Guamá; (3) Projeto Mães canguru da Santa Casa de Misericórdia; e (4) Maternidade da Santa Casa de Misericórdia. Após o consentimento, uma amostra de sangue foi coletada e o questionário de fator de risco foi aplicado. Foram coletadas amostras de leite materno, sangue e fezes das mães e de seus respectivos filhos, sendo mães com filhos com idades entre 0 a 4 anos de idade com exceção de alguns casos onde poderia haver irmãos onde o mais velho poderia chegar até 6 anos de idade. O número de indivíduos selecionados nesse estudo em Belém encontra-se na tabela 2.

#### **4.2.2. Seleção dos indivíduos em Campos dos Goytacazes**

Esse estudo resulta de uma colaboração nosso grupo de pesquisa e a Secretaria Municipal de Educação da Prefeitura Municipal de Campos dos Goytacazes. Durante o período de junho a agosto de 2013 foram realizadas visitas em escolas do município para coleta de sangue das mães e seus respectivos filhos. Os indivíduos selecionados em Campos foram provenientes de creches municipais presentes em 5 diferentes localidades: Farol de São Tomé, Baixa Grande, Parque Le Bret, Dolores de Macabu e Ibitioca. Após o consentimento, uma amostra de sangue foi coletada e o questionário de fator de risco foi aplicado. Foram coletadas amostras de sangue, saliva e fezes, sendo mães com filhos com idades entre 0 a 4 anos de idade com exceção de alguns casos onde poderia haver irmãos onde o mais velho poderia chegar até 6 anos de idade. O número de indivíduos selecionados nesse estudo em Campos encontra-se na tabela 2.

Tabela 2: Grupo de indivíduos envolvidos no estudo segundo a sorologia para a toxoplasmose, localidade e faixa etária.

Crianças	Faixa etária	Sorologia (nº de positivos)		Total de crianças	Total de crianças testadas	Faixa etária das mães (total)	Sorologia das mães (nº de positivos)		Total de mães	Total de mães testadas
		IgG anti <i>T. gondii</i>	IgM anti <i>T. gondii</i>				IgG anti <i>T. gondii</i>	IgM anti <i>T. gondii</i>		
BELÉM	0 a 6 meses	11	0	37	25	14 a 39 anos	19	0	37	25
	7 a 12 meses	1	0	21	15	16 a 35 anos	10	1	19	15
	13 a 24 meses	0	0	21	16	18 a 40 anos	13	1	19	16
	25 a 36 meses	1	1	19	16	17 a 28 anos	9	0	17	16
	37 a 48 meses	2	3	20	17	19 a 49 anos	10	0	18	17
	> 49 meses	0	0	7	7	20 a 26 anos	5	0	7	7
CAMPOS	0 a 6 meses	0	0	1	1	24 anos	0	0	1	1
	7 a 12 meses	0	0	7	5	21 a 27 anos	1	0	6	5
	13 a 24 meses	0	0	14	9	19 a 38 anos	6	0	13	9
	25 a 36 meses	1	2	37	28	18 a 40 anos	21	0	31	28
	37 a 48 meses	4	4	46	37	18 a 41 anos	27	3	39	37
	> 49 meses	3	0	18	16	20 a 41 anos	13	1	16	16
<b>Total</b>		<b>23</b>	<b>10</b>	<b>248</b>	<b>192</b>		<b>134</b>	<b>6</b>	<b>223</b>	<b>192</b>

### 4.3. Amostras de soro

Foram coletados 5 mililitros de sangue das mães participantes deste projeto e de seus filhos. O sangue dos indivíduos selecionados foi coletado por venopunção por meio do sistema de tubos à vácuo na ausência de anticoagulante e os tubos foram trazidos ao laboratório e centrifugados por 10 minutos a 602 g a 23°C (Microcentrífuga HERMLET Z 230 MA). O soro foi separado em tubos plásticos e congelado para posterior análise de imunoglobulinas.

### 4.4. Teste de quimioluminescência pra IgG e IgM anti-*T. gondii*

As avaliações de anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii* foram realizadas por meio da técnica de quimioluminescência pelo Prof. Dr. Eurico Camargo Neto. As análises foram feitas pela técnica de ELISA com a utilização do Kit diagnóstico Abbott ARCHITECT Toxo IgG e IgM, seguindo normas do fabricante.

### 4.5. Amostras de fezes e leite materno

As amostras de material fecal e leite foram coletados pelas mães, instruídas sobre os cuidados de higiene e sobre a conservação, em recipientes estéreis (Biotécnica) e sem conservantes, na manhã previamente marcada com as mães para a coleta. As amostras, sobre refrigeração, foram trazidas ao laboratório e processadas segundo descrito no item 4.5.1.

#### 4.5.1. Extração de imunoglobulinas de extratos fecais e do leite materno

A extração de imunoglobulinas a partir de extratos de amostras fecais e do leite materno foi padronizada em estudo anterior (Mangiavacchi 2006). O extrato final obtido no processo de precipitação foi dialisado contra PBS em membranas de diálise (SPECTRA/POR® *molecular porous membrane tubing* MWCO: 6-8.000; Spectrum Medical Industries Inc., Houston, TX, EUA) por, aproximadamente, três ciclos de 24 horas. Os sobrenadantes obtidos foram coletados e estocados à 4°C para posterior utilização.



#### 4.6. Amostras de Saliva

As amostras de saliva foram coletadas pelas técnicas de laboratório, tendo instruídas sobre os cuidados de higiene e sobre a conservação, em recipientes estéreis (Salivette®) e sem conservantes, no momento da coleta de sangue. As amostras, sob refrigeração, foram trazidas ao laboratório e processadas segundo as instruções do fabricante e posteriormente estocadas à 4°C para posterior utilização.

#### 4.7. Separação dos binômios mãe-filho

A partir dos resultados sorológicos e a presença de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, foram identificados binômios mãe-filho. Esses binômios foram então separados e identificados segundo a tabela de grupos encontrada abaixo.

Tabela 3: Separação dos binômios em grupos de estudo sorológico por faixa etária.

<b>Binômios</b>	<b>Total</b>	<b>Campos</b>	<b>Belém</b>	<b>Total de binômios</b>
Mãe (+) / Filho (+)	0-6 meses	11	0	11
	7-12 meses	0	0	0
	13-24 meses	0	0	0
	25-36 meses	3	2	1
	37-48 meses	6	4	2
	>49 meses	3	3	0
Mãe (+) / Filho (-)	0-6 meses	8	0	8
	7-12 meses	11	1	10
	13-24 meses	20	7	13
	25-36 meses	27	19	8
	37-48 meses	32	24	8
	>49 meses	15	10	5
Mãe (-) / Filho (-)	0-6 meses	7	1	6
	7-12 meses	8	4	4
	13-24 meses	5	2	3
	25-36 meses	13	7	6
	37-48 meses	15	9	6
	>49 meses	5	3	2
Mãe (-) / Filho (+)	0-6 meses	0	0	0
	7-12 meses	1	0	1
	13-24 meses	0	0	0
	25-36 meses	1	0	1
	37-48 meses	1	0	1
	>49 meses	0	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>192</b>	<b>96</b>	<b>96</b>	

#### **4.8. Detecção de Anticorpos IgG anti-TgERP nas amostras de soro, saliva, leite materno e fezes dos indivíduos por ELISA**

O teste de ELISA com antígeno TgERP foi realizado como descrito por Hill e colaboradores (Hill *et al.*, 2011). As placas de poliestireno de fundo chato (Corning) foram sensibilizadas com 100ul do antígeno TgERP (*Toxoplasma gondii* embryogenesis-related protein) diluído a 2ug/mL em tampão carbonato- bicarbonato 50mM, pH 9,6 e incubada a 4°C “overnight”. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem contendo 50mM Tris, pH 7.4, 150mM NaCl, 5% de leite desnatado e 1.0% de triton X-100. A seguir, as placas foram incubadas com 100ul/poço dos soros, saliva, leite ou fezes diluídas a 1:100, 1:10, 1:5 e 1:5, respectivamente, em tampão de lavagem, durante 30 min em temperatura ambiente. Após mais um ciclo de três lavagens como mencionado acima, adicionou-se às placas 100ul/poço de imunoglobulinas de coelho, anti-imunoglobulina G humana para os ensaios com soro e anti-imunoglobulina A humanas para os ensaios com saliva, leite e fezes, conjugada à peroxidase (KPL), diluída a 1:1000 em tampão de lavagem. As placas foram incubadas por 30 min em temperatura ambiente e, em seguida, lavadas novamente três vezes em solução de lavagem e incubadas com 100ul poço da solução reveladora. A leitura foi realizada em leitor de ELISA (Vmax ELISA reader), usando-se filtro de 405nm de comprimento de luz. O ponto de corte (*cut off*) do teste foi calculado pela média das amostras negativas acrescida de três vezes o desvio padrão (DP) dessas amostras.

#### **4.9. Questionário de fatores de risco para toxoplasmose**

As mães participantes do estudo responderam ao questionário de fatores de risco para a toxoplasmose (Anexo C) aplicado por alunos de graduação e pós-graduação previamente treinados e supervisionados pelos pesquisadores. As perguntas originaram da literatura e de questionários testados em estudos prévios (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003). O questionário continha 30 perguntas sobre risco de exposição a fatores conhecidos como risco para infecção pelo *T. gondii*. As variáveis do questionário incluem: idade, ocupação, local onde reside, número de pessoas residentes no domicílio, número de filhos, a presença de animais como gato, cachorro, aves ou outros animais na residência ou na vizinhança; frequência de

consumo e quais tipos de carne se alimenta; tipo de água usada na residência; presença de fossa; presença de poço. Além disso, as mães responderam perguntas referentes a seus filhos como idade, sexo, tipo de parto e tipo de alimentação.

#### 4.10. Análises estatísticas

As informações coletadas foram armazenadas e analisadas no programa *Epi-Info*, *Epi Info™* (versão 3.5.2), do CDC. Para a avaliação dos fatores de risco foi utilizado o programa GraphPad Prism 5 para as análises estatísticas univariadas e multivariadas. Foi utilizado o teste de qui-quadrado e o teste exato de Fisher para as análises univariadas onde foi definida a significância estatística com um nível de 5%, ou seja,  $p \leq 0,05$ . Com o objetivo de pesquisar a associação entre as diversas variáveis, foi calculada a força das associações mediante o cálculo do *odds ratio* e seus respectivos intervalos de confiança de 95%.

Para a avaliação sorológica foi realizada as análises estatísticas foram feitos no programa GraphPad Prism 5 utilizando o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn's com um intervalo de confiança de 95%.

Testes diagnósticos que produzem resultados em variáveis contínuas necessitam do estabelecimento de um ponto de corte (*cut off*), onde indivíduos que apresentarem valores menores ou iguais ao ponto de corte são considerados negativos e indivíduos que apresentarem valores maiores que o ponto de corte são considerados positivos. Assim, para cada um dos diferentes pontos de corte, dentro da amplitude de valores que o teste produz, podemos estimar a sensibilidade e a especificidade. Uma curva ROC (*Receiver Operator Curve*) é uma função contínua da Sensibilidade ( $S_e$ ) versus 1- Especificidade ( $1-E_s$ ), para os diversos pontos de corte obtidos dentro do espaço amostral (Martinez *et al.*, 2003). Foram construídas curvas ROC para cada teste realizado para as análises de anticorpos anti-TgERP em amostras de soro, saliva, leite e fezes.

A área sob a curva (AUC) ROC é uma medida resumo usual do desempenho de um teste, já que ela é estimada levando-se em consideração todas as sensibilidades e as especificidades de um teste. Essa medida é interpretada como a probabilidade de um indivíduo positivo ter um resultado de maior magnitude que um indivíduo negativo. Um teste totalmente incapaz de discriminar indivíduos negativos

e positivos possui AUC igual a 0,5. Quanto maior a capacidade do teste em discriminar os indivíduos em positivos e negativos, mais a curva se aproxima do canto superior esquerdo do gráfico e a AUC seria próxima de 1 (Martinez *et al.*, 2003).

Após a construção da curva ROC foi possível estabelecer um ponto de corte (*Cut off*). A escolha do *cut off* baseou-se em um ponto onde a especificidade e a sensibilidade estivessem com seus valores elevados, isto é, de forma que nenhum destes parâmetros fossem privilegiados. Após o estabelecimento do *cut off* foi possível calcular a razão de verossimilhança (RV). A RV expressa quantas vezes é mais provável encontrar um resultado positivo em pessoas doentes quando comparado com pessoas não doentes.

Foram calculadas as Razões de Verossimilhança para cada teste. A razão de Verossimilhança é definida como:

$$RV = \frac{\text{Positivos verdadeiros}}{\text{Falsos positivos}} \div \frac{\text{Positivos verdadeiros}}{\text{Falsos negativos}}$$

Tomou-se como:

- 1- Positivos verdadeiros: Indivíduos que foram considerados soropositivos segundo o teste de ELISA convencional.
- 2- Negativos verdadeiros: Indivíduos que foram considerados soronegativos segundo o teste de ELISA convencional.
- 3- Falsos positivos: Indivíduos soronegativos segundo o teste de ELISA convencional que apresentaram valores acima da linha de corte estabelecida para os testes de TgERP.
- 4- Falsos negativos: Indivíduos soropositivos segundo o teste de ELISA convencional que apresentaram valores abaixo da linha de corte estabelecida para os testes de TgERP.

## V. RESULTADOS

### 5.1. Avaliação da Situação de Infecção por *Toxoplasma gondii* em Crianças de 0 a 6 anos de Idade provenientes de Belém do Pará e Campos dos Goytacazes (RJ).

A seguir serão apresentados resultados referentes à prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* IgM e IgG em amostras de soro de crianças e suas mães, provenientes de ambas as localidades. Para verificar a presença de anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii* nos soros coletados dos 192 binômios mãe-filho provenientes de Belém do Pará e Campos dos Goytacazes foram realizados testes de ELISA utilizando kits comerciais conforme descrito em Material e Métodos.

#### 5.1.1. Detecção de anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii* por meio de kits convencionais em amostras de soro

A soroprevalência para a toxoplasmose entre as crianças foi de 23 amostras positivas das 192 amostras testadas em ambas as localidades. Quando avaliada as localidades individualmente, a presença de anticorpos IgG anti-*T. gondii* entre as crianças residentes em Belém foi de 15 amostras positivas em 96 testadas. As amostras foram provenientes de crianças de 0 a 50 meses de idade. Em Campos dos Goytacazes a presença de anticorpos IgG anti-*T. gondii* foi confirmada em 8 das 96 amostras testadas provenientes de crianças de 2 a 64 meses de idade. A presença de anticorpos IgM específicos foi confirmada em 5,2% das crianças das 192 testadas (10 indivíduos) sendo confirmada em 4 e 6 crianças em cada uma das localidades representando uma soroprevalência de 4,2% e 6,25%, respectivamente em Belém e Campos dos Goytacazes. Portanto a prevalência total estimada nesse estudo foi de 13,54%.

A presença de anticorpos IgG específicos foi confirmada em 134 das 192 amostras provenientes de mães de ambas as localidades avaliadas. A prevalência de amostras positivas para IgG anti-*T. gondii* variou entre 55% a 80% entre os grupos etários não apresentando significância estatística entre essa diferença observada. A presença de anticorpos IgM específicos foi encontrada em 6 amostras

das 192 avaliadas em ambas localidades (3,1%) (Figura 5). A soroprevalência estimada entre as mães foi de 70%.

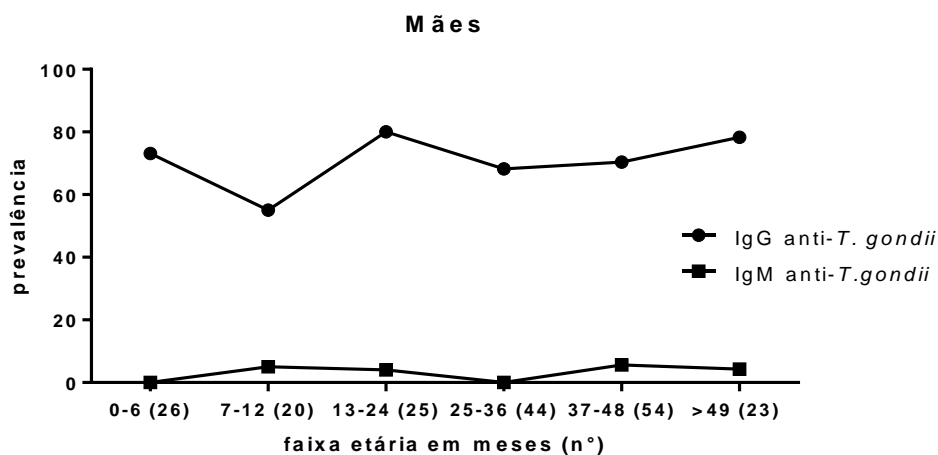


Figura 5: Prevalência de anticorpos IgG e IgM em 192 amostras de soro materno presentes no binômio mãe-filho dos municípios de Campos dos Goytacazes e Belém do Pará, sendo mães de crianças de 0 a 6 meses (26 indivíduos), 7 a 12 meses (20 indivíduos), 13 a 24 meses (25 indivíduos), 25 a 36 meses (44 indivíduos), 37 a 48 meses (54 indivíduos) e acima de 49 meses (23 indivíduos).

Foi observado que a prevalência cai gradativamente em crianças a partir do segundo mês de vida chegando a ser negativa do quinto ao trigésimo primeiro mês de idade (com exceção de uma única criança soropositiva com 7 meses de idade) (figura 6). A partir do 32º mês de vida observou-se o aumento na prevalência inclusive com a presença concomitante de anticorpos IgG e IgM específicos. Assim os nossos resultados apontam que a infecção toxoplásmica aumenta com a idade entre as crianças, bem como acontece entre adultos (figura 6).

