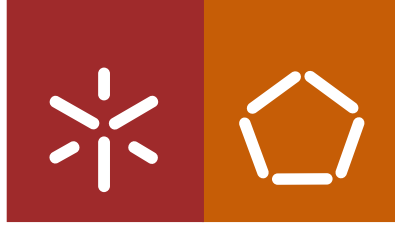




**Universidade do Minho**  
Escola de Engenharia

Carlos Henrique Bezerra de Oliveira

## **Comparação de métodos de identificação de imunoglobulinas para diagnóstico de toxoplasmose**



**Universidade do Minho**  
Escola de Engenharia

Carlos Henrique Bezerra de Oliveira

**Comparação de métodos de identificação  
de imunoglobulinas para diagnóstico  
de toxoplasmose**

Tese de Doutoramento em Engenharia Biomédica

Trabalho efetuado sob a orientação da  
**Doutora Mariana Contente Rangel Henriques**

julho de 2019

## DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.

*Licença concedida aos utilizadores deste trabalho*



Atribuição

CC BY

## Agradecimentos

Ao **Cristo**, que os seus ensinamentos sejam usados para distribuir a paz e o amor. Que aqueles que utilizam seus ensinamentos para justificar barbáries, preconceitos e intolerâncias recebam o Espírito Santo. Fazei de mim um instrumento de vossa paz.

A **Dilza**, companheira de todas as horas e grande mulher que com sabedoria se aloja no meu coração. Ser marido e pai é uma missão maravilhosa, com muitos desafios, mas que nos fazem crescer muito. Amo nossa família. Vocês são a razão de viver e dá sentido à minha existência. Te amo! **Maria Alice**, estrela singular. “Não sei se o mundo é bom, mas ele ficou melhor quando você chegou” e “tudo ficou mais lindo”. O Raman e o FTIR, às vezes, se confundiam com a casa das bonecas. Você me ensinou um amor incondicional. Percebi que amor se dá sem se pedir nada em troca. Com você tenho me redescoberto, tenho aprendido a viver. Te amo! **Gabriel**, o sorriso dos céus. Sua chegada completou nossas vidas com mais alegria e amor e deu-me a ideia de que era possível aumentar o amor que já existia e de repente senti como se a minha vida já não me pertencesse. Senti a alma cheia de amor e o meu coração fora de mim. Te amo!

**Mainha**, minha *Lady*Laura. Foram inúmeras as vezes que parei esta tese para lembrar de ti, agradecendo de forma silenciosa tudo que me ensinou. Você partiu para outro mundo, mas deixou em mim um universo de amor e nos momentos mais felizes sinto a tristeza da sua ausência. Um dia nos abraçaremos de novo. **Painho**, levarei sempre comigo sua determinação e coragem para enfrentar os obstáculos da vida. Sei que posso contar contigo em todas as situações, nos momentos fáceis e nos difíceis. **Christianne** e **Trébia**, uma irmã também é metade de nós, sem vocês não sou nada e com vocês sou tudo. A vida entre irmãos é construir diariamente uma amizade verdadeira e eterna. **Vinicius**, você não é meu filho, mas é um sobrinho tão especial para mim que mais parece irmão de Maria Alice e Gabriel. Te amo. Aos que já partiram: **tia Marlene, tio José Reis, vovó Zefa, Vovô Antônio Alexandre, vovô Damião, vovó Nega e tia Maria Neuza**. A lembrança de vocês continua viva. Minha saudade é um sentimento que não partiu e ocupa muito espaço em meu coração, parecendo que ele fala pelos meus olhos. Aos **primos e amigos**, peças fundamentais para a conclusão deste trabalho. Os melhores amigos não precisam demonstrar sua amizade, porque a ligação está à vista de todo mundo.

A professora **Mariana Henriques**, orientadora que soube ensinar, cativar e motivar. Uma boa professora é aquela que inspira seus alunos a aprender e os ensina a pensarem por si. Ao amigo *Vimaranense*, **Felipe Felix**: esta tese deu resultados antes de ser produzida. Sua amizade ficará eterna e sempre que retornar a Guimarães iremos gritar para incentivar o poderoso Vitória.

Ao **IFRN**, Instituição que investe e aposta em seus servidores. Local de trabalho que tenho grande satisfação em lecionar. Ministro as aulas como se fosse para meus filhos.

Aos **meus alunos**, também dedico este trabalho. O conhecimento produzido aqui será amplamente utilizado por vocês.

## DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

## Comparação de métodos de identificação de imunoglobulinas para diagnóstico de toxoplasmose

### Resumo

O *Toxoplasma gondii* é um protozoário de grande abrangência, causador da toxoplasmose. Possui grande impacto na saúde pública, pois é preocupante em pacientes imunodeprimidos, com distúrbios psiquiátricos e principalmente em gestantes, podendo causar sequelas irreversíveis para o feto ou causar aborto. A epidemiologia da toxoplasmose apresenta seroprevalências diversificadas, dependendo de hábitos alimentares e da qualidade da água. A interpretação da sorologia é importante para que os possíveis danos da infecção sejam sanados. Os diferentes métodos de diagnóstico da toxoplasmose existentes no mercado possuem sensibilidade e especificidade variáveis, sendo da responsabilidade dos profissionais de saúde a escolha do melhor método. No entanto, a busca por métodos mais eficazes e com melhor resposta, sendo também economicamente mais viáveis. Assim, esta pesquisa teve como objetivo principal a utilização de duas técnicas espectroscópicas (Raman e FTIR - *Fourier Transform infrared*) para a detecção de anticorpos antitoxoplasmose no sangue de pacientes, por comparação com o método tradicional de ECLIA (*eletroquimioluminescência*). Além da comparação dos métodos foi também efetuado um perfil epidemiológico da população de modo a identificar os fatores que são responsáveis pela distribuição da doença na região estudada. Foi também realizado um estudo econômico de comparação dos testes. Um total de 400 amostras foram coletadas em um laboratório de análises clínicas da cidade de Natal (Brasil) e estas foram preparadas para posterior análise nos aparelhos e o resultado dicotômico (ausência/presença das imunoglobulinas) foi analisado por estatística multivariada. Nestas metodologias foram obtidos espectros específicos, baseados em mudanças nas bandas através da transformação das moléculas para ambos os anticorpos (IgG/IgM). Foram utilizados métodos estatísticos para avaliar a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo, índice Kappa, curva ROC, regressão logística binária e verossimilhança positiva e negativa, além da relação custo - efetividade dos métodos espectrofotométricos testados, por comparação com o ECLIA. Analisando os resultados da epidemiologia verificou-se que as variáveis faixa etária, sexo e conhecimento da doença são fatores de risco para a presença de IgG. A curva ROC estimada para o modelo foi de 0,614, indicando que o modelo prediz corretamente o resultado para IgG em 61,4% dos casos. O perfil sorológico, pela medição do ECLIA, dos pacientes analisados permitiu identificar suscetibilidade ao *T. gondii* de 35%. As amostras detentoras da IgG obtiveram a frequência de 65%. A partir dos resultados dos espectros produzidos por Raman e FTIR, gerou-se um resultado dicotômico (Positivo/Negativo) para as amostras onde foram realizadas as análises estatísticas. Encontraram diferenças espectrais em faixas específicas, evidenciando mudanças estruturais nas moléculas presentes nas amostras, utilizando ambos os métodos. Com relação a detecção de IgG, o Raman apresentou resultado satisfatório em todas as variáveis estatísticas (IC 95%). O desempenho na detecção de IgM apresentou bom resultado na variável especificidade e Valor Preditivo Negativo (VPN). O FTIR apresentou desempenho abaixo do Raman tanto na detecção de IgG, quanto na de IgM. A avaliação econômica das técnicas identificou o Raman como a técnica de melhor custo efetividade, por conta de sua sensibilidade na detecção de IgG e IgM e melhor custo minimização, ou seja, o custo sem levar em consideração o valor efetivo da técnica (custos e detecção de IgG/IgM). De um modo global, os resultados demonstram que a espectroscopia Raman tem maior potencial de ser aplicado *in vitro* para classificar as imunoglobulinas de interesse, possuindo vantagens em relação ao FTIR. O Raman pode ser usado para complementar ou substituir o teste ECLIA, tornando-se uma ferramenta clínica importante e mais econômica que permite atuar na triagem sorológica da população com relação a toxoplasmose.