Em Belém presença de crianças soropositivas para a toxoplasmose na faixa de 0 a 12 meses foi de 42,3%. Essa soropositividade não reflete em mesmo perfil quando avaliamos a presença de anticorpos IgM específicos (0%). Todas as crianças positivas entre 0 a 12 meses de idade possuem mães também soropositivas para a doença (anticorpos IgG anti-*T. gondii*) (figura 5).

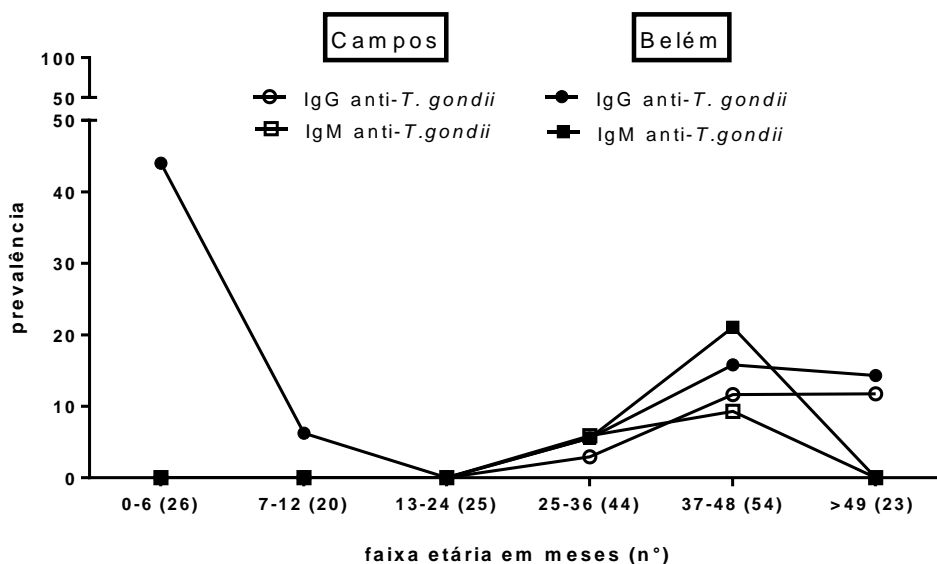


Figura 6: Prevalência de anticorpos IgG e IgM específicos anti-*T. gondii* em amostras de soro de crianças provenientes dos municípios de Campos dos Goytacazes e Belém sendo de 0 a 6 meses (26 indivíduos), 7 a 12 meses (20 indivíduos), 13 a 24 meses (25 indivíduos), 25 a 36 meses (44 indivíduos), 37 a 48 meses (54 indivíduos) e acima de 49 meses (23 indivíduos).

Para ambas localidades, no grupo de crianças de 0 a 6 meses (n=26) foram encontradas 10 crianças positivas para IgG anti-*T. gondii*. Das 10 crianças positivas, 5 tinham 0 meses (80%), 2 tinha 1 mês (100%), 1 tinha 2 meses (50%), 1 tinha 3 meses (50%) e 1 tinha 4 meses de vida (25%) (Tabela 4). As crianças que se encontravam no quinto e sexto mês de vida apresentavam-se soronegativas para a toxoplasmose (9 crianças). Todas as mães daquelas crianças que apresentaram IgG positiva, também apresentavam anticorpos IgGs específicos para a doença. Todas as outras crianças nesta faixa etária (16 crianças) rastreadas foram soronegativas na pesquisa de IgG anti-*T. gondii*. Avaliando a presença de anticorpos IgM dentro desse mesmo grupo de crianças não foi encontrada nenhuma criança com títulos desses anticorpos nas amostras de soro.

Já no grupo de crianças de 7 a 12 meses (n=20), foi encontrada 1 única criança positiva (5%) para IgG anti-*T. gondii*. Essa criança tinha 7 meses de vida. Todas as demais crianças presentes nesse grupo apresentavam-se soronegativas para a toxoplasmose. A mãe da criança soropositiva apresentou títulos de anticorpos IgM positivos (8,9UI/mL) para o parasita, no entanto não apresentou

títulos de IgG consideráveis (2,3UI/mL). Avaliando a presença de anticorpos IgM dentro desse mesmo grupo de crianças não foi encontrada nenhuma criança com títulos desses anticorpos nas amostras de soro (tabela 4).

No grupo de crianças de 13 a 24 meses (n=25) nenhuma criança apresentou anticorpos IgG ou IgM específicos para o parasita. Já no grupo de crianças de 25 a 36 meses (n=44), 2 crianças apresentaram anticorpos IgG anti-*T. gondii* (4,5%) sendo uma com 32 meses e outra com 35 meses de idade. A criança com 35 meses de idade também apresentava anticorpos IgM específicos para a doença (tabela 4).

Analisando a presença de anticorpos IgM específicos nesse grupo, 3 crianças (6,8%) apresentaram resultado positivo (tabela 4). O primeiro caso foi descrito acima, e os outros dois casos, uma criança de 29 meses e outra de 35 meses, apresentaram somente anticorpos IgM anti-*T. gondii*. Três mães também apresentaram resultados positivos para a presença de anticorpos IgG anti-*T. gondii* com exceção da mãe da criança de 35 meses que apresentava somente anticorpos IgM específicos.

No grupo de crianças de 37 a 48 meses (n=54), 6 crianças apresentaram anticorpos IgG específicos contra o parasito (11,1%), 1 de 39 meses (16,7%), 1 de 40 meses (33,3%), 1 de 43 meses (12,5%), 1 de 44 meses (16,75), 1 de 47 meses (11,15), 1 de 48 meses (16,7%) (tabela 1). Todas as mães dessas crianças também apresentaram anticorpos IgG específicos para toxoplasmose. Sobre a presença de anticorpos IgM, 7 crianças apresentaram resultados positivos (13%), sendo 6 crianças que também apresentavam anticorpos IgG e mais 1 criança que apresentou somente essa classe de anticorpo (tabela 4).

No grupo de crianças com idade acima de 49 meses (n=23), foram identificadas 3 crianças (13%) que apresentaram anticorpos IgG anti-*T. gondii*, 1 com 58 meses (20%), 1 com 59 meses (33,3%) e 1 com 64 meses (100%) de idade. Todas as mães dessas crianças também eram positivas para a doença (IgG positivas) (tabela 4). Não foi identificada nenhuma criança nessa faixa apresentando anticorpos IgM específicos contra a doença.



Tabela 4: Prevalência de anticorpos IgG e IgM específicos anti-*T. gondii* em amostras de soro de crianças provenientes dos municípios de Campos dos Goytacazes e Belém separados por faixa etária.

Faixa etária (nº)	Idade da criança com presença de anticorpos IgG anti- <i>T. gondii</i> (nº de positivos/nº total)	Idade da criança com presença de anticorpos IgM anti- <i>T. gondii</i> (nº de positivos/nº total)
0-6 meses (26)	0 meses (5/6)	(0/26)
	1 mês (2/2)	
	2 meses (1/2)	
	3 meses (1/2)	
	4 meses (1/5)	
7-12 meses (20)	7 meses (1/4)	(0/20)
13-24 meses (25)	(0/25)	(0/25)
25-36 meses (44)	32 meses (1/4)	29 meses (1/4)
	35 meses (1/6)	35 meses (2/6)
37-48 meses (54)	39 meses (1/6)	39 meses (1/6)
	40 meses (1/3)	40 meses (1/3)
	43 meses (1/8)	43 meses (1/8)
	44 meses (1/6)	44 meses (1/6)
	47 meses (1/9)	47 meses (2/9)
	48 meses (1/6)	48 meses (1/6)
>49 meses (23)	58 meses (1/5)	(0/23)
	59 meses (1/3)	
	64 meses (1/1)	

## 5.2. Cálculo de Especificidade e Sensibilidade e aplicação de curvas ROC para os testes ELISA utilizando o antígeno TgERP.

Curvas ROC foram construídas para cada um dos testes realizados utilizando como o padrão ouro o teste de ELISA para a análise de IgG anti-*T. gondii*. A construção das curvas ROC possibilita a definição de pontos de corte para cada teste. O estabelecimento de cada ponto de corte baseou-se na escolha de valores onde tanto a sensibilidade quanto a especificidade estivessem altas. Após a definição dos pontos de corte foi possível calcular a Razão de Verossimilhança (RV) para cada teste.

Avaliando os testes de ELISA IgG anti-TgERP em amostras de soro de crianças residentes em Campos dos Goytacazes apresentaram os melhores resultados com o *cut off* 0,252 (AUC=0,8572) com Sensibilidade de 100% e Especificidade de 75% e RV+ 4.000 (figura 7). Para a análise de IgA anti-TgERP em amostras de saliva de crianças foi selecionado um *cut off* de 0,060 (AUC=0,7392) com Sensibilidade de 75% e Especificidade de 62,07% e RV+ 1.977 (Figura 8).

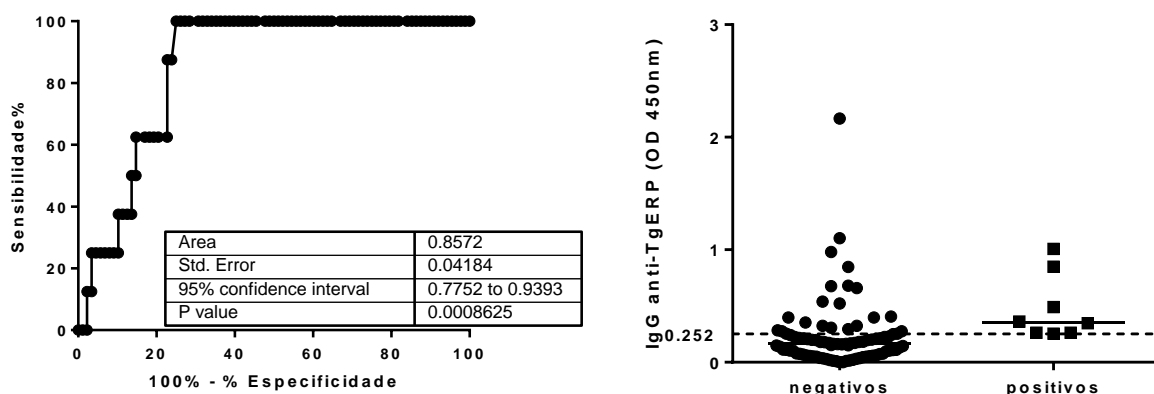


Figura 7: Análise da curva ROC para estabelecimento do valor de *cut off* capaz de discriminar entre os níveis sérico de IgG anti-TgERP em crianças soropositivas e soronegativas para a toxoplasmose. Gráfico de dispersão representando os valores de Densidade Óptica (DO). Linha tracejada representa o valor de *cut off* determinado pela curva ROC. Diluição do soro 1:100.

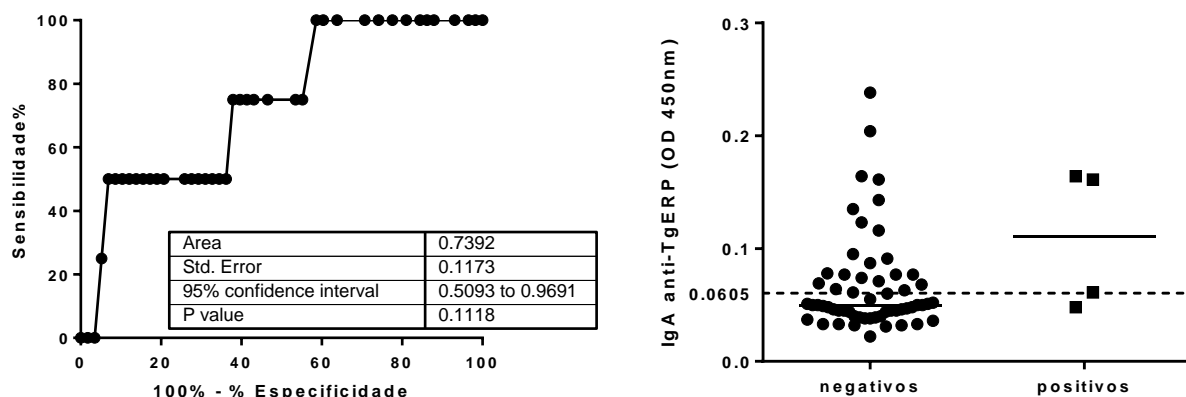


Figura 8: Análise da curva ROC para estabelecimento do valor de *cut off* capaz de discriminar entre os níveis salivares de IgA anti-TgERP em crianças soropositivas e soronegativas para a toxoplasmose. Gráfico de dispersão representando os valores de Densidade Óptica (DO). Linha tracejada representa o valor de *cut off* determinado pela curva ROC. Diluição da saliva 1:5.

Avaliando os testes de ELISA IgG anti-TgERP em amostras de soro das mães residentes em Campos dos Goytacazes, estes apresentaram resultados de valores de AUC de 0,8505. Utilizando um *cut off* 0,460, o teste apresenta Sensibilidade de 82,06% e Especificidade de 77,08% e RV+ 3.078 (figura 9). Para a análise de IgA anti-TgERP em amostras de saliva dessas mães o *cut off* selecionado foi de 0,188 (AUC=0,8638) e apresentou Sensibilidade de 82,61% e Especificidade de 84,21% e RV+ 5.232 (Figura 10).

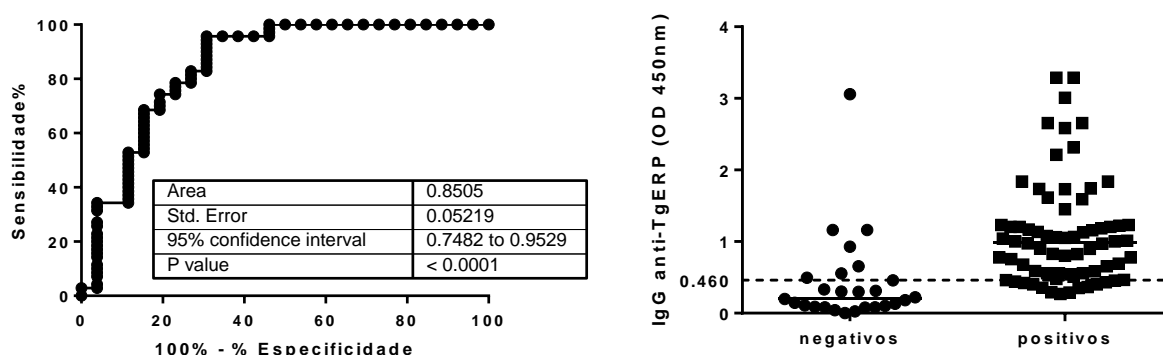


Figura 9: Análise da curva ROC para estabelecimento do valor de *cut off* capaz de discriminar entre os níveis sérico de IgG anti-TgERP em mães soropositivas e soronegativas para a toxoplasmose. Gráfico de dispersão representando os valores de Densidade Ótica (DO) Linha tracejada representa o valor de *cut off* determinado pela curva ROC. Diluição do soro 1:100.

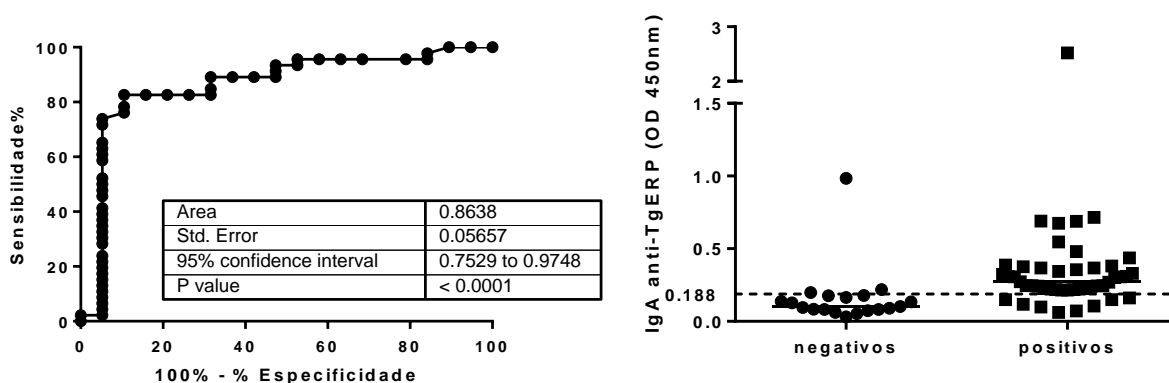


Figura 10: Análise da curva ROC para estabelecimento do valor de *cut off* capaz de discriminar entre os níveis salivares de IgA anti-TgERP em mães soropositivas e soronegativas para a toxoplasmose. Gráfico de dispersão representando os valores de Densidade Ótica (DO). Linha tracejada representa o valor de *cut off* determinado pela curva ROC. Diluição da saliva 1:5.

Avaliando os testes de ELISA anti-TgERP em amostras de fezes de crianças e fezes e leite materno de mães, estes apresentaram resultados de AUC de 0,5089, 0,5830 e 0,6538, valores considerados baixos para o teste. Na tabela 5 encontra-se o resumo de todos os valores das análises de curva ROC realizados nesse estudo mostrando os *cut offs*, valores de sensibilidade e especificidade e razão de verossimilhança para todas as amostras.

Tabela 5: Valores de Especificidade, Sensibilidade e Razão de Verossimilhança para os testes com amostras de soro, saliva, leite materno e fezes utilizando antígenos TgERP.