**Palavras-chave:** Epidemiologia. Espectrofotometria. Imunoglobulinas. Toxoplasma.

## Comparison of identification methods of immunoglobulins for diagnosis toxoplasmosis

### Abstract

*Toxoplasma gondii* is a large protozoan, which causes toxoplasmosis. It has a great impact on public health, specially in immunosuppressed patients, patients with psychiatric disorders, and in pregnant women that may cause irreversible sequelae to the fetus or cause abortion. The epidemiology of toxoplasmosis presents diverse seroprevalences, depending, for instances, on dietary habits and water quality. Interpretation of serology is important, so that possible damage from infection is remedied. The different methods of diagnosis of toxoplasmosis in the market have variable sensitivity and specificity, and health professionals are responsible for choosing the most appropriate method. However, the search for more effective methods, with better response, being also economically viable. Thus, the main objective of this research was the use of two spectroscopic techniques (Raman and FTIR - Fourier transform infrared) for the detection of anti-toxoplasmosis antibodies in the blood of patients, by comparison with the traditional method of ECLIA (electrochemiluminescence). In addition to the comparison of the methods, an epidemiological profile of the population was also carried out in order to identify the factors that are responsible for the distribution of the disease in the studied region. An economic study comparing the tests was also carried out. A total of 400 samples were collected in a clinical laboratory in the city of Natal, Brazil, and these were prepared for later analysis by the different methods and the dichotomous result (absence / presence of immunoglobulins) was analyzed by multivariate statistics. In these methodologies specific spectra were obtained, based on changes in the bands through the transformation of the molecules for both antibodies (IgG/IgM). Statistical methods were used to evaluate the sensitivity, specificity, positive and negative predictive value, Kappa index, ROC curve, binary logistic regression and positive and negative likelihood, as well as the cost-effectiveness of the spectrophotometric methods tested, in comparison with ECLIA. Analyzing the results of epidemiology, it was verified that the variables age, sex and knowledge of the disease are risk factors for the presence of IgG. The estimated ROC curve for the model was 0.614, indicating that the model correctly predicts the IgG result in 61.4% of the cases. The serological profile, through the ECLIA measurement, of the patients analyzed allowed the identification of susceptibility to *T. gondii* of 35%. IgG samples had a frequency of 65%. From the results of the spectra produced by Raman and FTIR, a dichotomous result (Positive / Negative) was generated for the samples where the statistical analyzes were performed. It was found spectral differences in specific bands, evidencing structural changes in the molecules present in the samples, using both methods. Regarding IgG detection, Raman presented satisfactory results in all statistical variables (95% CI). The performance in the detection of IgM showed good results in the variable specificity and Negative Predictive Value (NPV). FTIR presented lower performance in compared to Raman in the detection of both IgG and IgM. The economic evaluation of the techniques identified Raman as the most cost-effective technique, due to its sensitivity in the detection of IgG and IgM and better cost minimization, that is, the cost without taking into account the effective value of the technique (costs and detection IgG / IgM). In conclusion, the results demonstrate that Raman spectroscopy has a greater potential to be applied in vitro to classify the immunoglobulins of interest, having advantages over FTIR. Raman can be used to supplement or replace the ECLIA test, making it an important and cost-effective clinical tool that allows the population to perform serological screening for toxoplasmosis.

**Keywords:** Epidemiology. Immunoglobulins. Spectrophotometry. Toxoplasmosis.

Agradecimentos .....	iii
Resumo .....	v
Abstract .....	vi
Lista de abreviações .....	ix
Lista de equações .....	x
Lista de figuras .....	x
Lista de tabelas.....	xi
<b>Capítulo 1 – Estado da arte .....</b>	<b>14</b>
1.1 Introdução.....	15
1.2 Agente etiológico .....	15
1.3 Ciclo de vida e morfologia.....	16
1.4 Diversidade genética do <i>T. gondii</i> .....	21
1.5 Epidemiologia.....	22
1.5.1 Brasil .....	23
1.5.2 Portugal .....	24
1.5.3 Outros países .....	26
1.6 Transmissão.....	31
1.7 Quadro clínico .....	33
1.7.1 Toxoplasmose em imunocompetentes .....	33
1.7.2 Toxoplasmose em imunodeprimidos.....	35
1.7.3 Toxoplasmose congênita .....	35
1.8 Prevenção e tratamento.....	36
1.9 Interação com o hospedeiro.....	38
1.9.1 Resposta imune do hospedeiro.....	38
1.9.2 Estrutura e algumas propriedades de classes e subclasses de imunoglobulinas IgG e IgM.....	40
1.10 Métodos de diagnóstico da toxoplasmose.....	43
1.10.1 Reação em cadeia da polimerase .....	48
1.10.2 Reação de Aglutinação por Imunoabsorção.....	48
1.10.3 Hemaglutinação Indireta.....	49
1.10.4 Reação de Sabin e Feldman .....	49
1.10.5 Ensaio imunoenzimático .....	49
1.10.6 Ensaio de quimiluminescência.....	50
1.10.7 Imunofluorescência indireta.....	50
1.10.8 Teste de aglutinação em látex.....	50



1.10.9 Teste de avidéz de IgG no soro .....	50
1.10.10 <i>Western blot</i> .....	51
1.10.11 Método de Eletroquimioluminescência.....	51
1.10.12 Avaliação econômica das técnicas .....	52
1.11 Métodos espectrofotométricos de diagnóstico .....	54
1.11.1 Espectroscopia Raman.....	58
1.11.2 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) .....	65
<b>Capítulo 2 – Objetivos e estrutura da tese .....</b>	<b>70</b>
2.1 Objetivo geral .....	71
2.2 Objetivos específicos .....	72
<b>Capítulo 3 – Materiais e métodos .....</b>	<b>73</b>
3.1 Teste de ECLIA.....	74
3.2 Espectroscopia FTIR.....	75
3.3 Espectroscopia Raman .....	75
3.4 Bioestatística associada aos exames diagnósticos .....	75
3.5 Avaliação econômica dos métodos diagnósticos .....	81
<b>Capítulo 4 – Resultados e discussão.....</b>	<b>83</b>
4.1 Perfil epidemiológico.....	84
4.2 Avaliação dos métodos alternativos de diagnóstico .....	89
4.2.1 Análise dos espectros de FTIR.....	89
4.2.2 Análise dos espectros de Raman .....	91
4.2.3 Comparação estatística dos métodos de diagnóstico.....	93
4.3 Avaliação econômica dos métodos de diagnóstico.....	101
<b>Capítulo 5 – Conclusões .....</b>	<b>103</b>
5.1 Propostas de trabalho futuro.....	107
<b>Referencias .....</b>	<b>109</b>
<b>Anexo .....</b>	<b>143</b>
Anexo 1 – Aprovação CEP.....	144
<b>Apêndices .....</b>	<b>147</b>
Apêndice 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido – TCLE.....	148
Apêndice 2 – Termo de confidencialidade .....	152

## Lista de abreviações

---

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

CLIA - Imunoensaio quimioluminescente (*Chemiluminescent immunoassay*)

DGS - Direção Geral da Saúde

*DT* – Reação de Sabin-Feldman (Dye test)

ECDC - Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças (European Center for Disease Prevention and Control)

ECLIA – Imunoensaio Eletroquimioluminescente (Electrochemiluminescent immunoassay)

*EEE* – *Espaço Económico Europeu*

EFSA - Autoridade europeia de segurança alimentar (European Food Safety Authority)

ELISA - Ensaio de Imunoadsorção Enzimática (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

*EU* – União Europeia (European Union)

FTIR - Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared*)

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde

HAART - Terapia Antirretroviral Altamente Ativa (Highly Active Antiretroviral Therapy)

*HAI* – *Inibição de Hemaglutinação* (*Hemagglutination inhibition*)

HIV- Vírus da Imunodeficiência Humana (*Human Immunodeficiency Virus*)

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

*ISAGA* - Ensaio de aglutinação imunossorvente (Immunosorbent Agglutination Assay)

k – Kappa

LA – Líquido amniótico

LAT – Aglutinação em Látex (Latex agglutination)

NIR – Infravermelho Próximo (Near-Infrared)

*PCR* – Reação em Cadeia de Polimerase (Polymerase Chain Reaction)

PVDF – Difluoreto de polivinilideno (Polyvinylidene difluoride)

RIFI - Imunofluorescência indireta (Indirect immunofluorescence)

SAG - Antígeno de Superfície Geneticamente Modificado (*Genetically Modified Surface Antigens*)

VPN - *Valor Preditivo Negativo*

VPP – *Valor Preditivo Positivo*

WB – Ensaio imunoenzimático (Western Blot)

## Lista de equações

---

Equação 1 - Fórmula para cálculo da quantidade de amostras analisadas .....	76
Equação 2 - Equação para determinação de sensibilidade do teste.....	77
Equação 3 - Equação para determinação de especificidade do teste.....	77
Equação 4 - Equação para determinação do Valor Preditivo positivo do teste. ....	77
Equação 5 - Equação para determinação do Valor Preditivo negativo do teste .....	77
Equação 6 - Estatística de Kappa .....	78
Equação 7 - Equação para determinação do valor de Verossimilhança positiva .....	79
Equação 8 - Equação para determinação do valor de Verossimilhança negativa .....	80
Equação 9 - Equação da correlação de Pearson .....	80
Equação 10 - Fórmula custo minimização. $C_{\text{Raman/FTIR}} = \text{Custo Raman/FTIR} - C_{\text{ECLIA}} = \text{Custo ECLIA}$ .	81
Equação 11 - Rácio incremental custo-efetividade de IgG (extraído de Pereira, 2009).....	81

## Lista de figuras

---

Figura 1 - Ciclo biológico do <i>T. gondii</i> (Neves et al., 2011).....	17
Figura 2 - Imagem de taquizoítos de <i>T. gondii</i> - é possível distinguir núcleo e citoplasma e o microrganismo lembra um plasmócito em miniatura, sendo o núcleo excêntrico (Retirado de UFRGS, 2018).....	18
Figura 3 - Imagem de cisto tecidual contendo bradizoítos de <i>T. gondii</i> (Retirado de UFRGS, 2018).....	19
Figura 4 - Oocistos de <i>T. gondii</i> , forma excretada nas fezes de felinos (Dubey et al., 1998).....	20
Figura 5 - Taxas de mulheres grávidas soroprevalentes em quatro regiões do Brasil (Beck et al., 2010).....	24
Figura 6 - A prevalência típica de anticorpos contra o vírus Epstein-Barr (vírus EB), o citomegalovírus (CMV) e <i>Toxoplasma gondii</i> (TOXO) por idade, nos Estados Unidos (Extraído de Tortora et al., 2017) .....	29
Figura 7 - Cinética das imunoglobulinas envolvidas na infecção do <i>T. gondii</i> . A produção das imunoglobulinas é variável, dependendo do paciente. (Extraído de Dard et al., 2016).....	41
Figura 8 - Estrutura do IgG (extraído de Mader, 1997).....	42
Figura 9 - Estrutura do IgM com os 10 sítios de ligação com o antígeno, pontes dissulfetos e a cadeia J (Extraído de Schroeder & Cavacini, 2010).....	43
Figura 10 - Estratégias de diagnóstico para toxoplasmose. As estratégias de diagnóstico para detectar a toxoplasmose de acordo com a situação clínica e fundo imunológico do paciente, incluindo imunocompetentes, imunocomprometidos, grávidas e recém-nascidos (Zhang, Lin, Han, & Li, 2016) .....	46

Figura 11 - Ramos que a bioespectroscopia atua .....	55
Figura 12 - Diagrama esquemático do sistema espectroscópico Raman para análise de componentes do sangue.....	61
Figura 13 - Espectro biológico de carcinoma humano com as absorvâncias de pico biomolecular de 3.000-800 cm <sup>-1</sup> (Extraído de Baker et al., 2015).....	69
Figura 14 - Curva ROC empírica para o modelo.....	88
Figura 15 - Espectros produzidos pela espectroscopia FTIR na análise de plasma sanguíneo ...	90
Figura 16 - Espectro produzido a partir do grupo controle sem a presença das imunoglobulinas M e G (IgG-/IgM-).....	91
Figura 17 - Espectro produzido pelo Raman em plasma sanguíneo contendo imunoglobulina G (A): IgG+/IgM-, (B): IgG-/IgM+, (C) IgG+/IgM+ .....	92
Figura 18 - Curva ROC para comparação de ECLIA/Raman e ECLIA/FTIR para detecção de IgG (A) e IgM (B). A visualização da curva ROC do Raman com uma Área de curva de 0,961 e área de curva do FTIR de 0,673 (detecção de IgG) e área de curva de 0,831 e área de curva e área de curva do FTIR de 0,652 (detecção de IgM).....	99

## Lista de tabelas

---

Tabela 1 – Número (N) e porcentagem de soroprevalências de <i>T. gondii</i> em Portugal por região e em diferentes períodos temporais (Gargaté et al., 2016).....	26
Tabela 2 – Número (N) e porcentagem de soroprevalências de <i>T. gondii</i> por sexo nos anos de 2002 e 2013 (Gargaté et al., 2016).....	26
Tabela 3 - Casos confirmados de toxoplasmose congênita: números e taxa por 100.000 nascidos vivos, por país e ano, EU/EEA, 2011–2015 (European Centre for Disease Prevention and Control, 2018).....	31
Tabela 4 - Principais manifestações clínicas da encefalite por toxoplasma em pacientes imunocomprometidos (extraído de Souza & Belfort Jr, 2014).....	35
Tabela 5 - Comparativo entre a espectroscopia FTIR e Raman.....	56
Tabela 6 - Valores de números de onda com as vibrações correspondentes para cada um dos métodos espectrofotométricos FTIR e Raman baseados nas frequências vibracionais e no comportamento das moléculas presentes nas substâncias .....	58
Tabela 7 - Resumo das técnicas de espectroscopia Raman (extraído de Ember et al., 2017)....	60
Tabela 8 - Fatores de interesse detectados pela espectroscopia Raman.....	62
Tabela 9 - Principais modos vibracionais e assinaturas de moléculas do sangue humano por Espectroscopia Raman .....	64
Tabela 10 - Fatores de interesse que são detectados pela espectroscopia FTIR.....	66
Tabela 11 - Modos vibracionais e atribuições de compostos presentes no sangue por espectroscopia FTIR .....	67
Tabela 12 - Referência do Índice Kappa (K) e níveis de interpretação de concordância .....	78
Tabela 13 - Coeficiente de correlação de Pearson .....	80

Tabela 14 - Frequência de IgG em plasma sanguíneo.....	84
Tabela 15 - Distribuição das variáveis segundo a sorologia IgG.....	85
Tabela 16 - Resultado da aplicação da técnica Stepwise forward para seleção das variáveis dependentes.....	87
Tabela 17 - Percentagens das imunoglobulinas de acordo com as amostras coletadas e verificadas nos três aparelhos.....	94
Tabela 18 - Tabulação cruzada entre as espectroscopias Raman e FTIR para descrição de falsos positivos e negativos (FP e FN), verdadeiros positivos e verdadeiros negativos (VP e VN), utilizando o ECLIA como padrão-ouro na detecção de IgG. A tabela estima a precisão diagnóstica de um resultado de teste quantitativo dicotômico ou dicotomizado.....	95
Tabela 19 - Análises estatísticas da espectroscopia Raman e FTIR na comparação com o ECLIA com os respectivos IC a 95% na detecção da imunoglobulina G e M.....	97
Tabela 20 - Taxa de concordância (%) e valores de k dos métodos diagnósticos comparados com o ECLIA. O índice de confiança (IC) foi de 95% e o erro padrão.....	98
Tabela 21 - Área sob a curva na detecção de IgG e IgM pelos espectrofotômetros FTIR e Raman.....	100
Tabela 22 - Custo das amostras por cada técnica.....	101
Tabela 23 - Custo efetividade de IgG e IgM pelas técnicas testadas.....	102

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

(Isaac Newton)

---

**Capítulo 1 – Estado da arte**

---

## 1.1 Introdução

A toxoplasmose é uma zoonose que se caracteriza por ser uma doença de ampla diversidade geográfica e de hospedeiros, incluindo várias espécies de mamíferos e aves (Tenter et al., 2000), causada pelo *Toxoplasma gondii*. Estudos de prevalência apontam para um elevado número de infectados, tanto em humanos como em animais, contudo, a fase grave desta doença não se apresenta na mesma proporção (Dubey & Beattie, 1988). Na maioria dos casos, a toxoplasmose é assintomática e em outros, pode causar danos graves ao indivíduo, principalmente em recém-nascidos e em indivíduos imunossuprimidos. Esta parasitose pode ser adquirida por fonte direta ou indireta isto é, pela aquisição do patógeno sem interferência de veículo de transmissão ou pela transferência do agente etiológico através de propagadores animados ou inanimados (Simões et al., 2015).