	<b>Cut off</b>	<b>AUC</b>	<b>Se%</b>	<b>95% CI</b>	<b>Es%</b>	<b>95% CI</b>	<b>RV</b>
<b>Amostras de crianças</b>							
Soro TgERP	> 0.2525	0.8572	100.0	63.06-100.0	75.00	64.63-83.62	4.000
Saliva TgERP	> 0.0605	0.7392	75.00	19.41-99.37	62.07	48.37-74.49	1.977
Fezes TgERP	> 0.0515	0.5089	66.67	9.430-99.16	61.33	49.38-72.36	1.724
<b>Amostras de mães</b>							
Soro TgERP	> 0.4600	0.8505	82.86	71.97-90.82	73.08	52.21-88.43	3.078
Saliva TgERP	> 0.1885	0.8638	82.61	68.58-92.18	84.21	60.42-96.62	5.232
Leite TgERP	> 0.1040	0.6538	73.08	52.21-88.43	66.67	22.28-95.67	2.192
Fezes TgERP	> 0.0395	0.5830	55.10	40.23-69.33	55.17	35.69-73.55	1.229

Área sob a curva (AUC), Especificidade (Es), Sensibilidade (Se), Razão de verossimilhança (RV).

Assim, com a determinação dos valores de *cut off* pela curva ROC, foi estimada a prevalência de anticorpos específicos anti-TgERP na população estudada considerando dois critérios: o *cut off* dado pela curva ROC e o *cut off* utilizando o desvio padrão. Assim a soroprevalência encontrada pelo ELISA anti-*T. gondii* (IgG e IgM) na população estudada pode ser comparada a prevalência de anticorpos IgG e IgA anti-TgERP entre crianças (figura 11A) e mães (figura 11B) separados por faixa etária.

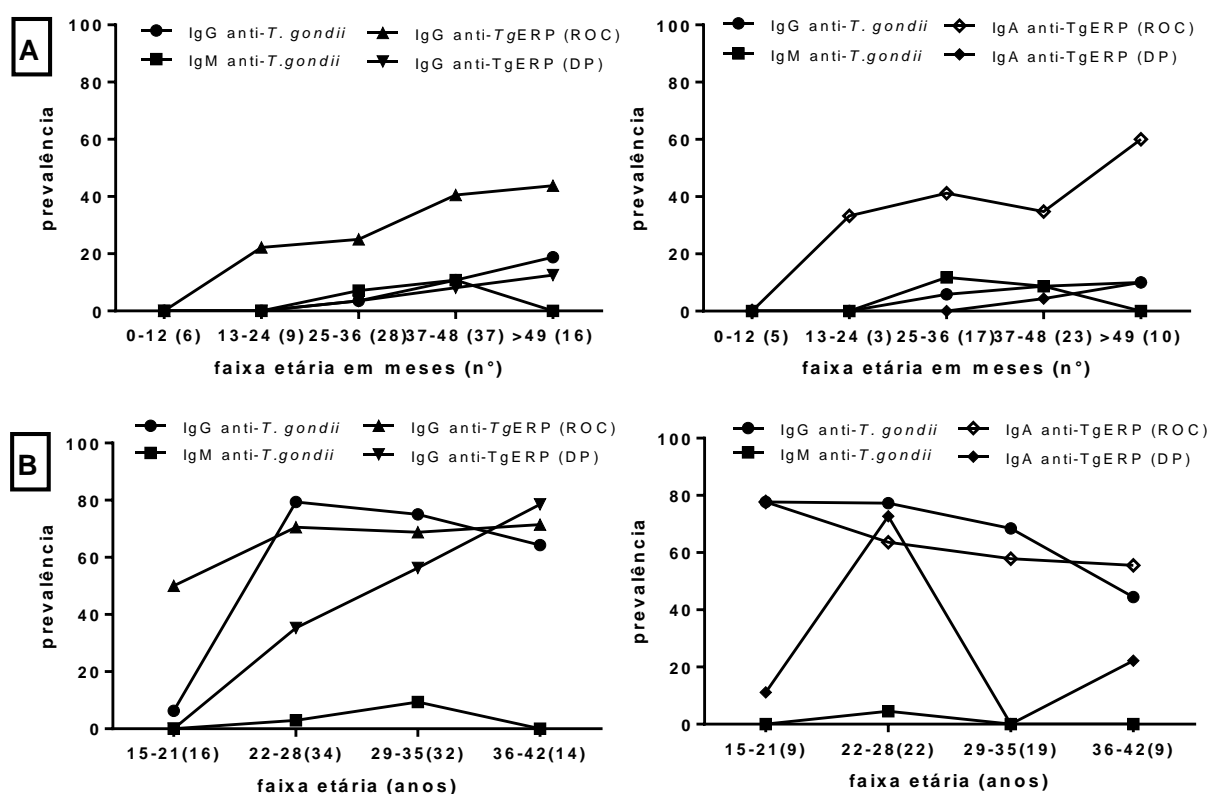


Figura 11: Curvas de prevalência para a toxoplasmose de acordo com o teste de ELISA convencional e ELISA TgERP para amostras de binômio mãe-filho residente em Campos dos Goytacazes. Dados expressos em porcentagem para todas as curvas. Soroprevalência de acordo com a idade nas amostras de soro pela análise de IgG anti- *T. gondii* pelo método de ELISA convencional (anti-P30) (●), IgM anti- *T. gondii* pelo método de ELISA convencional (anti-P30) (■), IgG anti- TgERP curva ROC (▲), IgG anti- TgERP Desvio Padrão (DP) (▼), e de acordo com a idade nas amostras de saliva pela análise de IgA anti-TgERP curva ROC (◇) e IgA anti- TgERP Desvio Padrão (DP) (◆). O Panel A representa os resultados nas amostras de crianças e o Panel B representa os resultados nas amostras de mães.

Verificamos que a prevalência calculada pela presença de anticorpos IgG e IgA anti-TgERP pela curva ROC em crianças parece crescente, enquanto que entre as mães essa prevalência varia muito pouco para ambos anticorpos (de 50 a 77%) (figura 11B). O valor de *cut off* estabelecido pela curva ROC foi abaixo da sensibilidade técnica do ELISA convencional entre as amostras de crianças (OD=0,832 para IgG; OD=0,200 para IgA).

### **5.3. Avaliação dos níveis de imunoglobulinas antígeno específicos em amostras de fluidos corporais de binômio mãe-filho**

A seguir serão apresentados resultados de níveis de imunoglobulinas específicas IgG, IgM e IgA referentes a amostras de soro, saliva, fezes e leite materno. Dois tipos de antígenos foram utilizados nesse estudo com intuito de avaliar as possíveis fontes de infecção nesses indivíduos. No total 192 binômios mãe-filho, provenientes de Campos dos Goytacazes e Belém do Pará, foram avaliados, primeiramente quanto a presença de anticorpos específicos contra antígenos de taquizoítos utilizando amostras de soro e depois antígeno de esporozoíto utilizando amostras de soro, saliva, fezes e leite materno.

#### **5.3.1. Detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em amostras de soro de binômio mãe-filho por ELISA convencional**

Os resultados dos níveis de anticorpos foram expressos em unidades por mililitros (UI/mL) para anticorpos IgG e em Index para anticorpos IgM. A partir do segundo ano de vida observa-se significativa entre a presença de anticorpos IgG e IgM específicos e o aumento da idade ( $p= 0,0179$  e  $p < 0,0001$ , respectivamente) (figura 12A). A presença de IgG maternos específicos anti-*T gondii* não apresenta relação direta com a presença de IgGs nos respectivos filhos, os níveis de anticorpos IgM específicos em mães apresentam significância ( $p < 0,0001$ ) para aquelas crianças com mais de 2 anos de vida (figura12).

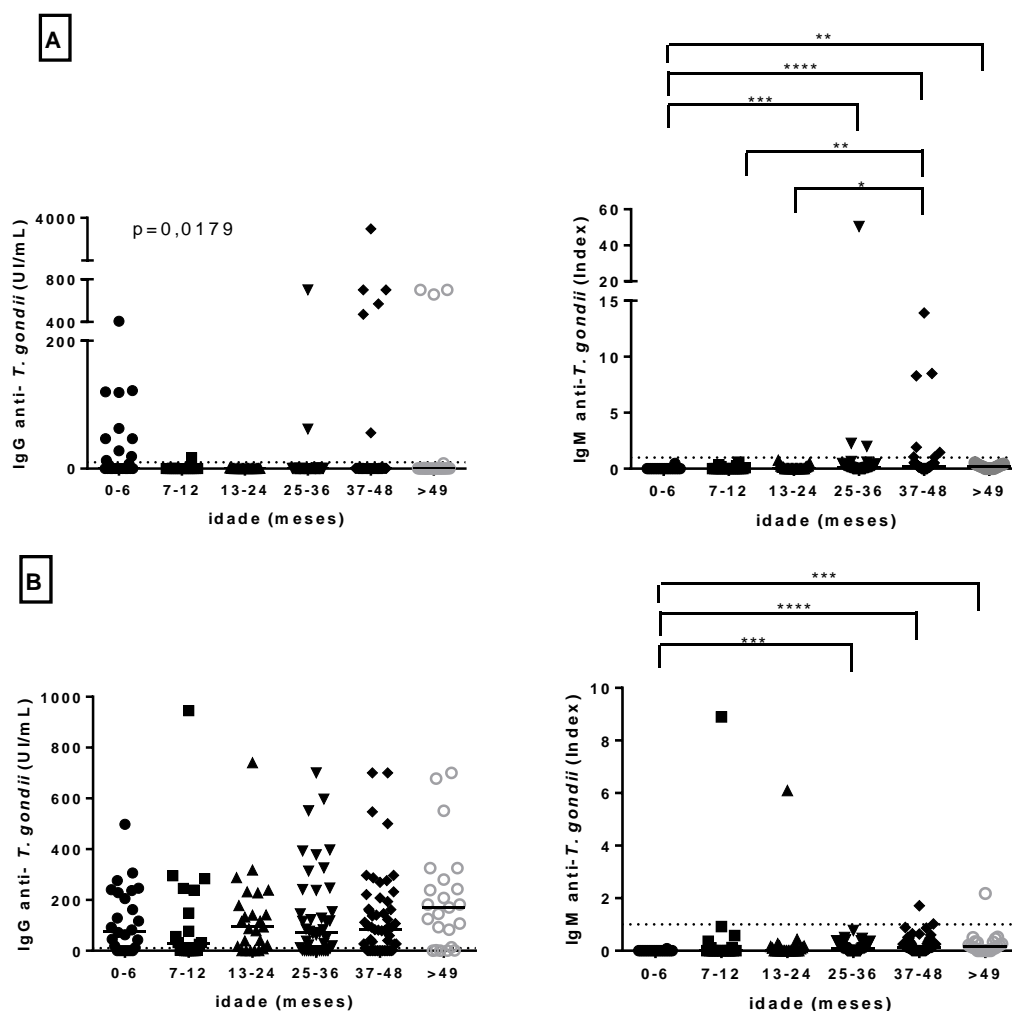


Figura 12: Detecção de IgG e IgM por ELISA convencional de acordo com a faixa etária das crianças e suas respectivas mães residentes no município de Campos dos Goytacazes e Belém. Painel A: Níveis de anticorpos IgG e IgM específicos em crianças separados por faixa etária em meses. Painel B: Níveis de anticorpos IgG e IgM específicos em mães. Barras representam a mediana dos resultados obtidos para cada grupo. Diluição do soro 1:100. Testes estatísticos de Kruskal-Wallis seguido de Dunns. \* Significa  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*\*\*  $P < 0,0001$ . Linha tracejada representa o valor de *cut off* para o teste de ELISA convencional.

### 5.3.2. Detecção de imunoglobulinas específicas para antígenos de Esporozoítos (anti-TgERP) em amostras de soro de binômios mãe-filho por ELISA

Amostras de soro de 96 binômios mãe-filho provenientes de Campos dos Goytacazes foram avaliados níveis de anticorpos específicos para antígeno de

esporozoítos (TgERP). Os resultados dessa análise foram expressos em Densidade Óptica (OD)(figura 13).

Não foi encontrada diferença estatística entre os níveis de anticorpos IgG anti-TgERP nas amostras de soros de crianças, no entanto entre as mães verificamos uma diferença significativa conforme as faixas etárias ( $p=0,0318$ ) (figura 13).

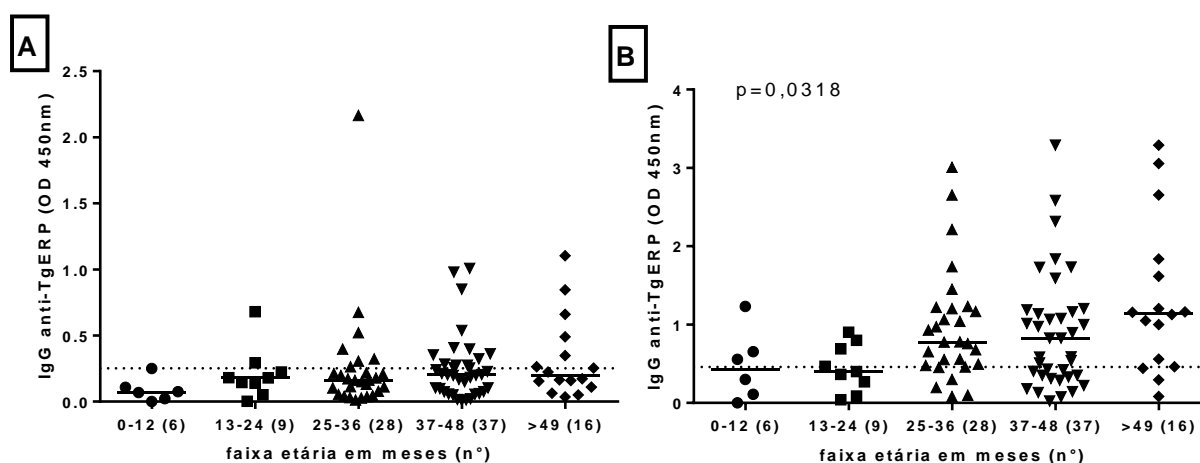


Figura 13: Detecção de IgG por ELISA anti-TgERP em soro de acordo com a faixa etária das crianças residentes no município de Campos dos Goytacazes. Painel A: Níveis de anticorpos IgG específicos em crianças separados por faixa etária em meses. Painel B: Níveis de anticorpos IgG específicos em mães. Barras representam a mediana da dosagem obtida para cada grupo. Diluição do soro 1:100. Testes estatísticos de Kruskal-Wallis seguido de Dunns. Linha tracejada representa o valor de *cut off* para o teste de ELISA TgERP determinado pela curva ROC.

### 5.3.3. Detecção de imunoglobulinas específicas para antígenos de Esporozoítos (anti-TgERP) em amostras de saliva de binômio mãe-filho por ELISA

Foram coletadas amostras de saliva de 58 binômios mãe-filho residente em Campos dos Goytacazes. Na figura 14 mostra os níveis de IgA anti-TgERP encontrados nas amostras. Não foi encontrada diferença estatística entre os níveis de anticorpos IgA anti-TgERP nas amostras de saliva de crianças, porém as mães das crianças com mais de 49 meses apresentaram níveis de anticorpos



significativamente maiores que as mães de crianças de 0-12 meses de idade ( $p < 0,05$ ) (figura 14).

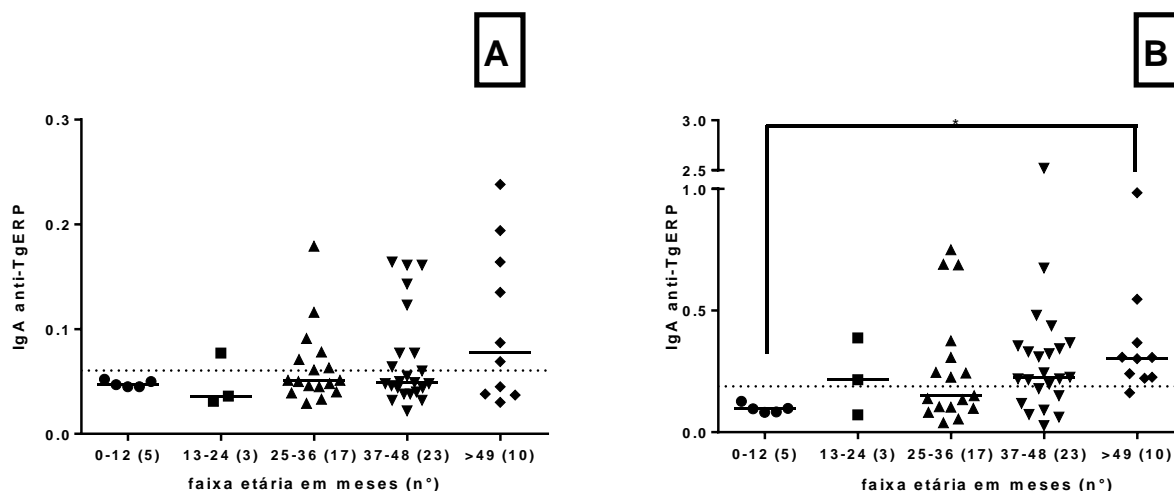


Figura 14: Detecção de IgA por ELISA anti-TgERP de acordo com a faixa etária das crianças residentes no município de Campos dos Goytacazes. Painei A: Níveis de anticorpos IgA específicos em amostras de saliva de crianças separados por faixa etária em meses. Painei B: Níveis de anticorpos IgA específicos em amostras de saliva de mães. Diluição da saliva 1:10. Testes estatísticos de Kruskal-Wallis seguido de Dunns. \* Significa  $P < 0,05$ . Linha tracejada representa o valor de *cut off* para o teste de ELISA TgERP determinado pela curva ROC.