## 1.2 Agente etiológico

*O.T. gondii* é um parasita intracelular obrigatório do reino Protoctista, sub-reino Protozoa, Filo Apicomplexa, classe Sporozoea, família Toxoplasmatinae, ordem Coccidia, ciclo de vida heteroxeno (seu desenvolvimento acontece em dois hospedeiros de espécies diferentes) e eurixeno (vivem em diferentes hospedeiros). Este parasita é responsável por um alto índice de infecção, atingindo cerca de um terço da população mundial (Meroni & Genco, 2008), e alcançando de 10 a 50% de prevalência em alguns países. Esta zoonose é considerada de grande distribuição (Silva et al., 2003), podendo o parasita ser encontrado em diferentes exsudados de animais infectados (Dubey et al., 1995). Os parasitas do filo Apicomplexa desencadeiam várias patologias humanas importantes. Como eucariontes, eles compartilham uma série de características e caminhos celulares com suas respectivas células hospedeiras (Latr et al., 2017).

Estudos feitos em roedores, por Nicolle e Manceaux em 1909 (Nicolle & Manceaux, 1909), na África do Sul, foram determinantes para o estudo da biologia do parasita, que foi inicialmente denominado de *Leishmania gondii*, recebendo posteriormente a nomenclatura atual. Simultaneamente, no Brasil, Splendore, em 1908, identificou o parasita em um coelho no estado de São Paulo (Splendore, 1908). Apesar do isolamento do agente ter ocorrido no início do século, apenas na década de 70 foram descritas a sua natureza coccidiana, bem como seus hospedeiros definitivos e intermediários (Frenkel et al., 1970).

Em 1923, foi relatado um caso de infecção de retina, numa criança com hidrocefalia e microftalmia, com *T. gondii* (Janku, 1923). Mas a associação entre hidrocefalia e toxoplasmose só ocorreu cinco anos após, com os trabalhos de Levaditi (1928). Em 1937, um caso de toxoplasmose



infantil foi relatado em associação a encefalite granulomatosa, afirmando que o *T. gondii* era o agente causador da doença (Dubey, 2009b). O primeiro caso de toxoplasmose contraída por um jovem adulto foi descrito por Pinkerton e Weinman (1940). Somente em 1948, 40 anos depois da observação de Splendore sobre o protozoário que desencadeia a toxoplasmose, foi obtido o teste sorológico mais específico para toxoplasmose humana, o “dye test” (Tenter et al., 2000). Os avanços nos estudos sobre o *T. gondii* foram intensificados entre 1983 e 2008, quando se descobriu a biologia parasitária do protozoário (Ferguson, 2009). Os avanços nos estudos da genética dos parasitas proporcionaram aos cientistas o conhecimento necessário para entender o comportamento do *T. gondii* (Soete et al., 1993), suas manifestações clínicas (Dubey, 2009a) e o seu diagnóstico laboratorial (Boothroyd, 2009).

A descrição sobre a infecção congênita ocorreu nos Estados Unidos da América por Wolf & Cowen (1937), ao relatar a existência do *T. gondii* em lesão do sistema nervoso central de uma criança falecida com um mês de vida.

### 1.3 Ciclo de vida e morfologia

A Figura 1 ilustra, de forma resumida, o ciclo da doença. A fase sexuada ocorre no epitélio do intestino de felídeos que excretam oocistos em suas fezes (esporozoítos infectantes) (Hutchison, 1965). Os felídeos são infectados ao ingerir o hospedeiro intermediário (roedores e outros animais) com *Toxoplasma* e isso faz com que eles eliminem oocistos imaturos nas suas fezes. A fase assexuada ocorre fora do intestino e acomete animais homeotérmicos (Dubey, 1994; Luzon et al., 1997). A alta infectividade do parasita decorre da sua inespecificidade, já que pode se propagar em qualquer célula nucleada, multiplicando-se por cissiparidade (bipartição) e endodiogenia sob as formas de taquizoítos (forma de multiplicação rápida) e bradizoítos (forma de multiplicação lenta), estes últimos no interior dos cistos tecidulares (Luzon et al., 1997; Meireles, 2001).

As organelas são típicas de outros grupos Apicomplexa: conóide, anel polar, microtúbulos subpeliculares, roptrias, micronemas e grânulos densos (Neves et al., 2011).

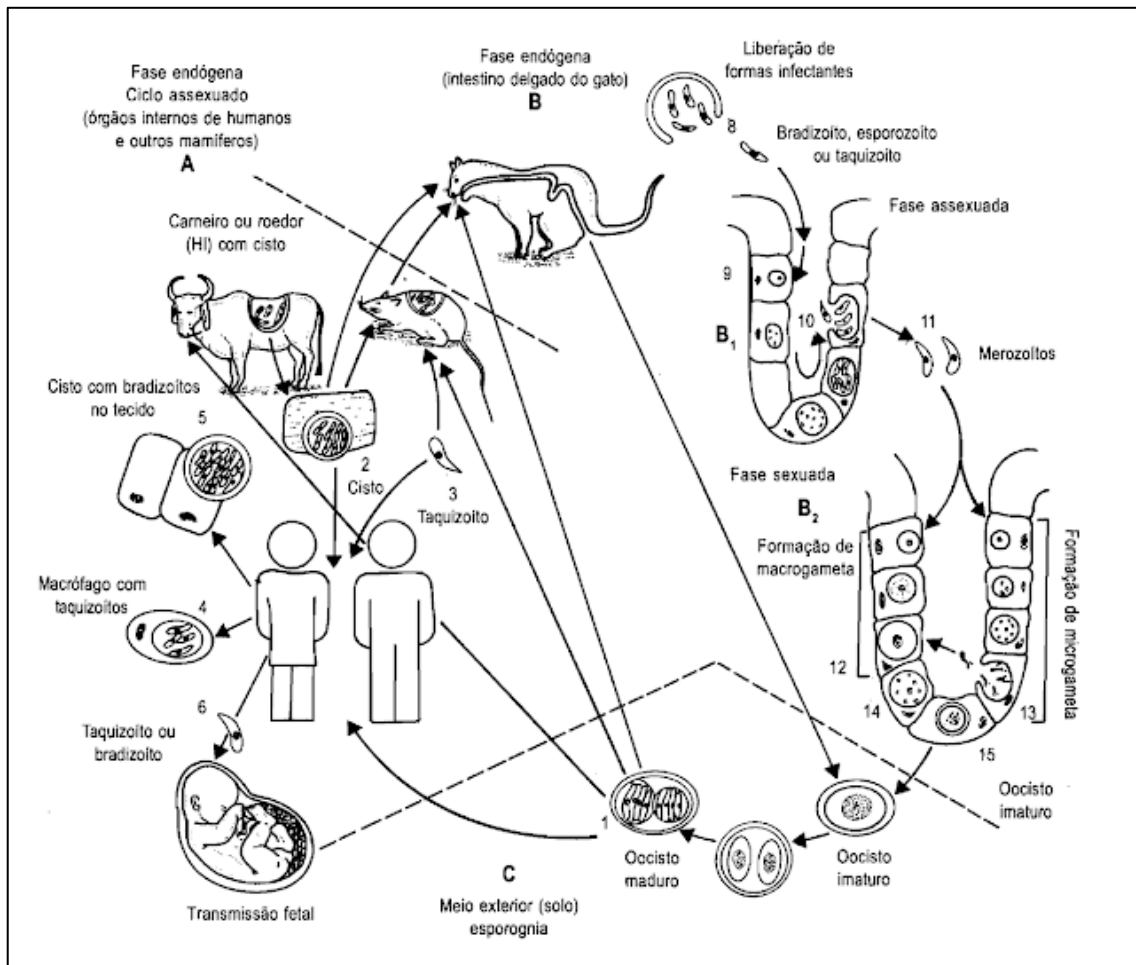
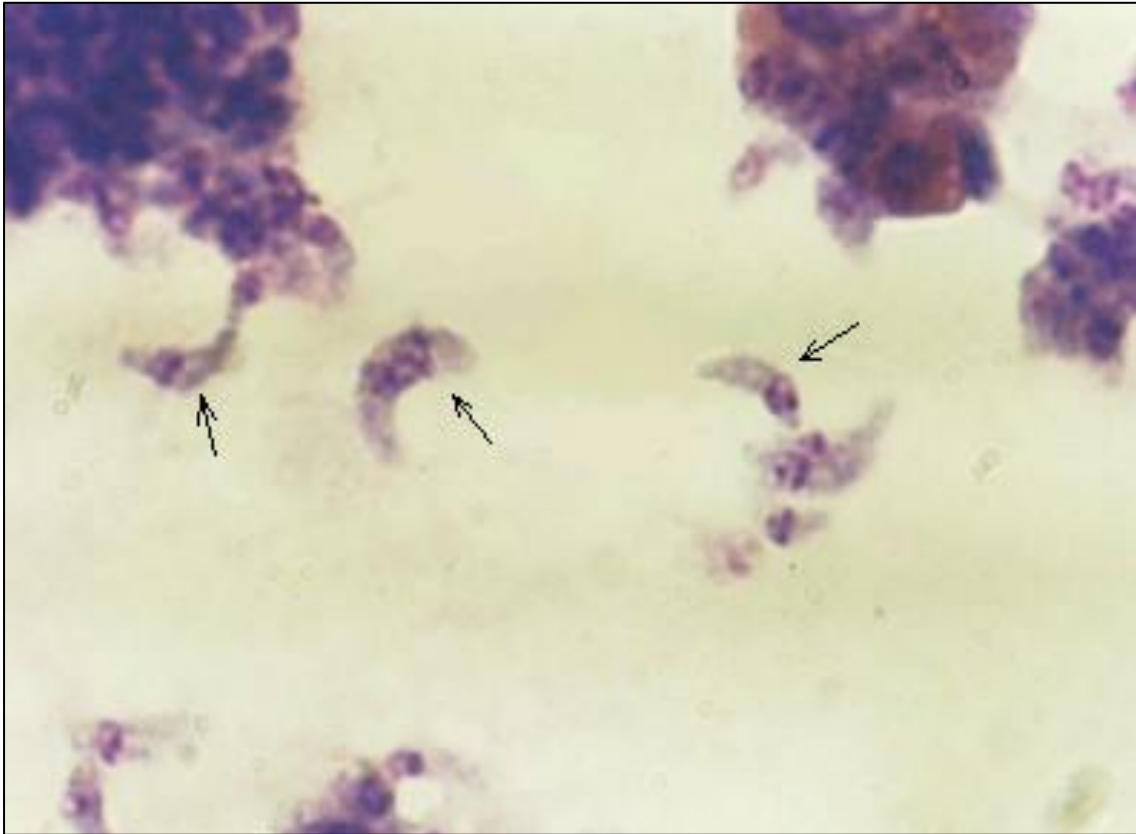


Figura 1 - Ciclo biológico do *T. gondii* (Neves et al., 2011)

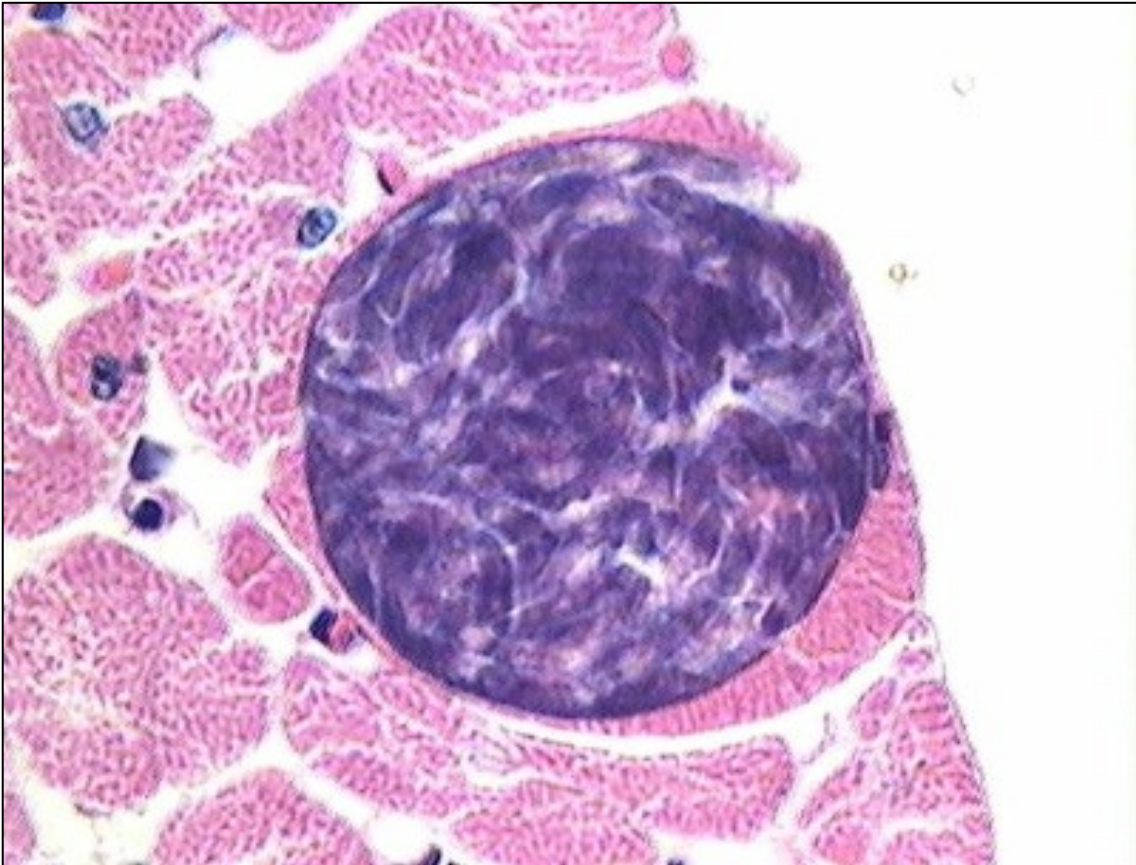
O *T. gondii* apresenta uma diferenciação em sua morfologia e esta depende do habitat e do estágio evolutivo em que o parasito se encontra, possuindo três estágios: taquizoítos (Figura 2), bradizoítos (Figura 3), contidos em cistos tecidulares, e esporozoítos localizados em oocistos esporulados, todas infectantes, seja no hospedeiro intermediário ou definitivo (Acha & Szyfres, 1987; Dubey, 1986, 1998).



**Figura 2** - Imagem de taquizoitos de *T. gondii*- é possível distinguir núcleo e citoplasma e o microrganismo lembra um plasmócito em miniatura, sendo o núcleo excêntrico (Retirado de UFRGS, 2018)

Através da circulação sanguínea/linfática, os taquizoitos podem albergar células nucleadas presentes no organismo (Wong & Remington, 1993), sendo responsáveis pelos sinais clínicos característicos da doença (fase aguda). Os taquizoitos possuem forma arqueada, onde uma extremidade é afilada e outra é arredondada. Esta é a forma mais sensível do parasita, sendo vulnerável às condições ambientais como: suco gástrico, temperatura e osmose (Neves, 2016), mas é a forma que possui mais importância epidemiológica, por ser transmitida verticalmente (na gestação).

A fase crônica da doença é caracterizada pela formação de bradizoitos (Figura 3) envolvidos por uma parede cística, sendo a formação característica localizada principalmente no cérebro, músculos e retina (Dubey et al., 1970). Os bradizoitos são formas resistentes a algumas intempéries, como: resfriamento a 4°C por 30 dias e a ação de enzimas proteolíticas. Contudo, quando submetidas a congelamento de -20°C, aquecimento a mais de 65°C e radiação ionizante, são inteiramente destruídos (Amato-Neto, 1995; Dubey, 1986; Kotula et al., 1991; Neves, 2016).