#### 5.3.4. Detecção de imunoglobulinas específicas para antígenos de Esporozoítos (anti-TgERP) em amostras de leite materno e fezes de binômios mãe-filho por ELISA

Foram coletadas amostras de leite materno de 32 mães residentes em Belém e de fezes de 78 binômios mãe filho residentes em ambas localidades desse estudo. Na figura 15 mostra os níveis de IgA anti-TgERP encontrados nas amostras. Não foi encontrada diferença estatística entre os níveis de anticorpos IgA anti-TgERP tanto nas amostras de leite materno quanto de fezes das mães, no entanto nas amostras de fezes de crianças foi encontrada diferença estatística entre as faixas etárias ( $p=0,0378$ ) (figura 15).

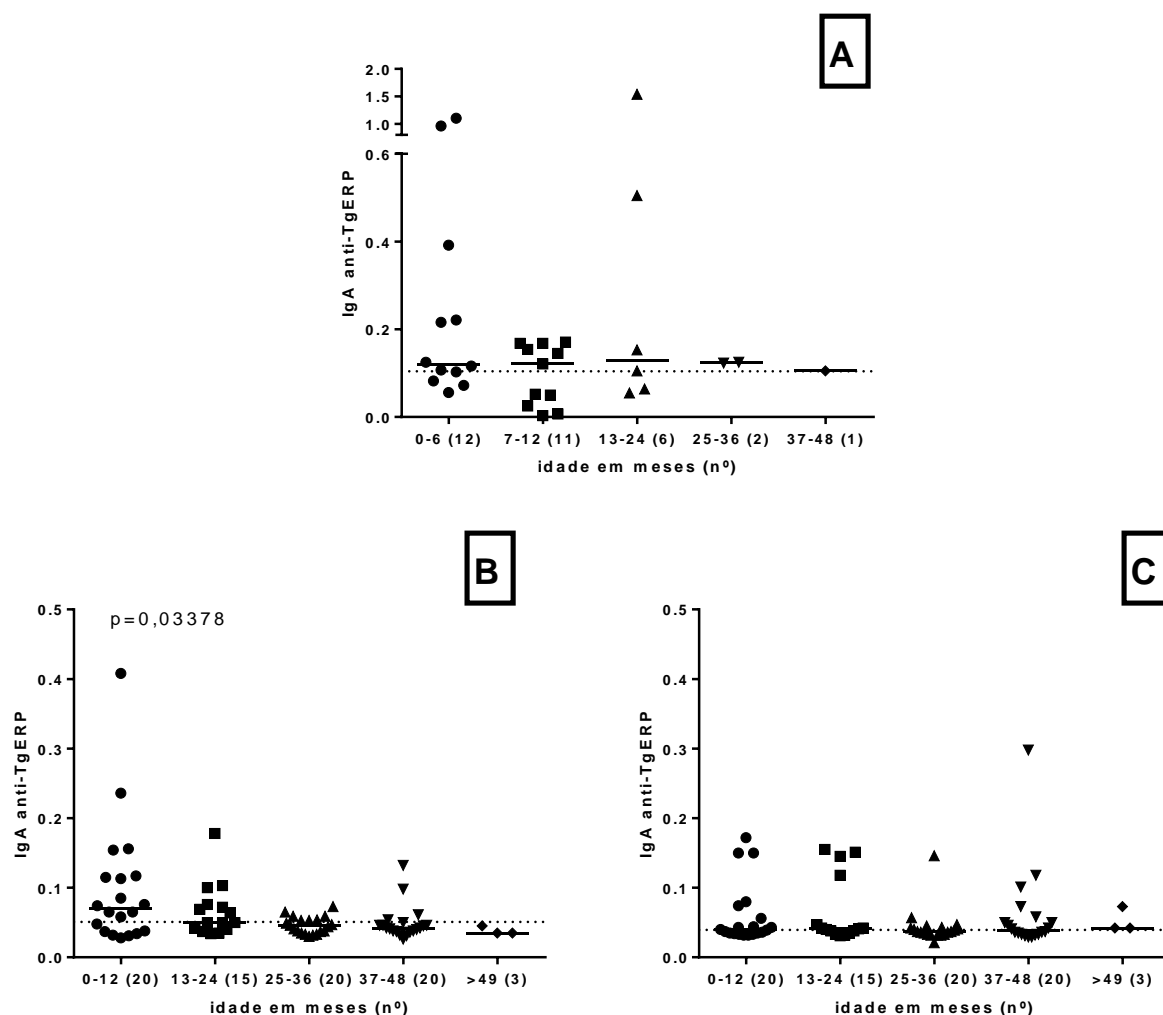


Figura 15: Detecção de IgA por ELISA anti-TgERP em amostras de fezes e leite materno de acordo com a faixa etária das crianças residentes nos municípios de Campos dos Goytacazes e Belém. Painel A: Níveis de anticorpos IgA específicos em amostras de leite materno de mães residentes em Belém. Painel B: Níveis de anticorpos IgA específicos em amostras de fezes de crianças residentes em campos dos Goytacazes e Belém separadas por faixa etária. Painel C: Níveis de anticorpos IgA específicos em amostras de fezes de mães residentes em Campos dos Goytacazes e Belém. Barras representam a mediana dos resultados para cada grupo. Diluição das fezes 1:5, leite materno 1:5. Testes estatísticos de Kruskal-Wallis seguido de Dunns. Linha tracejada representa o valor de *cut off* para o teste de ELISA TgERP determinado pela curva ROC.

#### 5.4 Correlação entre os níveis de imunoglobulinas antígeno específicas em amostras de fluidos corporais de binômio mãe-filho

Análises de correlação entre os níveis de imunoglobulinas antígeno específicas, anti-*T. gondii* e anti-TgERP, em amostras de fluidos corporais de

binômio mãe-filho foram realizadas e os resultados das correlações significativas serão mostrados a seguir.

Nas análises de correlação entre as amostras de crianças foi identificado correlação positiva entre a idade das crianças e a presença de anticorpos IgG anti-TgERP nas amostras de soro ( $r_s=0,2149$ ; CI 0.008965 to 0.4033;  $p=0,0355$ ) e também com IgM anti-*T. gondii* nas amostras de soro ( $r_s=0,4427$ ; CI 0.3174 to 0.5528;  $p<0,0001$ ). A presença de IgA anti-TgERP nas amostras de fezes apresentou uma correlação negativa com a idade das crianças ( $r_s=-0,3470$ ; CI -0.5197 to -0.1470;  $p=0,0007$ ) (figura 16). Não foi encontrada correlação entre a idade das crianças e a presença de anticorpos IgG anti-*T. gondii* no soro e IgA anti-TgERP na saliva das crianças.

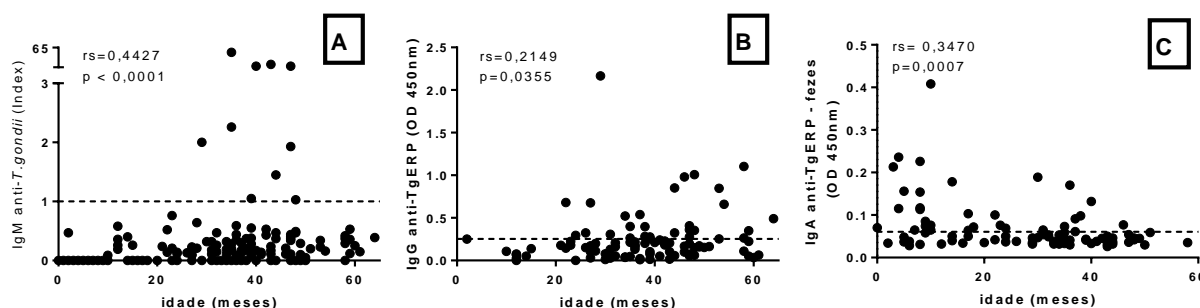


Figura 16: Correlação entre os níveis de anticorpos específicos de diferentes isotipos. Painel A: Níveis de IgM anti-*T. gondii* em amostras de soro de crianças residentes em Campos dos Goytacazes e Belem comparados com a idade das crianças; Painel B: Níveis de IgG anti-TgERP em amostras de soro de crianças residentes em Campos dos Goytacazes comparados com a idade; Painel C: Níveis de IgA anti-TgERP em fezes de crianças residentes em Campos dos Goytacazes e Belem comparados com a idade. Coeficiente de correlação foi calculado pelo teste de correlação de Spearman. Linha tracejada representa o valor de *cut off* para o teste de ELISA convencional ou ELISA TgERP determinado pela curva ROC.

Foi encontrado também correlação entre os níveis de anticorpos IgG anti-*T. gondii* nas amostras de soro das crianças com a presença de anticorpos IgM anti-*T. gondii* no soro das crianças ( $r_s=0,5300$ ; CI- 0,4163 to 0,6273;  $p<0,0001$ ) também com os níveis de IgG anti-*T. gondii* com a presença de anticorpos IgG anti-TgERP

no soro das mesmas crianças ( $r=0,2010$ ; CI- 0.00553 to 0.3911;  $p=0,0496$ ). Foi verificada uma correlação negativa entre a presença de anticorpos IgG anti-TgERP no soro das crianças e a presença de IgA anti-TgERP nas fezes das mesmas ( $rs= -0,4296$ ; CI- -0,7065 to -0,03849;  $p=0,0285$ ). Os gráficos da correlação desses resultados encontram-se na figura 17.

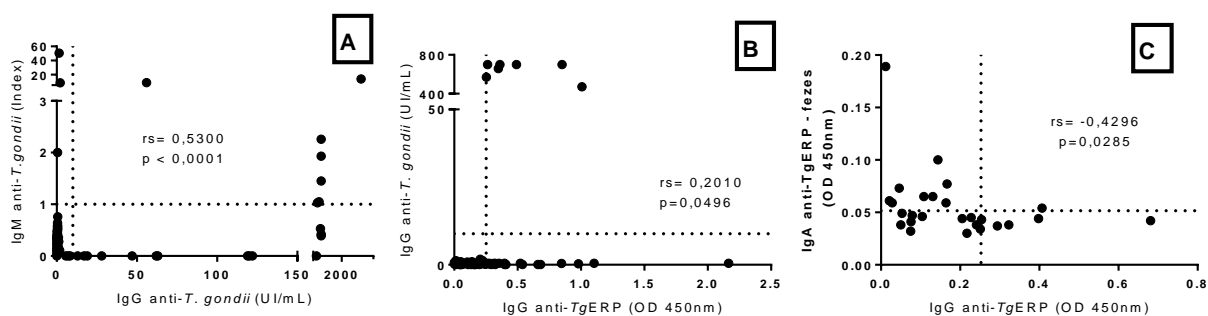


Figura 17: Correlação entre os níveis de anticorpos específicos de diferentes isotipos. Paineil A: Níveis de IgM anti-*T. gondii* em amostras de soro comparados com os níveis de IgG anti-*T. gondii* em amostras de soro de crianças residentes em Campos dos Goytacazes e Belem; Paineil B: Níveis de IgG anti-TgERP em amostras de soro comparados com níveis de IgG anti-*T. gondii* no soro de crianças residentes em Campos dos Goytacazes; Paineil C: Níveis de IgA anti-TgERP em fezes de crianças comparados níveis de IgG anti-TgERP no soro de crianças residentes em Campos dos Goytacazes. Coeficiente de correlação foi calculado pelo teste de correlação de Spearman. Linha tracejada representa o valor de *cut off* para o teste de ELISA convencional ou ELISA TgERP determinado pela curva ROC.

Ao avaliar somente os anticorpos específicos em mães foi observado a correlação entre a idade da mãe e a presença de anticorpos IgM anti-*T. gondii* em soro das mesmas ( $rs=0,2209$ ; CI 0,07640 to 0,3562;  $p=0,0023$ ), no entanto o mesmo não pode ser confirmado para IgG anti-*T. gondii* (Figura 18). Além disso foi encontrada correlação entre a presença de anticorpos IgG anti-*T. gondii* e anticorpos IgG anti-TgERP em soro ( $rs=0,4927$ ; CI 0,3188 to 0,6345;  $p<0,0001$ ), e com anticorpos IgA anti-TgERP em saliva ( $rs=0,4343$ ; CI 0,2059 to 0,6179;  $p=0,0003$ ) e entre a presença de anticorpos IgG anti-TgERP e IgA anti-TgERP em saliva ( $rs=0,5261$ ; CI 0,3170 to 0,6863;  $p<0,0001$ ) (Figura 18). Ainda foi encontrada uma fraca correlação entre a presença de anticorpos IgM anti-*T. gondii* com a presença de anticorpos IgG anti-*T. gondii* ( $rs = 0,1553$ ; CI 0,009738 to 0,2944;  $p=0.0315$ ).

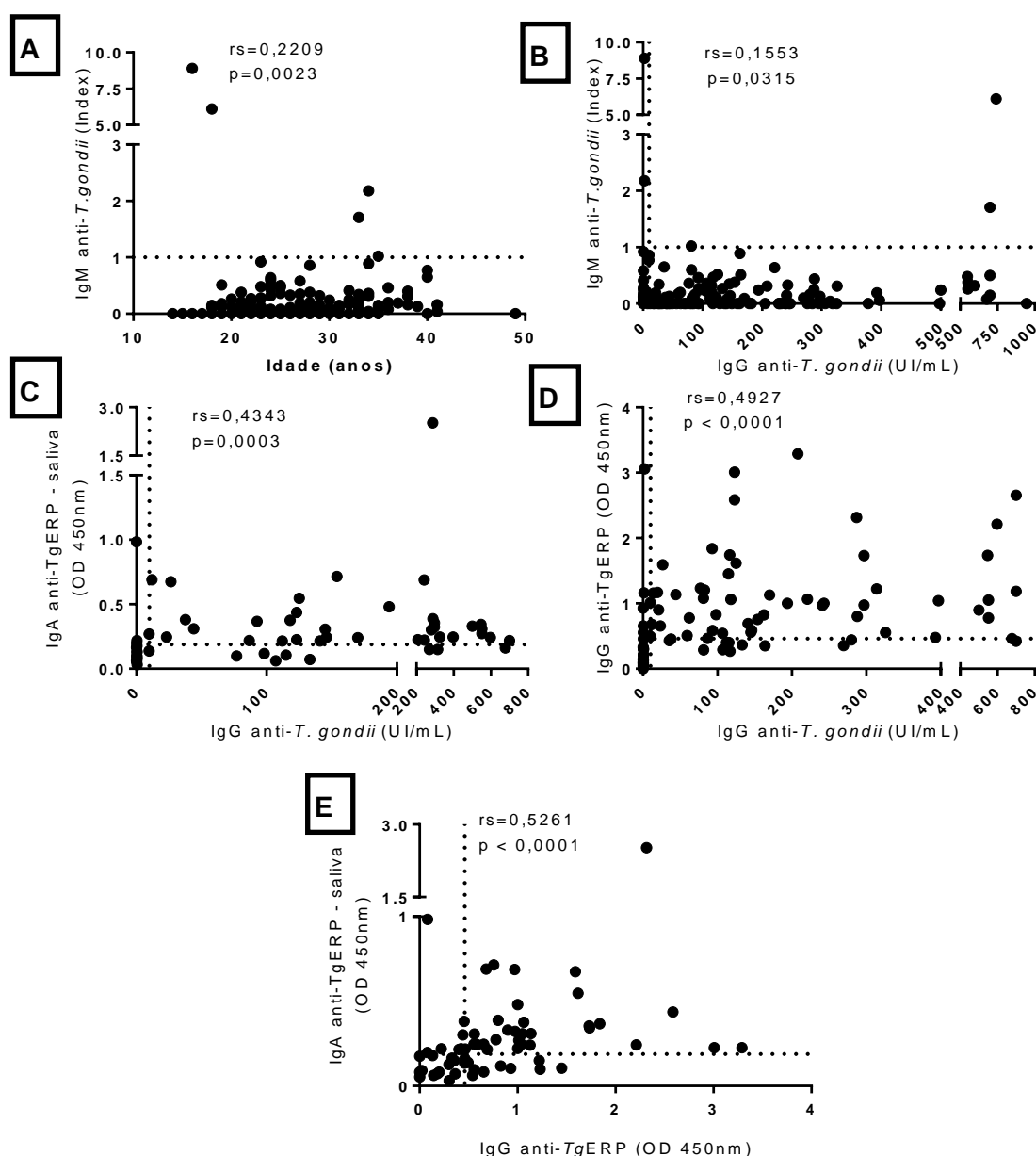


Figura 18: Correlação entre os níveis de anticorpos específicos de diferentes isotipos. Paineil A: Níveis de IgM anti-*T. gondii* em amostras de soro comparados com a idade das mães residentes em Campos dos Goytacazes e Belem; Paineil B: Níveis de IgG anti-*T. gondii* em amostras de soro comparados com níveis de IgM anti-*T. gondii* no soro de mães residentes em Campos dos Goytacazes e Belem; Paineil C: Níveis de IgA anti-TgERP na saliva de mães residentes em Campos dos Goytacazes comparados com os níveis de IgG anti-*T. gondii* no soro. Paineil D: Níveis de IgG anti-TgERP no soro de mães residentes em Campos dos Goytacazes comparados com os níveis de IgG anti-*T. gondii* no soro; Paineil E: Níveis de IgA anti-TgERP na saliva de mães residentes em Campos dos Goytacazes comparados com os níveis de IgG anti-TgERP no soro. Coeficiente de correlação foi calculado pelo teste de correlação de Spearman. Linha tracejada representa o valor de *cut off* para o teste de ELISA convencional ou ELISA TgERP determinado pela curva ROC.