**Figura 3** - Imagem de cisto tecidual contendo bradizoítos de *T. gondii* (Retirado de UFRGS, 2018)

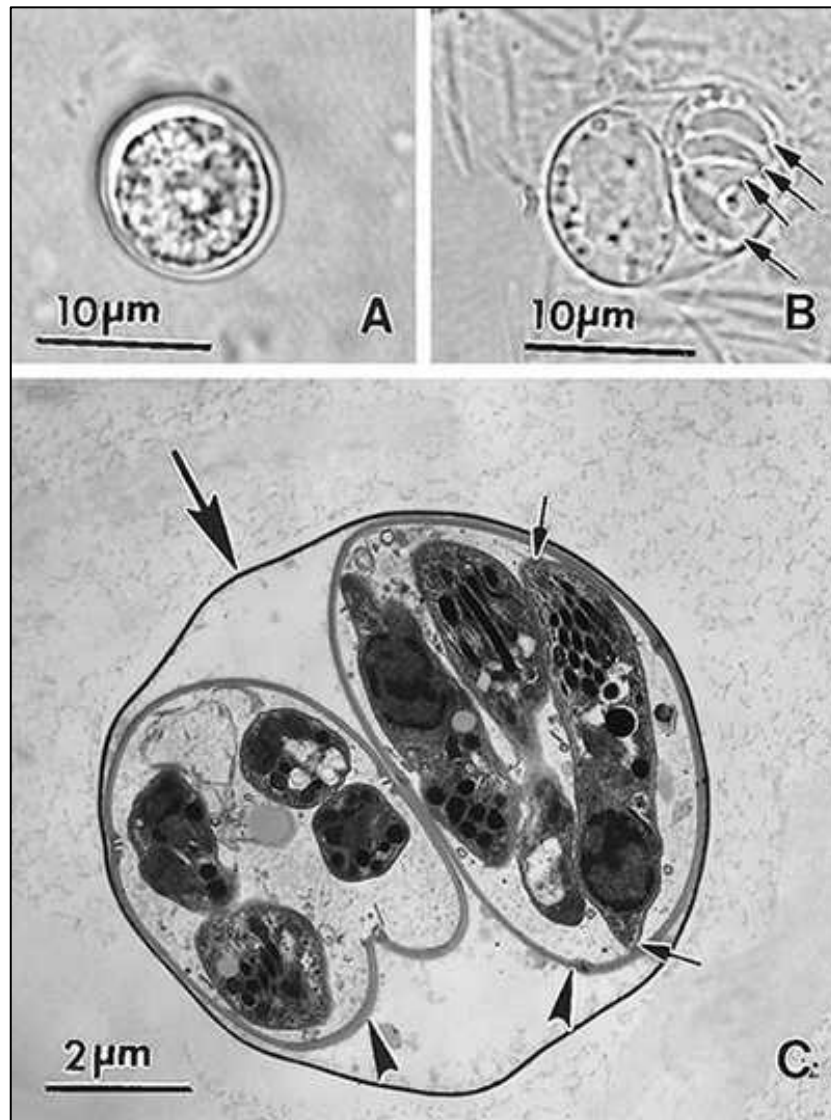
Dentro do cisto, os bradizoítos são imunologicamente inertes e não são eliminados pelo sistema imune do hospedeiro. Esses cistos se formam com o início da resposta imune do hospedeiro, sendo uma forma de proteção do parasito. Têm alta afinidade pelo tecido muscular, especialmente músculo cardíaco, sistema nervoso central e retina, pois, nestes locais, o acesso dos anticorpos é restrito, podendo ser encontrados cistos em outros órgãos e tecidos dos hospedeiros, como fígado, pulmões e rins (Dubey, 1998; Hartley & Munday, 1974; Norsworthy, 2018). A localização e número de cistos nos animais vai depender do hospedeiro e da cepa de *T. gondii*. Na maioria dos mamíferos (bovinos, gatos, ovinos e cabras), os cistos se localizam preferencialmente no tecido muscular e menos frequentemente no cérebro (Dubey, 1998).

As transformações morfológicas do *T. gondii* e reativação de cistos teciduais têm merecido destaque, já que a mudança de taquizoíto para bradizoítos e vice-versa é a chave para o sucesso da infecção (Bohne et al., 1995; Gross et al., 1996).

Os oocistos (Figura 4), são as formas de resistência encontradas nas fezes do hospedeiro definitivo (Dubey et al., 1970). O protozoário secreta uma parede resistente (parede cística) que o

protegerá quando estiver em meio impróprio ou em fase de latência. Os oocistos não esporulados são esféricos ou subsféricos e os esporulados são subsféricos ou elípticos (Dubey & Frenkel, 1998).

O período de incubação (exposição de um animal a um organismo patogénico e a manifestação dos primeiros sintomas da doença) varia de 10 a 23 dias após a ingestão de carne malcozida e de 5 a 20 dias após ingestão de oocistos (Jones et al., 2001). A hipersensibilidade ou à ação do próprio parasita causa intensa destruição de tecidos do hospedeiro.



**Figura 4** - Oocistos de *T. gondii*, forma excretada nas fezes de felinos (Dubey et al., 1998)

Apesar do ciclo do *T. gondii* ser conhecido desde a década de 1960, ainda existem aspectos que devem ser esclarecidos (Bastien, 2002; Freyre et al., 1999), como a compreensão molecular do crescimento do parasita, dos mecanismos de saída da célula hospedeira e o conhecimento da manipulação do hospedeiro pelo parasita.

#### 1.4 Diversidade genética do *T. gondii*

Inicialmente acreditava-se que o *T. gondii* fosse um organismo de estrutura genética clonal, por conta da não obrigatoriedade de reprodução sexuada, dificultando sua variabilidade genética, do curto período de produção de gametócitos nos felídeos e pela resposta imune eficiente de seus hospedeiros. Dados indicam que a América do Sul pode ter sido o berço do *T. gondii*, pois tem a maior diversidade de cepas de qualquer região já examinada (Lehmann et al., 2006). Uma análise da variabilidade genética de *T. gondii*, no Brasil, possibilitou a identificação de 48 genótipos, ocorrendo maior diversidade genética neste país do que ocorre na América do Norte e Europa (Pena et al., 2008).

Várias técnicas moleculares têm sido utilizadas objetivando o estudo dessa diversidade genética entre diferentes isolados de *T. gondii* como a análise isoenzimática (Cristina et al., 1995; Dardé, 1996), amplificação aleatória do ADN polimórfico (RAPD) (Ferreira et al., 2004; Guo & Johnson, 1995, 1996), análise de microssatélites (Ajzenberg et al., 2002; Ajzenberg et al., 2005; Ferreira et al., 2004) e polimorfismo por tamanho de restrição (RFLP) (Carneiro, 2011; Cavalcante et al., 2007; Cristina et al., 1995; A. de M. Ferreira, Vitor, Gazzinelli, & Melo, 2006; Howe & Sibley, 1995). Os estudos genotípicos de *T. gondii* foram baseados na análise de isoenzimas e em marcadores de genotipagem de comprimento de fragmentação de restrição de PCR (RFLP), sendo posteriormente adicionada novos marcadores para ser uma melhor ferramenta para estudos filogenéticos (Demar et al., 2007). Estudos realizados na década de 80 permitiram identificar cepas do *T. gondii* em virulentas e baixa virulência (Johnson, 1997). As três linhagens genéticas do *T. gondii* encontradas na Europa e América do Norte foram resultado de cruzamentos gênicos entre indivíduos altamente similares, dando origem a progênie clonal (Boyle et al., 2006). Não é raro encontrar cepas diferentes no mesmo continente ou em continentes diferentes, pois a expansão de genótipos idênticos pode ser explicada pela ação do homem (migração e emigração) e por outros reservatórios do parasita - aves migratórias, por exemplo (Mercier et al., 2010). Dados recentes mostraram que cepas africanas e americanas compartilham um antepassado, apoiando a hipótese da migração de *T. gondii* em navios junto com gatos e roedores durante o tráfico de escravos nos séculos 18 e 19 (Mercier et al., 2010). Curiosamente, os isolados sul-americanos são diferentes dos isolados norte-americanos, ocorrendo a diversidade alélica estimada em 10 milhões de anos (Mercier et al., 2010).

O *T. gondii* possui genoma nuclear e organelar. Seu ADN nuclear contém aproximadamente 65 Mb (mega pares de bases de nucleotídeos) e o mitocondrial conta com peso molecular de apenas 6 kb (Sibley & Ajjoka, 2008). Seus 14 cromossomos variam em tamanho de aproximadamente 2 Mb a mais

de 6 Mb com frequência de recombinação baixa, mantendo um genoma nuclear conservado, apesar da grande variedade de hospedeiros e do ciclo sexuado não obrigatório (Ferreira & Vitor, 2014).

O conhecimento da estrutura populacional de *T. gondii* é de grande importância na saúde pública e na clínica médica, pois há correlação entre o genótipo do parasita e a manifestação da doença (produção de marcadores de definam o prognóstico da toxoplasmose), levando a um tratamento adequado aos pacientes. O curso clínico da toxoplasmose congênita difere em países da Europa e nos Estados Unidos, quando comparados com a América do Sul (Ferreira & Vitor, 2014).

A história evolutiva das linhagens do *T. gondii* ainda está sendo escrita, pois precisará de mais amostragens de diferentes continentes, e notavelmente na Ásia e Oriente Médio, local de nascimento dos felídeos.

## 1.5 Epidemiologia

Levantamentos sorológicos mostram prevalências entre 0 e 100% em várias populações e de 4 a 100% em mulheres em idade fértil. Ao todo, foi estimado que um terço da população mundial foi exposta ao parasita (Tenter et al., 2000). As variações ocorrem pela disponibilidade de oocistos presentes no solo ou água contaminados pelas fezes de gatos e cistos existentes na carne de animais infectados (Cook et al., 2000). Estima-se que 30 a 90% da população de diferentes países tiveram contato com o protozoário. Sua epidemiologia é potencializada pela ausência, em alguns casos, de sintomas, fazendo com que seu hospedeiro espalhe os cistos. Em saúde pública os cuidados são redobrados, pois em gestantes pode causar má formação fetal. Suas altas taxas de prevalência estão distribuídas por diversas partes do mundo (Dubey, 2010), obedecendo a critérios culturais, educacionais e sanitários. Em crianças, a soroprevalência é relativamente baixa, aumentando de acordo com a idade e com a exposição a mais fatores de risco durante o transcorrer da vida (Desmonts & Couvreur, 1974; Kompalic-Cristo et al., 2005; Wong & Remington, 1994).

Países da Europa, África, Caribe e América do Sul apresentam grande prevalência de infecção de *T. gondii* (Petersen, 2007; Zuber & Jacquier, 1995). Inquéritos sorológicos realizados entre 1999 e 2004 mostraram que 10,8% dos norte-americanos foram infectado pelo *T. gondii* (Jones et al., 2007). A população suscetível à infecção é variável, chegando aos 86%, sendo estimada em 1,1 milhão de casos de toxoplasmose nos Estados Unidos (Jones & Holland, 2010), obtendo óbito de 327 pacientes e 4.428 internações em decorrência do *T. gondii* (Scallan et al., 2011), sendo encontrada prevalência de 15,8% em outros grupos (Costa et al., 2008).

A soroprevalência pode variar entre países, entre regiões de mesmo país e entre grupos étnicos (Ertug et al., 2005). Não há variação na prevalência entre os sexos, exceto se os hábitos culturais forem diferentes (hábitos alimentares ou dogmas religiosos) e causem diferenças significativas. A distribuição da infecção pelo *T. gondii* é generalizada, ocorrendo variação em alguns países. Uma baixa soroprevalência foi observada na América do Norte, Sudeste da Ásia e Norte da Europa, contrastando com países da América do Sul e África. No Sul da Europa e Norte da África ocorrem taxas moderadas em torno de 30% a 50% (Bouratbine et al., 2001; Montoya & Liesenfeld, 2004; Robert-Gangneux & Dardé, 2012). As prevalências podem ser estimadas a partir dos métodos sorológicos utilizados e existem variações ao longo do tempo (Ertug et al., 2005; Holland, 2003; Montoya & Liesenfeld, 2004).

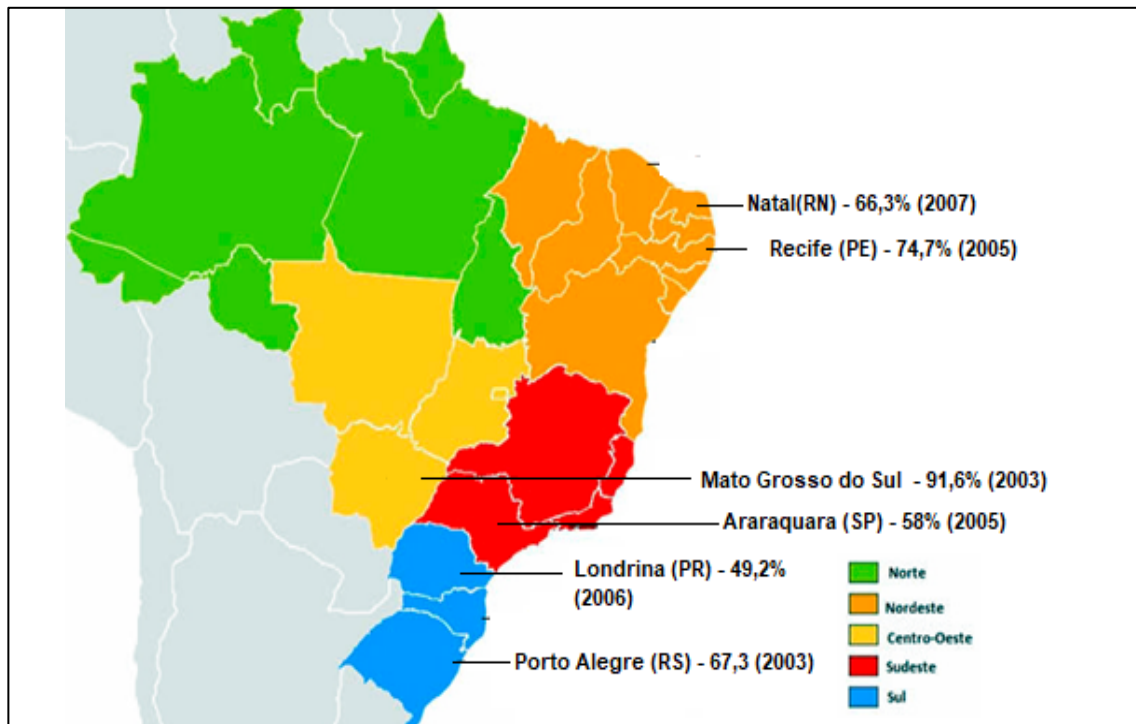
Os programas de rastreio, principalmente na Europa, têm demonstrado eficiência na diminuição de casos de infecção. Em alguns países pode ser observada uma soroprevalência de 15% a 85% na população humana (Cristo, 2005).

### 1.5.1 Brasil

O Brasil possui áreas endêmicas com alta prevalência de soropositividade para *T. gondii* na população em geral e nas gestantes, com números que variam de 50 a 80% (Bahia-Oliveira et al., 2003) e alguns levantamentos evidenciaram alta prevalência de toxoplasmose congênita, toxoplasmose ocular ou títulos sorológicos de imunoglobulinas (Amendoeira et al., 2003; Andrade et al., 2001; Bahia-Oliveira et al., 2001; Borges et al., 1997; Glasner et al., 1992; Neto, 2000; Rey & Ramalho, 1999; Ricciardi et al., 1978; Souza et al., 1987).

A soroprevalência encontrada no Brasil varia de acordo com a região estudada, tornando a infecção pelo *T. gondii* amplamente prevalente em humanos, sendo que 50% das crianças e 80% das mulheres em idade fértil têm anticorpos para esse protozoário (Dubey et al., 2012). Dados relativos a soroprevalência afirmam que 0,3 a 1,96/1.000 nados vivos possuem toxoplasmose congênita. As taxas de soroprevalência de IgG em mulheres grávidas também é variável, obtendo índices de 32,4% no Rio de Janeiro a 91,6% em Mato Grosso do Sul (Figura 5) (Figueiró-filho et al., 2010). Os estudos sobre toxoplasmose na América Latina são escassos, concentrando-se em sua maioria no Brasil. No ano de 2006 foi encontrada uma prevalência de 67,7% e no ano anterior a prevalência foi de 58,8% (Beck et al., 2010). Na cidade de Recife (Brasil), foi encontrada uma prevalência de 75% de soroprevalentes de IgG em doadores de sangue, não havendo diferença significativa entre homens e mulheres e aumentando a prevalência de imunoglobulina G com o aumento da idade (Coelho et al., 2003).





**Figura 5** - Taxas de mulheres grávidas soropositivas em quatro regiões do Brasil (Beck et al., 2010)

A toxoplasmose é mais frequente em climas quentes e em baixas altitudes, pois o parasita encontra as condições ideais que favorecem a esporulação e a sobrevivência de oocistos. As análises de soroprevalência no Brasil, quando analisadas conjuntamente, indicam taxas variadas e relativamente altas, possivelmente por conta do solo, água ou alimentação (Jones & Dubey, 2014).