Já avaliando a correlação entre os níveis de anticorpos específicos nas amostras das mães com as suas respectivas crianças, foi encontrada correlação entre IgGs anti-TgERP nas amostras de soro do binômio mãe-filho ( $r_s=0,2076$ ; CI- 0.001377 to 0.3969;  $p=0,0424$ ), e com as IgMs anti-*T. gondii* nas amostras de soro ( $r_s=0,7420$ ; CI- 0,6685 to 0,8011;  $p < 0,0001$ ), no entanto não foi encontrada correlação entre as amostras de saliva e fezes no binômio mãe-filho (figura 19).

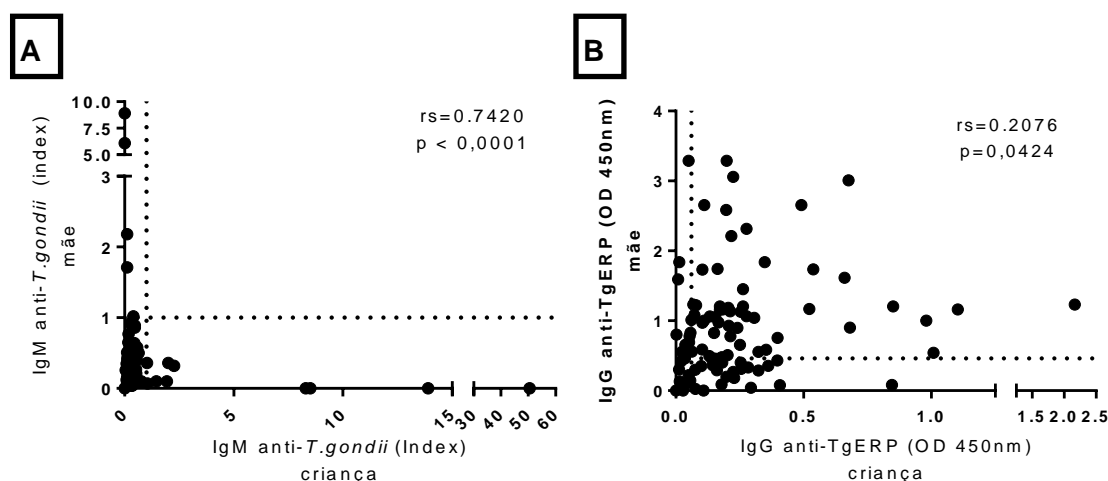


Figura 19: Correlação entre os níveis de anticorpos específicos de diferentes isotipos. Painei A: Níveis de IgM anti-*T. gondii* em amostras de soro de mães comparados com IgM anti-*T. gondii* no soro de crianças residentes em Campos dos Goytacazes e Belem; Painei B: Níveis de IgG anti-TgERP no soro de mães comparados com os níveis de IgG anti-TgERP em amostras de soro de crianças residentes em Campos dos Goytacazes Coeficiente de correlação foi calculado pelo teste de correlação de Spearman. Linha tracejada representa o valor de *cut off* para o teste de ELISA convencional ou ELISA TgERP determinado pela curva ROC.

## 5.5. Análise dos fatores de risco no binômio mãe-filho – análise preliminar

### 5.5.1. Análise dos fatores de risco em crianças

A análise dos questionários de fator de risco para a infecção pelo protozoário *T. gondii* mostrou que a presença de anticorpos IgG anti-*T. gondii* entre as crianças está relacionada a forma do parto (normal) e com o número de crianças presentes na residência (tabela 6). Por outro lado, possuir animais de estimação, seja dentro

ou fora do domicílio não foi fator de risco para a presença de anticorpos IgG anti-*T.gondii* ( $p=0,63$ ). A presença unicamente de gatos apresentou relação estatisticamente significativa com a presença de anticorpos IgM anti-*T. gondii* entre as crianças (tabela 6).

Também não houve uma relação estatisticamente significativa entre susceptibilidade à infecção toxoplásmica e a falta de saneamento (esgotos) ( $p=1.0$ ). A presença de poços nas residências das crianças também não se constituiu em fator de risco para a presença de anticorpos IgG anti-*T. gondii* ( $p=0,39$ ).

Já para a análise da infecção considerando a presença de anticorpos IgG anti-TgERP nas crianças mostrou-se que o local da moradia (área rural) e a presença de poço na residência foram considerados estatisticamente significativos nesse estudo (tabela 6). Além disso a presença de cachorro na residência apresentou-se como fator de proteção para essas crianças quanto a presença de anticorpos anti-TgERP. Nenhum dos demais fatores avaliados apresentou-se significativo. Para a presença de IgA anti-TgERP em amostras de saliva, encontramos relação com a presença de poço na residência das crianças (tabela 6).

Tabela 6: Resultados da análise univariada em crianças mostrando as variáveis estatisticamente significantes para a soropositividade da toxoplasmose para antígenos específicos.

	Fator de Risco	N°	N° positivos (%)	OR	IC (95%)	p
IgG anti- <i>T. gondii</i>	<u>Tipo de Parto</u>					
	Normal	96	18 (18,75%)	3,41	1,2 – 9,7	0,0230
	Cesário	79	5 (6,33%)			
	<u>Número de irmãos</u>					
Menos de 1	120	7 (5,83%)	5,12	1,9 - 13,7	0,0013	
Mais de 2	54	13 (24,07%)				
IgM anti- <i>T. gondii</i>	<u>Ter gato na residência</u>					
	Não Sim	153 27	6 (3,92%) 4 (14,81%)	4,26	1,1 – 16,2	0,045
IgG anti- TgERP	<u>Ter cachorro em casa</u>					
	Não Sim	55 39	23 (40,35%) 8 (20,51%)	0,38	0,1 - 0,9	0,0479
	<u>Local da moradia</u>					
	Área urbana Área rural	18 75	2 (10%) 28 (37,33%)	5,36	1,15 - 24,9	0,0283
	<u>Ter poço em casa</u>					
Não Sim	41 43	8 (18,60%) 19 (46,34%)	3,78	1,4 – 10,10	0,0098	
IgA anti-TgERP	<u>Ter poço em casa</u>					
Não Sim	31 26	9 (29,03%) 15 (57,69%)	3,33	1.1 – 10,0	0,0353	

### 5.5.2. Análise dos fatores de risco em mães

Em relação aos hábitos alimentares das mães, já que o mesmo não pode ser avaliado entre as crianças, foi observado que o fato de consumir carne bovina ou suína não se apresentou como fator de risco para a toxoplasmose ( $p=0,82$  e  $p=1.0$  para IgG anti-*T. gondii* e  $p=0,80$  e  $p=1.0$  para IgG anti-TgERP, respectivamente). Ao



considerar o hábito de comer outros animais, como por exemplo animais silvestres, também não foi encontrada associação estatisticamente significativa com a presença de IgG anti-*T. gondii* ou IgG anti-TgERP ( $p=1.0$  em ambos casos).

Filtrar a água de poço apresentou-se um fator de proteção para a presença de anticorpos IgG anti-*T. gondii* entre as mães ( $p=0,01$ ), apesar de não termos encontrado a relação entre a presença de anticorpos IgG anti-TgERP com o mesmo fator ( $p=0,21$ ).

A presença de gato na residência apresentou relação com a presença de anticorpos IgM anti-*T. gondii* entre as mães ( $p=0,05$ ; OR 5,9; CI 95% 1,1 – 30,7), bem como o consumo de carne de porco ( $p=0,009$ ; OR 12,3; CI 95% 2,3 – 66,6).

Desta forma, nenhum outro fator de risco avaliado nesse estudo apresentou relação com a presença de infecção entre as mães quando analisamos a presença de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, IgM anti-*T. gondii*, IgG anti-TgERP ou IgA anti-TgERP.

## VI. DISCUSSÃO

A soroprevalência da toxoplasmose em crianças neste estudo foi de 13,4% entre as 192 crianças de 0 a 64 meses de idade com média de idade de 29,8 meses, sendo confirmado 8 crianças soropositivas para a toxoplasmose em Campos dos Goytacazes e 15 crianças soropositivas para a toxoplasmose em Belém.

A prevalência encontrada de 38% de crianças soropositivas na faixa de 0-6 meses de idade já foi relatada em estudos anteriores no município de Campos e em estudos presentes na literatura mundial (Abu-Madi *et al.*, 2008, Wilken 2001). Esse fato pode ser explicado pela presença de anticorpos maternos circulantes nessas crianças visto que as mesmas não possuem anticorpos IgM específicos para a infecção. Em nosso estudo, foram identificadas 11 crianças com anticorpos IgG anti-*T. gondii* na cidade de Belém que tinham entre 0 e 4 meses de idade, porém estas não apresentavam anticorpos IgM anti-*T. gondii*, não sendo possível afirmarmos a presença de infecção congênita nesses indivíduos. Com isso a infecção toxoplásmica encontrada entre as crianças pode ser estimada entre 6,25% a 13,4% (12 ou 23 em 192 crianças de 0 a 64 meses de idade).

Da mesma forma, a baixíssima presença de anticorpos específicos entre crianças de 6 a 36 meses foi relatada pelo mesmo trabalho (Wilken 2001). Essa negatividade transiente em criança já foi descrita em por Jaisson-hot e colaboradores (Jaisson-Hot *et al.*, 2001) em casos suspeitos de toxoplasmose congênita onde por período em média de 5 meses (dos 12 aos 126 meses) cerca de 15% das crianças com toxoplasmose congênita não apresentam anticorpos reativos nos testes sorológicos convencionais, em 3 crianças a negatividade transiente permaneceu por 35 meses. Com isso muitos estudos sugerem o acompanhamento sorológico de casos suspeitos por no mínimo 1 ano (Neto *et al.*, 2004). O problema desse tipo de acompanhamento está na coleta de sangue dos neonatos e crianças, pois torna-se um obstáculo para algumas famílias que não permitem a coleta de sangue daquelas crianças sem uma aparente necessidade.

A soroprevalência mundial da toxoplasmose em crianças de 0 a 6 anos de idade varia entre 0 a 48% (Paradisi *et al.*, 1989, Salahi-Moghaddam & Hafizi 2009, Ngui *et al.*, 2011). Estima-se que cerca de 22,5% da população abaixo de 12 anos

se encontra infectada pelo *T. gondii* (Karanis *et al.*, 2013). Essa prevalência é justificada pela presença de fatores de risco relacionados com a toxoplasmose, como a ingestão de oocistos e cistos teciduais, fazendo com que a soroprevalência seja alta especialmente em áreas onde essas crianças vivam em precárias condições sanitárias. Nesse caso o nosso estudo apresenta um valor de prevalência considerado baixo comparado com outros trabalhos da literatura no país (Portela *et al.*, 2004, Ferreira *et al.*, 2009) no entanto apresenta resultados similares a trabalhos já descritos na região (Petersen *et al.*, 2001, Wilken 2001).

Em Campos dos Goytacazes a prevalência da toxoplasmose varia de acordo com a condição socioeconômica da população, sendo de 84, 62 e 23%, nas populações de baixo, médio e alto poder aquisitivo, respectivamente (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003). Nesse estudo, a soroprevalência entre as mães avaliadas tendo entre 14 a 49 anos de idade (média de 28 anos) foi de 71%, sendo 73% em Campos dos Goytacazes e 69% em Belém. Estes resultados mostram que a prevalência já descrita na população de médio/baixo e baixo poder aquisitivo ao qual os indivíduos participantes do nosso estudo pertencem permanece o mesmo no município de Campos. No entanto, em Belém, os resultados encontrados nesse estudo sugerem uma queda na prevalência da doença entre mães residentes na cidade visto que em estudo anterior nesse município foram encontradas prevalências de 78% na população (Bichara, 2001).

É sabido que a soroprevalência da doença aumenta com a idade e que esse crescimento parece estar relacionado com o aumento da exposição ao longo dos anos às fontes de contaminação (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003, Carellos *et al.*, 2014, Singh *et al.*, 2014). A prevalência para a toxoplasmose nos estudos epidemiológicos apresenta-se sempre de forma crescente, ou seja, na faixa de 0 a 9 anos encontra-se as porcentagens mais baixas, enquanto que em idosos a porcentagem é a mais alta. Nesse estudo também foram encontradas prevalências consideradas baixas na faixa de 0 a 64 meses de idade em relação a outros trabalhos presentes na literatura mundial.

Diza e colaboradores em 2005 descreveram a incidência da infecção primária na população de duas regiões da Grécia nos anos de 1984, 1994 e 2004, mostrando que houve uma queda na incidência, conseqüentemente reduzindo a porcentagem

de soroconversão anual de 1,1% para 0,8% na população em geral e de 0,8% para 0,4 % entre mulheres em idade fértil (Diza *et al.*, 2005). Outros trabalhos, como nos Estados Unidos e na Europa, também relatam essas quedas na taxa anual de soroconversão nos últimos 20 anos (Remington 2011), embora ainda não existam explicações para tais quedas, os autores relatam que possivelmente a melhoria socioeconômica e melhoria dos hábitos de higiene possam ter influenciado nessa questão (Diza *et al.*, 2005, Remington 2011). Observa-se que esses estudos retratam países que apresentam programas de controle da doença e acompanhamento das gestantes, diferentemente do que acontece nos países em desenvolvimento, como o Brasil.

Considerando que estamos apresentando resultados referentes a uma nova metodologia baseado na análise de anticorpos específicos contra proteína presente em esporozoítos (TgERP) para o estudo sorológico de pacientes portadores de toxoplasmose, discutiremos em separado os resultados encontrados nesse trabalho conforme se segue: 1- Sobre as suas potencialidades enquanto ferramenta para auxiliar no diagnóstico diferencial dos grupos aqui apresentados; 2- Sobre o seu possível significado no contexto da resposta imune específica contra o *T. gondii* em cada grupo considerado nesse estudo.

O diagnóstico confirmatório para toxoplasmose, principalmente para os casos de doença congênita, tem sido ponto principal de muitas pesquisas nos últimos anos (Liu *et al.*, 2015). Assim, a busca por novas ferramentas que visem avaliar a produção de anticorpos antígenos específicos em pacientes com toxoplasmose podem ser de grande utilidade. Os testes baseados na técnica de ELISA e suas variações são os mais comumente utilizados na rotina de diagnóstico de toxoplasmose (Remington *et al.*, 2004). Além do mais, não só a busca de novas ferramentas bem como a utilização de diferentes tipos de materiais biológicos como fonte de anticorpos tem sido importante principalmente em situação adversas como no *follow-up* de crianças com suspeita de toxoplasmose congênita que precisam fazer coletas de sangue periodicamente (Chapey *et al.*, 2015).

No presente estudo utilizamos o teste de ELISA que apresenta uma proteína de 11KDa relacionada com a embriogênese em esporozoítos, a TgERP, que corresponde ao gene TGVEG\_027520 no ToxoDB, sendo essa proteína reconhecida

por animais e humanos que foram expostos a oocistos esporulados (Hill *et al.*, 2011). Ainda não existe um teste diagnóstico no mercado que utilize proteínas de esporozoítos/oocistos, como já se encontra bem descrito para antígenos de taquizoítos por exemplo (Wilson *et al.*, 1997, Aubert *et al.*, 2000, Piergili Fioretti 2004). A presença de anticorpos específicos contra essa proteína, TgERP, está associada à ingestão de oocistos os quais permanecem detectáveis no paciente entre 6-8 meses após o episódio da infecção. Por meio da utilização desta ferramenta obtivemos resultados inéditos, que quando comparado ao teste de ELISA convencional, mostraram-se importantes do ponto de vista da confirmação da via de infecção.

Recorremos ainda ao emprego de Curvas ROC para a validação dos testes descritos e aplicados nesse estudo. As curvas ROC apresentam valores referentes a área embaixo da curva - AUC (de Area Under the Curve) e assim determina a confiabilidade do teste. Um teste cuja curva se aproxime do canto superior esquerdo do gráfico apresenta AUC próxima a 1, e, portanto, possui alta sensibilidade (Se) e alta especificidade (Es), sendo capaz de distinguir entre indivíduos positivos e negativos, enquanto que um teste que apresente AUC igual a 0,5 é totalmente incapaz de distinguir indivíduos positivos e negativos (Martinez *et al.*, 2003).

Ao observarmos as curvas ROC geradas para os testes realizados foi possível notar que a utilização do ELISA TgERP gerou testes com AUC consideráveis para amostras de soro e saliva. Por outro lado para amostras de leite materno e fezes as AUC foram consideradas baixas. De modo geral essa metodologia possui um poder discriminatório importante do ponto de vista epidemiológico para este estudo.

Outra forma de avaliar testes diagnósticos é por meio da investigação de Sensibilidade e Especificidade de cada teste. A sensibilidade é definida como a porcentagem de indivíduos positivos que serão indicados como positivos pelo teste; e especificidade é definida como a porcentagem de indivíduos negativos que serão indicados como negativos pelo teste. Para que seja estabelecido um valor de sensibilidade e especificidade é necessário estabelecer um ponto de corte (*cut off*), que irá discriminar entre indivíduos positivos e negativos. Geralmente são escolhidos pontos de corte onde a Sensibilidade e Especificidade são altos. Porém, quando isto

não é possível a escolha do ponto de corte estará relacionada à finalidade do teste (Martinez *et al.*, 2003).

Em nosso estudo o *cut off* foi escolhido com base em pontos onde a sensibilidade e a especificidade eram altas, não privilegiando nenhuma destas variáveis. De forma semelhante ao resultado encontrado para AUC, a maioria dos testes ELISA TgERP, exceto para IgA nas amostras de leite materno e fezes, apresentaram maiores valores de Sensibilidade e Especificidade. IgG anti-TgERP apresentou uma AUC de 0,86 em crianças e 0,85 entre as mães, apresentando Es de 75% e Se 100% entre as amostras de crianças, enquanto que apresentou uma Es de 83% e Se de 73% entre as mães. Já para IgA anti-TgERP obtivemos valores de AUC de 0,74 e 0,86 para as amostras de saliva de crianças e mães respectivamente com valores de Se de 75% e Es de 62% para as amostras de saliva de crianças e valores de Se de 83% e Es de 84% para as amostras de saliva das mães (tabela 5).

Como forma adicional de verificar a atuação de cada teste foi calculada a razão de verossimilhança (RV). Esse teste mostra quantas vezes é mais provável que um indivíduo positivo seja indicado como positivo em comparação com um indivíduo negativo. Por este parâmetro também foi possível observar um melhor desempenho com as análises de IgG anti-TgERP em soro tanto pra mães e crianças, e com destaque para a análise de IgA anti-TgERP nas amostras de saliva das mães que apresentou RV +5,232.

A avaliação do desempenho dos testes de ELISA TgERP pode não ter sido a ideal para o nosso estudo visto que foi considerado como padrão o Kit de ELISA convencional que avalia a presença de IgG anti-*T. gondii*. No entanto, a avaliação comparativa permanece válida, visto que o mesmo grupo de pacientes foi utilizado, assim a detecção ou não de cada classe de imunoglobulina dependeu do próprio desempenho do teste, não sendo influenciada por uma variação intrínseca das amostras.

Considerando os valores de *cut off* selecionados por meio do desenvolvimento de curva ROC, a proporção de indivíduos que apresentaram sorologia positiva no ELISA TgERP foi de 31,25% (*cut off* = 0,2525) entre as crianças e de 69% (*cut off* = 0,460) entre as mães, o que sugere que a principal de

via de infecção da toxoplasmose em Campos dos Goytacazes é por meio da ingestão de oocistos, principalmente se tratando de crianças. Esse resultado corrobora com estudos prévios que demonstraram por meio de inquéritos epidemiológicos a importância da transmissão via oocistos nessa região (Petersen *et al.*, 2001, Garcia Bahia-Oliveira *et al.*, 2003, Vieira *et al.*, 2015). Outros trabalhos mostram que a proporção da população humana que adquire a infecção pela ingestão de oocistos é maior do que se imaginava podendo chegar a cerca de 78% num grupo de 76 mães que infectaram congenitamente seus filhos, nos Estados Unidos (Boyer *et al.*, 2011). A prevalência de IgA anti-TgERP em amostras de saliva entre as crianças foi de 41% (*cut off* = 0,0605) e entre as mães de 59% (*cut off* = 0,1885), demonstrando que a análise desse tipo de amostras biológica apresenta uma importância epidemiológica grande pelo fato de possuir correlação com as amostras de soro. Além disso, conseguimos identificar anticorpos IgA anti-TgERP (oocistos) em amostras de saliva de crianças a partir de 14 meses de idade, sugerindo que possivelmente, crianças que vivam em um ambiente altamente contaminado, possam adquirir a infecção, mais cedo do que em outros locais, ou por outras vias de infecção. No entanto temos que considerar que o baixo valor de *cut off* determinado pela curva ROC deve ser melhor investigado devido ao pequeno número de pacientes positivos avaliados para a análise de IgA (4 amostras). Mesmo assim, esse resultado apresenta-se como promissor visto que entre as amostras de saliva das mães apresentou-se resultado significativo para esse tipo de análise.

Avaliando as curvas de prevalência separadas por faixas etárias de indivíduos positivos no ELISA TgERP nota-se um aumento progressivo com a idade, semelhante ao observado no ELISA convencional (Figura 11). Um fato interessante é que depois dos 30 anos de idade a soroprevalência da toxoplasmose no ELISA TgERP se mantém estável em torno de 65%. Isto sugere uma exposição contínua a oocistos presentes no ambiente, visto que TgERP parece não apresentar estímulo imunológico persistente para além de 8 meses (Hill *et al.*, 2011). Estudos de que avaliem situações de reinfecção em áreas endêmicas para a toxoplasmose precisam ser profundamente investigados visto que esse fator pode ser fundamental como questão de saúde pública.

Comparando as curvas de prevalência dada pelo *cut off* da curva ROC e pelo *cut off* do desvio padrão, verificamos que entre as crianças, tanto para IgG quanto para IgA anti-TgERP os valores foram muito diferentes entre si, porém as curvas de prevalência dada pelo *cut off* do desvio padrão foi bem similar a curva de prevalência para IgG anti-*T. gondii* para ambas imunoglobulinas.

O ponto crucial do estudo epidemiológico em crianças foi a identificação de anticorpos anti-TgERP a partir de 14 meses (IgA em saliva) e a partir de 22 meses (IgG no soro) de idade podendo assim confirmar através da presença de anticorpos específicos que em áreas endêmicas a ingestão de oocistos apresenta-se como fator de risco como já fora descrito em trabalhos anteriores (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003). Esses dados corroboram com dados epidemiológicos que mostram que indivíduos mais jovens são mais susceptíveis a infecção por toxoplasmose do que indivíduos mais velhos indicam a magnitude da transmissão via oocistos em indivíduos mais jovens.

Alguns trabalhos verificaram que existe uma relação entre a idade e os títulos de anticorpos (IgG anti-*T. gondii*) porém essa relação não foi completamente esclarecida (Taylor *et al.*, 1997). No entanto, o aumento dos títulos de anticorpos em crianças pode ser explicado pelo fato que a exposição contínua a antígenos reflete no aumento de anticorpos específicos na criança com o passar dos anos. Nesse estudo verificamos a correlação positiva entre a idade e os níveis de anticorpos IgM anti-*T. gondii* e IgG anti-TgERP no soro de crianças ( $p < 0,0001$ ;  $p = 0,0355$  respectivamente) e a correlação negativa da idade com a presença de IgA anti-TgERP em fezes de crianças ( $p = 0,0007$ ).

Os níveis de IgG no soro estão relativamente mais altos no período neonatal porque esse anticorpo já foi descrito com o único que consegue atravessar a placenta (Simister 2003). Isso fica evidenciado quando se avalia a presença de IgG anti-*T. gondii* entre os neonatos. Dentre 17 indivíduos entre 0-4 meses de idade, 11 apresentaram IgG anti-*T. gondii*, no soro. Portanto, somente pela avaliação de IgG não é possível estimar a prevalência da infecção nesse grupo de indivíduos.

Em caso de infecção do feto pelo *T gondii*, nos primeiros 5 meses de vida do neonato ocorre aumento gradual dos níveis de IgA e IgM no soro e o decaimento nos níveis de IgG. A partir desse ponto os níveis de IgG retomam a ascensão até



atingirem o platô por volta dos 9-10 anos de idade (Aksu *et al.*, 2006). Já está bem descrito na literatura que os anticorpos IgM, IgG e IgA totais em crianças alcançam seus níveis ideais, comparados aos adultos, por volta de 1 ano, 6-8 anos e 10 anos respectivamente (Aksu *et al.*, 2006). Em nosso estudo identificamos a presença de níveis de anticorpos IgA e IgM específicos em crianças em valores bem inferiores aos valores maternos e que a produção desses anticorpos específicos parece se elevar a partir do segundo ano de vida, independente dos antígenos que foram testados, *T. gondii* ou TgERP. Ainda verificamos que o aumento dos níveis de anticorpos específicos e o aumento da idade em crianças apresenta correlação positiva, confirmando assim que os níveis desses anticorpos evoluem progressivamente durante a infância, independente da presença de infecção ou não.

A detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii* é considerado o principal marcador de infecção aguda, quando este associado a níveis ascendentes de IgG específicos, no entanto, ainda sim podem ser verificados casos falso-positivos e falso-negativos devido permanência desses anticorpos por longos períodos em alguns indivíduos e pela baixa sensibilidade das técnicas utilizadas (Sensini 2006). Por esse motivo a avaliação de anticorpos IgA específicos, e também anticorpos IgG de baixa avidéz, foram propostos como marcadores de infecção recente. Ainda assim, já foi relatado na literatura a presença de anticorpos IgA específicos em indivíduos com toxoplasmose crônica (Contreras *et al.*, 2000, Gómez-Marín *et al.*, , Garweg *et al.*, 2004). No presente estudo demonstramos correlação positiva significativa entre os níveis de anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* e IgG e IgA anti-TgERP corroborando dados prévios de que a combinação de duas ou mais imunoglobulinas específicas tem importância diagnóstica confirmatória, especialmente para situações onde o diagnóstico se torna essencialmente importante como em casos de doença congênita.

No presente estudo detectamos a presença de anticorpos específicos anti-TgERP em diferentes amostras biológicas: saliva, soro, leite materno e fezes. Além do mais, foi confirmada a correlação positiva entre a presença de anticorpos específicos tanto em crianças como em suas mães, em ambas cidades avaliadas nesse estudo. Estes resultados demonstram que estudos epidemiológicos que utilizem outros tipos de amostras biológicas como fonte de identificação de

anticorpos específicos, como as amostras de saliva por exemplo, apresentam-se como proposta a ser considerada em melhor avaliada principalmente em estudos epidemiológicos.

Os resultados referentes às amostras de saliva são importantes, inéditos e propensos a fomentar a adoção de diagnóstico inovador, tanto do ponto de vista clínico (individual) quanto do epidemiológico (populacional). A avaliação da IgA anti-TgERP na saliva das mães que participaram deste estudo demonstrou resultado de curva ROC superior aos resultados de IgG, com valor de RV quase que o dobro (RV 5,24) do valor encontrado pra IgG (RV 3,08) e com parâmetros satisfatórios na correlação de Spearman ( $rs=0,5261$ ;  $p < 0,0001$ ) entre esses anticorpos (IgA anti-TgERP) e IgG anti-*T. gondii*. Estes resultados apontam que fluidos corporais, tais como saliva e leite humano e fezes, podem ser utilizados em estudos epidemiológicos como fonte de anticorpos, com vantagem de apresentarem baixo custo de coleta e por se tratarem de amostras que não requerem procedimentos invasivos.

Devido ao caráter epidemiológico desse estudo investigou-se fatores de risco para a infecção por meio de aplicação dos questionários. As regiões tropicais apresentam maior soroprevalência principalmente por possuírem clima ameno e úmido que favorece a sobrevivência dos oocistos no ambiente. Os hábitos de higiene e alimentares relacionados com as questões culturais ou socioeconômicas, como o consumo de carnes cruas, os tipos de carnes consumidas, hábitos de lavagem de verduras e frutas em geral, o tipo de água consumida (se tratada adequadamente e não contaminada por oocistos de *T. gondii* ou não tratada e contaminada por oocistos de *T. gondii*) e a exposição ao contato com solo contaminado com oocistos influenciam a grande variabilidade da soroprevalência na população mundial.

A relação entre ter gatos e o aumento do risco de infecção pelo *T. gondii* já está bem descrita na literatura (Etheredge 1995, Rey & Ramalho 1999, Etheredge *et al.*, 2004, Lopes *et al.*, 2008, Sharif *et al.*, 2010, Dattoli *et al.*, 2011). Os gatos apresentam um grande contato com seus donos e na maioria dos casos apresentam contato com o exterior da residência apresentando oportunidade de adquirirem a infecção. Alguns estudos demonstraram que a maioria dos gatos apresentam o

hábito de dormir com seus donos, inclusive com crianças (Chomel & Sun 2011). Nesse estudo identificamos a relação entre a presença de anticorpos IgM anti-*T.gondii* (cistos teciduais) em crianças residentes em Campos dos Goytacazes e Belem e a presença de gatos na residência dessas crianças sendo um fator de risco importante para esses indivíduos possuem 4,26 mais riscos de ter toxoplasmose do que aqueles que não possuem felinos na sua residência.

Pereira e colaboradores em 1992 avaliaram 998 crianças entre 7 meses de idade e 17 anos residentes em áreas urbanas e rurais em Nova Escócia, Canadá, e verificaram que aqueles que viviam na área rural possuíam 4,7 vezes mais risco de serem infectados pelo *T. gondii* do que aqueles residentes na área urbana (Pereira *et al.*, 1992). Nesse mesmo estudo, verificaram ainda que gato na residência apresentava-se como um fator de risco para a doença ( $p=0,004$ ) e que ter 1 ou mais gatos aumentava o risco de infecção em 3,1 e 2,2 vezes, respectivamente, entre crianças que residiam em área rural (Pereira *et al.*, 1992). No nosso estudo o local da moradia também se constituiu como fator de risco entre crianças, onde aquelas que vivem na área rural em Campos dos Goytacazes ou em Belem apresentaram 5,36 vezes mais chance de ter anticorpos IgG anti-TgERP (oocistos) do que aquelas que vivem em áreas urbanas, demonstrando assim que a relação com a área rural e a presença da toxoplasmose em crianças está relacionada com a ingestão de oocistos presentes no ambiente por esses indivíduos.

Esse achado reforça os dados já publicados no município de Campos dos Goytacazes mostrando que a ingestão de oocisto na água apresenta-se como via de infecção importante na população de baixo poder aquisitivo (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003). Essa maior prevalência associa-se à maior exposição dos indivíduos da zona rural ao *T. gondii* exposição aos oocistos presente no ambiente (Vieira *et al.*, 2015). Além disso, a zona rural é caracterizada pela ausência de abastecimento público de água, ausência de coleta de lixo e rede de esgoto que podem estar diretamente associados à infecção por oocisto de *T. gondii* presentes em água, no solo, em verduras e frutas contaminadas com fezes de gatos ou lavadas com água contaminada com oocistos.

Em um estudo avaliando crianças no Panamá, Frenkel e colaboradores verificaram que havia risco maior de adquirir a doença aquelas crianças que tinham

mais contato com cachorros do que aquelas que tinham contato com gatos (Frenkel & Parker 1996). As crianças de forma geral apresentam contatos com cachorros quando muito pequenos e passam a mão no pelo desses animais podendo posteriormente levar a mão a boca. Frenkel e colaboradores avaliaram o hábito de cães e identificaram que 44,2% dos cães comiam fezes de gato e 23% rolavam sobre as fezes de gato, mostrando ainda que alguns cães podiam possuir um ou ambos hábitos (Frenkel *et al.*, 2003). Considerando regiões onde a umidade e temperatura favorecem a esporulação dos oocistos, essa forma de contaminação em crianças pode ser bastante relevante, e medidas de precaução como lavar as mãos posteriormente ao contato com os cães devem ser tomadas para prevenir a transmissão da doença (Frenkel & Parker 1996, Frenkel *et al.*, 2003). De forma inversa, em nosso estudo verificamos que a presença de cachorros na residência constituiu-se como fator protetor para as crianças com relação a presença de anticorpos IgG anti-TgERP (oocistos). Esse fato se contrapõe ao exposto na literatura sobre o assunto, onde a presença de animais domésticos, principalmente cães e gatos, na maioria dos casos pode se apresentar como fator importante para a infecção entre as crianças.

Poucos estudos relatam como fator de risco na infância a ingestão de carnes cruas e malpassadas (Fan *et al.*, 2001, Negash *et al.*, 2008, Sharif *et al.*, 2010, Khalil *et al.*, 2012). Este fato pode ser explicado devido ao consumo de carnes cruas e malpassadas ser hábito mais comum entre a população adulta. No entanto essa questão é muito relevante em países onde a cultura alimentar possui influencia, como no caso da França e de algumas regiões da Etiópia onde o costume de comer carnes malpassadas é bastante comum e são áreas de alta soroprevalência para a toxoplasmose (Negash *et al.*, 2008). Outros trabalhos relacionam o consumo de carnes de alguns animais com a prevalência da doença, como carnes de porco, aves, cervo, coelho, cutia, preá, boi, capivara, não relatando como é o consumo dessas carnes (Etheredge & Frenkel 1995). Nesse estudo foi avaliado o consumo de carnes pelas mães, no entanto não foi identificada a relação entre o consumo de nenhuma carne avaliada pelo questionário, bem como o consumo de carnes crua ou malpassadas.

Ngui e colaboradores avaliando fatores de risco para a toxoplasmose verificaram através de análise multivariada que crianças com idade superior a 12 anos, o uso de água de rios ou montanhas para tarefas diárias aumentavam em 1,4 ( $P=0.010$ ) a chance desses indivíduos de adquirirem a toxoplasmose (Ngui *et al.*, 2011). Em nosso estudo conseguimos verificar a relação entre a presença de anticorpos IgG e IgA anti-TgERP (oocistos) com a presença de poço artesiano/cacimba nas residências desses indivíduos como uma possibilidade de 4 vezes mais de aquisição da infecção entre as crianças que relataram ter poço em casa em Campos dos Goytacazes. Esse resultado corrobora os estudos realizados na região (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003, Vieira *et al.*, 2015) e reforça a tese de que as crianças podem estar adquirindo a doença pela ingestão de oocistos presentes no ambiente e água contaminados embora não justifique a baixa de prevalência encontradas na região na faixa de 0-9 anos de idade. Quando se analisa as curvas de prevalência para a presença de anticorpos IgG e IgA anti-TgERP (oocistos) em crianças e se comparados com a presença de anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii* (cistos teciduais), encontramos valores de prevalência ascendente a partir de 14 meses de idade e com valores de 20 a 40 vezes maior quando comparados com antígenos específicos para cistos de *T. gondii*. Já entre as mães verificamos com a prevalência encontrada entre IgG anti-*T. gondii* (cistos teciduais) e IgG/ IgA anti-TgERP (oocistos) apresentam-se próximos, não nos permitindo assim identificar a fonte de risco principal entre essas mães. No entanto, como ocorre a presença de anticorpos IgG e IgA anti-TgERP entre todas as faixas etárias maternas, e sabendo que esse antígeno induz resposta imunológica humoral (anticorpos) com duração de 6-8 meses, infere-se que esteja ocorrendo exposição contínua a antígenos de oocistos e indicando que essas famílias se encontram vivendo em um ambiente altamente contaminado por oocistos de *T. gondii*.

A questão socioeconômica como fator de risco não é avaliada como fator direto de infecção em alguns trabalhos, porém avaliam fatores de risco que estão relacionados com baixas condições sanitárias, como ausência de água encanada e/ou tratada, ausência de sistema de esgoto na residência, baixa escolaridade das mães, número alto de crianças na residência (Etheredge & Frenkel 1995, Rey & Ramalho 1999, Etheredge *et al.*, 2004, Jones *et al.*, 2005, Dattoli *et al.*, 2011). Perry

e colaboradores verificaram em estudo recente que a população que vive em áreas de pior condição sanitária possuem uma soroprevalência significativamente maior que aquelas que viviam em melhores condições ( $P < 0,001$ ). Na faixa etária entre 0 e 9 anos de idade, a prevalência entre aqueles que vivem em áreas de pior condição sanitária é 2 vezes maior que entre aqueles que vivem em áreas com melhores condições (Perry *et al.*, 2014).

Em nosso estudo foi observada relação direta entre o número de crianças por domicílio e a presença de anticorpos específicos relacionados com a ingestão de cistos teciduais (IgG anti-*T. gondii*), onde o risco de adquirir a infecção é 5 vezes maior entre aqueles que possuem mais de 2 irmãos. Já a presença de agregados familiares foi descrita como fator de proteção devido a condução a uma exposição compartilhada do ambiente em adição as atividades realizadas entre todos os membros do domicílio (Portela *et al.*, 2004, Vieira 2015).

Em áreas altamente endêmicas para a toxoplasmose, especialmente aquelas em que há piores condições sanitárias, fica difícil determinar os fatores de risco envolvidos na aquisição da doença, visto que muitos fatores podem combinar-se e influenciar nesse processo. Por esse motivo estudos complementares que avaliem o nível de contaminação ambiental tornam-se necessários para indicar a alta contaminação do ambiente, principalmente por oocistos. Nesse caso trabalhos que avaliem a contaminação de animais em peridomicílio, como galinhas, podem auxiliar na associação da presença de anticorpos anti-*T. gondii* em humanos, indicando a ingestão de oocistos como forma de transmissão da toxoplasmose como já descrito como forma principal de infecção algumas regiões do Brasil (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003, De Moura *et al.*, 2006, Vieira *et al.*, 2015). Em estudos prévios realizados por Vieira e colaboradores em 2015 na região de Campos verificaram a presença de anticorpos anti-*T. gondii* em 99 das 159 aves avaliadas (62,26%) coletadas em cinco diferentes regiões do município de Campos dos Goytacazes/RJ, indicando que o nível de contaminação ambiental por oocistos de *T. gondii* apresenta-se fortemente associado com a soroprevalência da infecção toxoplásmica em aves e o grau de vulnerabilidade de aquíferos desta região.

Os resultados apresentados neste trabalho são inéditos e mostram que após 10 anos a prevalência da toxoplasmose em Campos dos Goytacazes permanece

alta e os fatores de riscos que predisõem para a infecção parecem ser os mesmos relatados em estudos anteriores (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003) o que demonstra a importância da via de transmissão por oocistos que está diretamente relacionada na região à questão da precariedade sanitária e à contaminação ambiental. Além disso, esse trabalho apresenta resultados com potencial inovador para o diagnóstico na medida em que valida a identificação de antígenos específicos relacionados com a aquisição da infecção toxoplásmica e a ingestão de oocistos, no caso deste estudo, em crianças; fato que fica evidenciado por meio das análises de estes de ELISA convencional e anti-TgERP e pelos dados analisados avaliando fatores de risco pelo questionário. Nossa hipótese é de que os testes sorológicos convencionais não são suficientes para estimar a real prevalência da infecção, principalmente entre as crianças residentes no município de Campos e em áreas que apresentam as mesmas características epidemiológicas como Belém no estado do Pará.

O Brasil tem contribuído com importante parcela da produção de conhecimentos básicos e aplicados à toxoplasmose. No entanto, o país não tem uma política pública definida de atenção à toxoplasmose com a adoção de medidas preventivas direcionadas para os fatores de risco (Nogareda *et al.*, 2014). Conhecer a prevalência da toxoplasmose, bem como os principais fatores de risco para a sua transmissão na população geral, e principalmente em mulheres em idade fértil são de essencial importância para a elaboração de programas estratégicos de prevenção da toxoplasmose adquirida e congênita.

Nesse sentido nosso estudo propõe como hipótese explanatória para a baixa prevalência encontrada entre crianças (Wilken 2003) que vivem em áreas altamente contaminadas, inclusive em Campos dos Goytacazes e Belém, é que a principal fonte de infecção nesse grupo etário se dá pela ingestão de oocistos de *T. gondii*. Sendo assim, os testes convencionais atualmente presentes no mercado não são capazes de identificar a presença desses anticorpos específicos devido ao antígeno utilizado nesses testes (principalmente P30).

## VII. CONCLUSÃO

- A prevalência estimada pelo teste de ELISA convencional em crianças de 0 a 64 meses de idade foi de 6,25-13,4%, já entre as mães a prevalência encontrada foi de 71% corroborando com dados já descritos para as regiões de estudo;
- Considerando os valores de *cut off* selecionados por meio do desenvolvimento de curva ROC, a prevalência encontrada no teste de ELISA TgERP foi superior ao encontrado no teste de ELISA convencional entre as crianças, variando entre 31,25 e 41%, respectivamente para a presença das imunoglobulinas IgG e IgA anti-TgERP, indicando que a principal via de infecção da toxoplasmose em Campos dos Goytacazes é por meio da ingestão de oocistos;
- A identificação de anticorpos anti-TgERP a partir de 14 meses (IgA em saliva) e a partir de 22 meses de idade (IgG no soro) indica que em áreas endêmicas a ingestão de oocistos apresenta-se como fator de risco para esta faixa etária;
- Foi demonstrada correlação positiva significativa entre os níveis de anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* (em ELISA convencional) e IgG e IgA anti-TgERP corroborando dados prévios de que a combinação de duas ou mais imunoglobulinas específicas tem importância diagnóstica confirmatória, especialmente para situações onde o diagnóstico se torna essencialmente importante e o estudo de fatores de risco é limitante pelo fator etário;
- No presente estudo foi detectada a presença de anticorpos específicos anti-TgERP em diferentes amostras biológicas: saliva, soro, leite materno e fezes;



- Foi confirmada a correlação positiva entre a presença de anticorpos específicos contra *T. gondii* tanto em crianças como em suas mães, em ambas cidades avaliadas nesse estudo.

## VIII. REFERÊNCIAS

- Abreu, A. M. O. W. Estudo Epidemiológico da Toxoplasmose Congênita no Município de Campos dos Goytacazes, 2003. Tese De Doutorado. Universidade Estadual Do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos Dos Goytacazes, Rj.
- Abu-Madi M a, Al-Molawi N, Behnke JM 2008. Seroprevalence and epidemiological correlates of *Toxoplasma gondii* infections among patients referred for hospital-based serological testing in Doha, Qatar. *Parasit. Vectors* 1: 39.
- Aksu G, Genel F, Koturoğlu G, Kurugöl Z, Kütükçüler N Serum immunoglobulin (IgG, IgM, IgA) and IgG subclass concentrations in healthy children: a study using nephelometric technique. *Turk. J. Pediatr.* 48: 19–24.
- Amendoeira MR, Coutinho SG 1982. Isolation of *Toxoplasma gondii* from the saliva and tonsils of a three-year-old child. *J. Infect. Dis.* 145: 587.
- Amendoeira MR, Sobral CA, Teva A, Lima JN de, Klein CH 2003. [Serological survey of *Toxoplasma gondii* infection in isolated Amerindians, Mato Grosso]. *Rev Soc Bras Med Trop* 36: 671–676.
- Ashburn D, Joss AW, Pennington TH, Ho-Yen DO 1998. Do IgA, IgE, and IgG avidity tests have any value in the diagnosis of toxoplasma infection in pregnancy? *J. Clin. Pathol.* 51: 312–315.
- Aubert D, Maine GT, Villena I, Hunt JC, Howard L, Sheu M, Brojanac S, Chovan LE, Nowlan SF, Pinon JM 2000. Recombinant Antigens To Detect *Toxoplasma gondii*-Specific Immunoglobulin G and Immunoglobulin M in Human Sera by Enzyme Immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* 38: 1144–1150.
- Aubert D, Villena I 2009. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in water: proposition of a strategy and evaluation in Champagne-Ardenne Region, France. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104: 290–295.
- Bahia-Oliveira LMG, Jones JL, Azevedo-Silva J, Alves CCF, Oréface F, Addiss DG 2003. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 9: 55–62.

- Bahia-Oliveira L, Rangel, ALP, Boechat, MSB, Mangiavacchi, BM, Martins, LM, Ferraz, FB, Almeida, MB, Peixoto, EMW, Vieira, FP, Peixe R 2012. Immunological and Immunogenetic Parameters on the Diversity of Ocular Toxoplasmosis: Evidence to Support Morphological Criteria to Classify Retinal / Retinochoroidal Scar Lesions in Epidemiologic Surveys. *Toxoplasmosis – Recent Adv.* Chapter 8: 145–172.
- Balasundaram MB, Andavar R, Palaniswamy M, Venkatapathy N 2010. Outbreak of acquired ocular toxoplasmosis involving 248 patients. *Arch. Ophthalmol. (Chicago, Ill. 1960)* 128: 28–32.
- Benenson MW, Takafuji ET, Lemon SM, Greenup RL, Sulzer AJ 1982. Oocyst-transmitted toxoplasmosis associated with ingestion of contaminated water. *N. Engl. J. Med.* 307: 666–669.
- Bobić B, Sibalić D, Djurković-Djaković O 1991. High levels of IgM antibodies specific for *Toxoplasma gondii* in pregnancy 12 years after primary toxoplasma infection. Case report. *Gynecol. Obstet. Invest.* 31: 182–184.
- Boia MN, Carvalho-Costa FA, Sodre FC, Pinto GM, Amendoeira MR 2008. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among indian people living in Iauarete, Sao Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 50: 17–20.
- Bowie WR, King AS, Werker DH, Isaac-Renton JL, Bell A, Eng SB, Marion SA 1997. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. The BC *Toxoplasma* Investigation Team. *Lancet (London, England)* 350: 173–177.
- Boyer K, Hill D, Mui E, Wroblewski K, Karrison T, Dubey JP, Sautter M, Noble AG, Withers S, Swisher C, Heydemann P, Hosten T, Babiarz J, Lee D, Meier P, McLeod R 2011. Unrecognized ingestion of *Toxoplasma gondii* oocysts leads to congenital toxoplasmosis and causes epidemics in North America. *Clin. Infect. Dis.* 53: 1081–1089.
- Buzoni-Gatel D, Schulthess J, Menard LC, Kasper LH 2006. Mucosal defences against orally acquired protozoan parasites, emphasis on *Toxoplasma gondii* infections. *Cell. Microbiol.* 8: 535–544.
- Buzoni-Gatel D, Werts C 2006. *Toxoplasma gondii* and subversion of the immune system. *Trends Parasitol.* 22: 448–452.

- Calder PC 2013. Feeding the immune system. *Proc. Nutr. Soc.* 72: 299–309.
- Candolfi E, Pastor R, Huber R, Filisetti D, Villard O 2007. IgG avidity assay firms up the diagnosis of acute toxoplasmosis on the first serum sample in immunocompetent pregnant women. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 58: 83–88.
- Carellós EVM, Andrade GMQ de, Vasconcelos-Santos DV, Januário JN, Romanelli RMC, Abreu MNS, Silva FM da, Loures IRC, Andrade JQ de, Caiaffa WT 2014. Adverse socioeconomic conditions and oocyst-related factors are associated with congenital toxoplasmosis in a population-based study in Minas Gerais, Brazil. *PLoS One* 9: e88588.
- Casciotti L, Ely KH, Williams ME, Khan IA 2002. CD8(+)-T-cell immunity against *Toxoplasma gondii* can be induced but not maintained in mice lacking conventional CD4(+) T cells. *Infect. Immun.* 70: 434–443.
- Cavalcante GT, Aguilar DM, Camargo LMA, Labruna MB, Andrade HF de, Meireles LR, Dubey JP, Thulliez P, Dias RA, Gennari SM 2006. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in humans from rural Western Amazon, Brazil. *J. Parasitol.* 92: 647–649.
- Chacin-Bonilla L, Sanchez-Chavez Y, Monsalve F, Estevez J 2001. Seroepidemiology of Toxoplasmosis in Amerindians from Western Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65: 131–135.
- Chahed Bel-Ochi N, Bouratbine A, Mousli M 2013. Enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant SAG1 antigen to detect *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G antibodies in human sera and saliva. *Clin. Vaccine Immunol.* 20: 468–473.
- Chapey E, Meroni V, Bollani L, Garcia P, Wallon M 2015. Use of IgG in Oral Fluid To Monitor Infants with Suspected. 22: 398–403.
- Chomel BB, Sun B 2011. Zoonoses in the bedroom. *Emerg. Infect. Dis.* 17: 167–172.
- Cohen SB, Denkers EY 2015. The gut mucosal immune response to *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol.* 37: 108–117.
- Contreras MC, Sandoval L, Salinas P, Muñoz P, Vargas S [Diagnostic use of ELISA, IgG,

- IgM, IgA and ELISA IgG avidity in recent and chronic toxoplasmosis]. *Boletín Chil. Parasitol.* 55: 17–24.
- Correa D, Cañedo-Solares I, Ortiz-Alegría LB, Caballero-Ortega H, Rico-Torres CP 2007. Congenital and acquired toxoplasmosis: diversity and role of antibodies in different compartments of the host. *Parasite Immunol.* 29: 651–660.
- Dattoli VCC, Veiga R V, Cunha SS, Pontes-de-Carvalho L, Barreto ML, Alcantara-Neves NM 2011. Oocyst ingestion as an important transmission route of *Toxoplasma gondii* in Brazilian urban children. *J. Parasitol.* 97: 1080–1084.
- Dubey JP The history of *Toxoplasma gondii*--the first 100 years. *J. Eukaryot. Microbiol.* 55: 467–475.
- Dubey JP 1988. Long-term persistence of *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs inoculated with *T. gondii* oocysts and effect of freezing on viability of tissue cysts in pork. *Am. J. Vet. Res.* 49: 910–913.
- Dubey JP 2006. Comparative infectivity of oocysts and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* for intermediate (mice) and definitive (cats) hosts. *Vet. Parasitol.* 140: 69–75.
- Dubey JP 2009. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 39: 877–882.
- Dubey JP, Lago EG, Gennari SM, Su C, Jones JL 2012. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology* 139: 1375–1424.
- Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 267–299.
- Dumètre A, Bras C Le, Baffet M, Meneceur P, Dubey JP, Derouin F, Duguet J-P, Joyeux M, Moulin L 2008. Effects of ozone and ultraviolet radiation treatments on the infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts. *Vet. Parasitol.* 153: 209–213.
- Duong TH, Dufillot D, Martz M, Richard-Lenoble D, Kombila M 1992. Seroepidemiological study of toxoplasmosis in Libreville, Gabon. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop. (1920).* 72:

289–293.

- E. D, F. F, E. S, M. A, G. G, A. A 2005. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in northern Greece during the last 20 years. *Clin. Microbiol. Infect.* 11: 719–723.
- Ertug S, Okyay P, Turkmen M, Yuksel H 2005. Seroprevalence and risk factors for toxoplasma infection among pregnant women in Aydin province, Turkey. *BMC Public Health* 5: 66.
- Etheredge D 1995. Human *Toxoplasma* Infection in Kuna and Embera Children in the Bayano and San Blas , Eastern Panama. 53: 448–457.
- Etheredge GD, Frenkel JK 1995. Human *Toxoplasma* infection in Kuna and Embera children in the Bayano and San Blas, eastern Panama. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53: 448–457.
- Etheredge GD, Michael G, Muehlenbein MP, Frenkel JK 2004. The roles of cats and dogs in the transmission of *Toxoplasma* infection in Kuna and Embera children in eastern Panama. *Rev. Panam. Salud Publica* 16: 176–186.
- Fan C-K, Lee L-W, Liao C-W, Huang Y-C, Lee Y-L, Chang Y-T, Costa Â dos SRJ da, Gil V, Chi L-H, Nara T, Tsubouchi A, Akinwale OP 2012. *Toxoplasma gondii* infection: relationship between seroprevalence and risk factors among primary schoolchildren in the capital areas of Democratic Republic of São Tomé and Príncipe, West Africa. *Parasit. Vectors* 5: 141.
- Fan CK, Liao CW, Kao TC, Lu JL, Su KE 2001. *Toxoplasma gondii* infection: relationship between seroprevalence and risk factors among inhabitants in two offshore islands from Taiwan. *Acta Med. Okayama* 55: 301–308.
- Ferguson DJP 2009. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. *Memórias do Inst. Oswaldo Cruz* 104: 133–148.
- Ferreira MU, Hiramoto RM, Aureliano DP, Silva-Nunes M Da, Silva NS Da, Malafronte RS, Muniz PT 2009. A community-based survey of human toxoplasmosis in rural Amazonia: Seroprevalence, seroconversion rate, and associated risk factors. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 81: 171–176.
- Field CJ 2005. The Immunological Components of Human Milk and Their Effect on Immune

- Development in Infants. *J. Nutr.* 135: 1–4.
- Filiseti D, Candolfi E 2004. Immune response to *Toxoplasma gondii*. *Ann. dell'Istituto Super. di sanità* 40: 71–80.
- Flegr J 2013a. Influence of latent *Toxoplasma* infection on human personality, physiology and morphology: pros and cons of the *Toxoplasma*-human model in studying the manipulation hypothesis. *J. Exp. Biol.* 216: 127–133.
- Flegr J 2013b. How and why *Toxoplasma* makes us crazy. *Trends Parasitol.* 29: 156–163.
- Francisco FDM, Souza SLP De, Gennari SM, Pinheiro SR, Muradian V, Soares RM 2006. Seroprevalence of toxoplasmosis in a low-income community in the São Paulo municipality, SP, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 48: 167–170.
- Frenkel JK, Dubey JP, Miller NL 1970. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science* 167: 893–896.
- Frenkel JK, Lindsay DS, Parker BB, Dobesh M 2003. Dogs as possible mechanical carriers of *Toxoplasma*, and their fur as a source of infection of young children [4]. *Int. J. Infect. Dis.* 7: 292–293.
- Frenkel JK, Parker BB 1996. An apparent role of dogs in the transmission of *Toxoplasma gondii*. The probable importance of xenosmophilia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 791: 402–407.
- Gallas-Lindemann C, Sotiriadou I, Mahmoodi MR, Karanis P 2013. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in different water resources by Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP). *Acta Trop* 125: 231–236.
- Garcia Bahia-Oliveira LM, Jones JL, Azevedo-Silva J, Alves CCF, Oréface F, Addiss DG 2003. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in North Rio de Janeiro State, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 9: 55–62.
- Garweg JG, Garweg S-DL, Flueckiger F, Jacquier P, Boehnke M 2004. Aqueous humor and serum immunoblotting for immunoglobulin types G, A, M, and E in cases of human ocular toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* 42: 4593–4598.
- Gómez-Marín JE, Montoya-De-Londoño MT, Castaño-Osorio JC, Heine FA, Duque AM,

- Chemla C, Aubert D, Bonhomme A, Pinon JM Frequency of specific anti-Toxoplasma gondii IgM, IgA and IgE in colombian patients with acute and chronic ocular toxoplasmosis. *Memórias do Inst. Oswaldo Cruz* 95: 89–94.
- Guimarães FN 1943. Toxoplasmose humana: meningoencefalomielite toxoplasmica: ocorrência em adulto e recém-nascido. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 38: 257–320.
- Hanson LA 2007. Session 1: Feeding and infant development breast-feeding and immune function. *Proc. Nutr. Soc.* 66: 384–396.
- Heukelbach J, Meyer-Cirkel V, Moura RCS, Gomide M, Queiroz JAN, Saweljew P, Liesenfeld O 2007. Waterborne toxoplasmosis, northeastern Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 13: 287–289.
- Hill D, Coss C, Dubey JP, Wroblewski K, Sautter M, Hosten T, Munoz-Zanzi C, Mui E, Withers S, Boyer K, Hermes G, Coyne J, Jagdis F, Burnett A, McLeod P, Morton H, Robinson D, McLeod R 2011. Identification of a sporozoite-specific antigen from *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol* 97: 328–337.
- Jaisson-Hot I, Wallon M, Kurdi M al, Thulliez P, Kahi S, Cozon G, Peyron F 2001. [Congenital toxoplasmosis. Transitory negative serology]. *Presse Med.* 30: 1001–1004.
- Jiang W, Sullivan AM, Su C, Zhao X 2012. An agent-based model for the transmission dynamics of *Toxoplasma gondii*. *J. Theor. Biol.* 293: 15–26.
- Jones JL, Dubey JP 2010. Waterborne toxoplasmosis--recent developments. *Exp. Parasitol.* 124: 10–25.
- Jones JL, Kruszon-Moran D, Sanders-Lewis K, Wilson M 2007. *Toxoplasma gondii* infection in the United States, 1999 2004, decline from the prior decade. *Am J Trop Med Hyg* 77: 405–410.
- Jones JL, Lopez B, Mury MA, Wilson M, Klein R, Luby S, Maguire JH 2005. *Toxoplasma Gondii* Infection in Rural Guatemalan Children. *Trop. Med.* 72: 295–300.
- Karanis P, Aldeyarbi HM, Mirhashemi ME, Khalil KM 2013. The impact of the waterborne transmission of *Toxoplasma gondii* and analysis efforts for water detection: an overview and update. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 20: 86–99.



- Karanis P, Kourenti C, Smith H 2007. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *J. Water Health* 5: 1–38.
- Kasper L, Courret N, Darche S, Luangsay S, Mennechet F, Minns L, Rachinel N, Ronet C, Buzoni-Gatel D 2004. Toxoplasma gondii and mucosal immunity. *Int. J. Parasitol.* 34: 401–409.
- Kelly D, Coutts AG 2000. Early nutrition and the development of immune function in the neonate. *Proc. Nutr. Soc.* 59: 177–185.
- Khalil KM, Ahmed AA, Elrayah IE 2012. Sero-prevalence of Toxoplasma gondii infection in humans in Khartoum State, Sudan. *Int. J. Trop. Med.*: 143–150. 44 ref.
- Kim K, Weiss LM 2008. Toxoplasma: the next 100years. *Microbes Infect.* 10: 978–984.
- Kodym P, Machala L, Roháčová H, Sirocká B, Malý M 2007. 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: 40–47.
- Krueger WS, Hilborn ED, Converse RR, Wade TJ 2014. Drinking water source and human Toxoplasma gondii infection in the United States: a cross-sectional analysis of NHANES data. *BMC Public Health* 14: 711.
- Lambert H, Barragan A 2010. Modelling parasite dissemination: host cell subversion and immune evasion by Toxoplasma gondii. *Cell. Microbiol.* 12: 292–300.
- Lassa, Pietkiewicz H, Modzelewska E, Dumètre a, Szostakowska B, Myjak P 2009. Detection of Toxoplasma gondii oocysts in environmental soil samples using molecular methods. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 28: 599–605.
- Levi GC, Hyakutake S, Amato Neto V, Corrêa MOA 1968. Observações complementares sobre a presença do Toxoplasma gondii na saliva de pacientes com toxoplasmose. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2: 275–278.
- Liao CW, Lee YL, Sukati H, D'Lamini P, Huang YC, Chiu CJ, Liu YH, Chou CM, Chiu WT, Du WY, Hung CC, Chan HC, Chu B, Cheng HC, Su J, Tu CC, Cheng CY, Fan CK 2009. Seroprevalence of Toxoplasma gondii infection among children in Swaziland, southern Africa. *Ann Trop Med Parasitol* 103: 731–736.

- Liu Q, Wang Z, Huang S, Zhu X 2015. Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. *PLoS One* 10: 1–14.
- Lopes FMR, Freire RL, Navarro IT 2008. PRESENCE OF DOMESTICATED CATS AND VISUAL IMPAIRMENT ASSOCIATED TO *Toxoplasma gondii* SERUM POSITIVE CHILDREN AT AN ELEMENTARY SCHOOL IN JATAIZINHO , STATE OF PARANÁ , BRAZIL. *Rev. Bras. Parasitol.* 15: 12–15.
- Loyola A M, Durighetto A F, Silva D A, Mineo JR 1997. Anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulins A and G in human saliva and serum. *J. Oral Pathol. Med.* 26: 187–191.
- Lynch MI, Malagueño E, Lynch LF, Ferreira S, Stheling R, Oréfice F 2009. Anti-*Toxoplasma gondii* secretory IgA in tears of patients with ocular toxoplasmosis: immunodiagnostic validation by ELISA. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104: 818–822.
- Martinez EZ, Louzada-Neto F, Pereira B de B A curva ROC para testes diagnósticos. *Cad. saúde colet., (Rio J.)* 11: 7–31.
- Meek B, Gool T van, Gilis H, Peek R 2001. Dissecting the IgM antibody response during the acute and latent phase of toxoplasmosis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 41: 131–137.
- Mineo JR, McLeod R, Mack D, Smith J, Khan IA, Ely KH, Kasper LH 1993. Antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (SAG-1, P30) inhibit infection of host cells and are produced in murine intestine after peroral infection. *J. Immunol.* 150: 3951–3964.
- Montoya JG, Liesenfeld O 2004. Toxoplasmosis. *Lancet (London, England)* 363: 1965–1976.
- Moura L De, Garcia Bahia-Oliveira LM, Wada MY, Jones JL, Tuboi SH, Carmo EH, Ramalho WM, Camargo NJ, Trevisan R, Graça RMT, Silva AJ Da, Moura I, Dubey JP, Garrett DO 2006. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. *Emerg. Infect. Dis.* 12: 326–329.
- Muñoz-Zanzi CA, Fry P, Lesina B, Hill D 2010. *Toxoplasma gondii* Oocyst-specific antibodies and source of infection. *Emerg. Infect. Dis.* 16: 1591–1593.
- Munoz M, Liesenfeld O, Heimesaat MM 2011. Immunology of *Toxoplasma gondii*. *Immunol. Rev.* 240: 269–285.

- Negash T, Tilahun G, Medhin G 2008. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Nazaret town, Ethiopia. *East Afr. J. Public Health* 5: 211–214.
- Neto EC 2000. High prevalence of congenital toxoplasmosis in Brazil estimated in a 3-year prospective neonatal screening study. *Int. J. Epidemiol.* 29: 941–947.
- Neto EC, Rubin R, Schulte J, Giugliani R 2004. Newborn screening for congenital infectious diseases. *Emerg. Infect. Dis.* 10: 1068–1073.
- Ngui R, Lim YAL, Amir NFH, Nissapatorn V, Mahmud R 2011. Seroprevalence and sources of toxoplasmosis among Orang Asli (indigenous) communities in Peninsular Malaysia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 85: 660–666.
- Nogareda F, Strat Y Le, Villena I, Valk H De, Goulet V 2014. Incidence and prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in women in France, 1980-2020: model-based estimation. *Epidemiol. Infect.* 142: 1661–1670.
- Oliveira AC de M, Borges HDS, Carvalho FR, Macêdo AG de, Mota CM, Oliveira AM de M, Santiago FM, Araújo CGA, Silva DA de O, Mineo TWP, Abdallah VOS, Mineo JR 2015. Evaluation of colostrum as an alternative biological sample for the diagnosis of human congenital toxoplasmosis. *BMC Infect. Dis.* 15: 519.
- Pappas G, Roussos N, Falagas ME 2009. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *Int. J. Parasitol.* 39: 1385–1394.
- Paradisi F, Bartoloni A, Aquilini D, Roselli M, Nunez LE, Manzone G, Majo E De, Parri F 1989. Serological survey of toxoplasmosis in the Santa Cruz region of Bolivia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 83: 213–214.
- Paul M 1997. [Use of the ISAGA method in detection of specific IgM, IgA, IgE antibodies in acquired and congenital toxoplasmosis]. *Wiadomości Parazytol.* 43: 39–51.
- Pereira LH, Staudt M, Tanner CE, Embil JA 1992. Exposure to *Toxoplasma gondii* and cat ownership in Nova Scotia. *Pediatrics* 89: 1169–1172.
- Perry MM, Shohat T, Riklis I, Avni R, Yujelevski-Rozenblit D, Bassal R, Cohen D, Rorman E 2014. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in the Israeli population.

- Epidemiol. Infect.*: 149–155.
- Petersen E 2007. Toxoplasmosis. *Semin. Fetal Neonatal Med.* 12: 214–223.
- Petersen E, Pollak A, Reiter-Owona I 2001. Recent trends in research on congenital toxoplasmosis. *Int. J. Parasitol.* 31: 115–144.
- Piergili Fioretti D 2004. [Problems and limitations of conventional and innovative methods for the diagnosis of Toxoplasmosis in humans and animals]. *Parassitologia* 46: 177–181.
- Portela RWD, Bethony J, Costa MI, Gazzinelli A, Vitor RWA, Hermeto FM, Correa-Oliveira R, Gazzinelli RT 2004. A multihousehold study reveals a positive correlation between age, severity of ocular toxoplasmosis, and levels of glycoinositolphospholipid-specific immunoglobulin A. *J. Infect. Dis.* 190: 175–183.
- Remington J 2011. Infectious diseases of the fetus and newborn infant.
- Remington JS, Thulliez P, Montoya JG 2004. MINIREVIEW Recent Developments for Diagnosis of Toxoplasmosis. 42: 941–945.
- Rey LC, Ramalho ILC 1999. Seroprevalence of Toxoplasmosis in Fortaleza , Ceará , Brazil. 41: 171–174.
- Ricciardi ID, Daniel F, Mayrink W 1973. Preliminary Notes on the Prevalence of Human. : 516–517.
- Robert-Gangneux F, Dard?? ML 2012. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 25: 264–296.
- Sabin AB, Feldman HA 1948. Dyes as Microchemical Indicators of a New Immunity Phenomenon Affecting a Protozoon Parasite (Toxoplasma). *Science* 108: 660–663.
- Salahi-Moghaddam A, Hafizi A 2009. A serological study on Toxoplasma gondii infection among people in south of Tehran, Iran. *Korean J. Parasitol.* 47: 61–63.
- Sampaio BFC, Macre MS, Meireles LR, Andrade HF 2014. Saliva as a source of anti-Toxoplasma gondii IgG for enzyme immunoassay in human samples. *Clin. Microbiol. Infect.* 20: 1–3.

- Santana SS, Gebrim LC, Carvalho FR, Barros HS, Barros PC, Pajuaba ACAM, Messina V, Possenti A, Cherchi S, Reiche EM V., Navarro IT, Garcia JL, Pozio E, Mineo TWP, Spano F, Mineo JR 2015. CCp5A Protein from *Toxoplasma gondii* as a Serological Marker of Oocyst-driven Infections in Humans and Domestic Animals. *Front. Microbiol.* 6.
- Sensini A 2006. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy: opportunities and pitfalls of serological diagnosis. *Clin. Microbiol. Infect.* 12: 504–512.
- Sharif M, Daryani a, Barzegar G, Nasrolahei M 2010. A seroepidemiological survey for toxoplasmosis among schoolchildren of Sari, Northern Iran. *Trop. Biomed.* 27: 220–225.
- Simister NE 2003. Placental transport of immunoglobulin G. *Vaccine* 21: 3365–3369.
- Singh S, Munawwar A, Rao S, Mehta S, Hazarika NK 2014. Serologic prevalence of *Toxoplasma gondii* in Indian women of child bearing age and effects of social and environmental factors. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8: e2737.
- Smith G 2013. Food- and water-borne disease: Using case control studies to estimate the force of infection that accounts for primary, sporadic cases. *Epidemics* 5: 77–84.
- Souza W, Berlfort Jr R 2014. *Toxoplasmose e Toxoplasma Gondii*. Editora Fiocruz.
- Sroka S, Bartelheimer N, Winter A, Heukelbach J, Ariza L, Ribeiro H, Oliveira FA, Queiroz AJN, Alencar C, Liesenfeld O 2010. Prevalence and risk factors of toxoplasmosis among pregnant women in Fortaleza, Northeastern Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 83: 528–533.
- Stagno S, Thiermann E 1973. Acquisition of toxoplasma infection by children in a developing country. *Bull World Heal. Organ* 49: 627–631.
- Stroehle A, Schmid K, Heinzer I, Naguleswaran A PERFORMANCE OF A WESTERN IMMUNOBLOT ASSAY TO DETECT SPECIFIC ANTI- TOXOPLASMA GONDII IGG ANTIBODIES IN HUMAN SALIVA ANTI-TOXOPLASMA GONDII IGG ANTIBODIES IN HUMAN SALIVA.
- Swanzy SR, Bacina RM, Condon J, Hofga WT, Gupta M, Matlock PE, Bergeron DL, Plorde JJ 1997. Detection of Immunoglobulin G ( IgG ) and IgM Antibodies to *Toxoplasma*

- gondii : Evaluation of Four Commercial Immunoassay Systems. 35: 3313–3315.
- Taylor MRH, Lennon B, Holland C V, Cafferkey M 1997. Community study of toxoplasma antibodies in urban and rural schoolchildren aged 4 to 18 years. *Arch. Dis. Child.* 77: 406–409.
- VanWormer E, Fritz H, Shapiro K, Mazet JAK, Conrad PA 2013. Molecules to modeling: Toxoplasma gondii oocysts at the human-animal-environment interface. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 36: 217–231.
- Vieira FP, Alves M da G, Martins LM, Rangel ALP, Dubey JP, Hill D, Bahia-Oliveira/ LMG 2015. Waterborne toxoplasmosis investigated and analysed under hydrogeological assessment: new data and perspectives for further research. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 110: 929–935.
- Wang Y, Yin H 2014. Research progress on surface antigen 1 (SAG1) of Toxoplasma gondii. *Parasit. Vectors* 7: 180.
- Weiss LM, Dubey JP 2009. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *Int. J. Parasitol.* 39: 895–901.
- Wilson CB, Nizet V, Remington JS, Klein JO, Maldonado Y 2010. *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn*. Elsevier Health Sciences.
- Wilson M, Remington JS, Clavet C, Varney G, Press C, Ware D, Fda THE, Ad T, Working HOC, Herman CL, Shively RG, Simms TE, Gaffey CM, Nutter CD, Langone JJ 1997. Evaluation of Six Commercial Kits for Detection of Human Immunoglobulin M Antibodies to Toxoplasma gondii. 35: 3112–3115.
- Ygberg S, Nilsson A 2012. The developing immune system - from foetus to toddler. *Acta Paediatr.* 101: 120–127.