### 1.5.2 Portugal

Os primeiros estudos sorológicos foram realizados em 1979-1980, mostrando uma prevalência de 47% (Gargaté et al., 2016). Portugal é um dos países da União Europeia onde é preconizado realizar o diagnóstico laboratorial sistemático da toxoplasmose a todas as mulheres grávidas (Vilares et al., 2015). Assim, os inquéritos sorológicos nacionais deixaram de ser realizados, sendo feitos, basicamente, por estudos pontuais (Angelo, 2003; Lopes et al., 2012).

A partir de 2011 foram criadas as orientações para a triagem e vigilância de gravidez, tornando uma doença de notificação obrigatória. O rastreio faz-se por rotina sorológica, quer na concepção, quer como parte dos cuidados pré-natais. Mulheres com imunidade documentada não necessitam repetir o rastreio sorológico da toxoplasmose, contudo, as mulheres sem histórico de rastreio devem realizar todos os exames de rotina. Todo o diagnóstico, pré e pós-natal da toxoplasmose, incluindo sorologia, PCR e inoculação no camundongo, é realizado no INSA (Instituto Nacional de Saúde). As análises dos casos de toxoplasmose adquirida são realizadas em todo o país. Outros centros realizam o rastreio em

cada trimestre seguindo as normas da Direção Geral de Saúde (DGS), além de patologias associadas aos recém-nascidos (patologias infecciosas, aneuploidias e desvios do crescimento fetal) (Santos et al., 2017).

A prevalência de toxoplasmose em Portugal varia entre 35% na região sul e 60% no norte do país (Angelo, 2003). Estudos realizados em hospitais e centros de saúde verificaram que a prevalência de infectados diminuiu em comparação com os primeiros inquéritos nacionais (Vilares et al., 2015). Em outro estudo realizado na região Norte do País, foi verificada uma soroprevalência de 24,4% em mulheres com idades compreendidas entre os 16 e os 45 anos de idade. Esta realidade indica que 75,6% das mulheres em idade fértil no Norte do País correm o risco de se infectar com este parasita (Lopes et al., 2012), dado não possuírem anticorpos. Dados nacionais publicados no ano de 2013 de casos clínicos de 2009 a 2013, indicam que 43% dos infectados com o *T. gondii* eram gestantes (Vilares et al., 2015). Em relação as gestantes, Lobo (2017) encontrou uma prevalência de anticorpos de 21,9% (34/155) na cidade de Lisboa, dos quais 10,9% (17/155) eram soropositivas para IgG e 10,9% (17/155) eram soropositivas tanto para IgG quanto para IgM, enquanto 78,1% foram soronegativas para ambas as imunoglobulinas (Lobo et al., 2017).

Dados de Vilares et al. (2015) demonstram que de 695 pacientes confirmados com toxoplasmose, 97,9% (681) eram de casos de toxoplasmose adquirida, enquanto que 2,1% (14) eram de origem congênita. Nos casos adquiridos, houve maior proporção em mulheres (90,5%). Com relação a faixa etária, observou-se que a maioria das mulheres pertencia ao grupo entre 25 e 44 anos de idade (70%), seguido do grupo etário 15-24 anos (20%), sendo a maioria dos homens pertencentes ao grupo etário entre o 25 e os 64 anos. Estudos de Lito (2013) entre 2004 e 2007 na Grande Lisboa, relataram soroprevalências de 25,7% em mulheres. Neste mesmo estudo, a taxa de positividade na população estrangeira foi superior em relação às grávidas com nacionalidade portuguesa (30,6% contra 23,8%) (Lito et al., 2013). A taxa de soroconversão estimada foi de 1,7/1000 mulheres soronegativas. Em nenhum grupo etário a percentagem de mulheres com IgG positiva foi superior a 50%, sendo que nas mulheres com idade inferior a 30 anos a taxa de soropositividade foi de 23% e nas mulheres com mais de 30 anos foi de 30%. Neste estudo não foi diagnosticado nenhum caso de toxoplasmose congênita.

Gargaté et al. (2016) mapeou a soroprevalência na população portuguesa ao longo das últimas três décadas, avaliando a propagação cronológica em estudos transversais com foco em mulheres. Houve uma grande diminuição de casos. A tabela 1 ilustra a soroprevalência em quatro regiões (Gargaté et al., 2016).

**Tabela 1** – Número (N) e porcentagem de soroprevalências de *T. gondii* em Portugal por região e em diferentes períodos temporais (Gargaté et al., 2016)

	N	1979/1980 Soroprevalência (%)	N	2001/2002 Soroprevalência (%)	N	2013 Soroprevalência (%)
<b>Norte</b>	405	51% (46% a 56%)	426	45% (41% a 50%)	464	13% (10% a 17%)
<b>Centro</b>	590	47% (43% a 51%)	426	38% (33% a 42%)	344	29% (25% a 34%)
<b>Lisboa</b>	302	47% (41% a 52%)	630	33% (29% a 37%)	504	23% (20% a 27%)
<b>Sul</b>	378	43% (38% a 48%)	171	25% (19% a 32%)	128	33% (25% a 41%)

No mesmo estudo de Gargaté et al. (2016) não foram observadas diferenças significativas com relação a variável sexo, ou seja, mantiveram-se as prevalências entre homens e entre mulheres, como mostrado na tabela 2.

**Tabela 2** – Número (N) e porcentagem de soroprevalências de *T. gondii* por sexo nos anos de 2002 e 2013 (Gargaté et al., 2016)

	Masculino		Feminino	
	N	Prevalência (%)	N	Prevalência (%)
<b>2002</b>	641	35% (31% to 39%)	1016	38% (35% to 41%)
<b>2013</b>	638	22% (19% to 25%)	802	23% (20% to 26%)

Verificou-se que as políticas de rastreio em Portugal trouxeram grandes benefícios, pois houve diminuição de soroprevalentes em grávidas nas últimas três décadas (Lobo et al., 2017).

É importante destacar que a toxoplasmose congênita é uma doença de notificação obrigatória em Portugal e seu diagnóstico deve ser realizado no Laboratório Nacional de Referência de Infecções Parasitárias e Fúngicas do Instituto Nacional de Saúde.

### 1.5.3 Outros países

A União Europeia (UE) possui um sistema de monitoramento e análise de informações baseadas na Diretiva 2003/99/CE, que obriga os Estados-Membros da UE a fornecer dados sobre a ocorrência de zoonoses, agentes etiológicos, resistência antimicrobiana, populações de animais vetores e surtos de origem alimentar. A EFSA (*European Food Safety Authority*) é responsável por examinar os dados e publicações de relatórios anuais da UE em cooperação com o ECDC (*European Center for Disease Prevention and Control*). O ECDC fornece e analisa os dados sobre as infecções causadas por animais

em humanos. Estes relatórios ilustram a evolução das zoonoses mais comuns que podem infectar o homem.

Em 2008, foram relatados 1788 casos de toxoplasmose em 16 países da UE e Espaço Econômico Europeu (EEE). Países como o Chipre, Malta, Suécia e Islândia não evidenciaram nenhum caso. A Lituânia teve a maior taxa de toxoplasmose apresentando um valor de 3,5 por 100.000 habitantes, seguida da Eslováquia na qual se verifica um valor de 3,2 por 100.000 habitantes. A taxa global de resultados encontrados foi de 0,76 por 100.000 habitantes. Em 916 casos (63% de casos confirmados) estavam disponíveis informações acerca da prevalência nas diferentes faixas etárias. Assim sendo, a faixa etária dos 15-24 anos reporta a taxa mais elevada – 0,93 por 100.000 habitantes. Em 1022 casos (70% de casos confirmados), 30% eram do sexo masculino (308 casos) e 70% do sexo feminino (714 casos). Deve-se levar em consideração que o maior número de casos pode estar relacionado com a triagem relativa à gravidez, o que explica um maior número de infecções no sexo feminino e em mulheres em idade fértil (15-24 anos). Os sistemas de rastreio de toxoplasmose na Europa não são uniformes, sendo utilizado como referência, a prevalência (Villard et al. 2016). A França lidera o número de casos de toxoplasmose congênita, até 2015, notificados pela EU/EEE com 90,1% dos casos, o que poderá estar relacionado com as práticas alimentares existentes neste país (McDonald et al., 2015). Dos 21 países pesquisados, 13 relataram ausência de casos de toxoplasmose. A taxa de notificação foi de 7,9 casos por 100.000 nascidos vivos, representando um ligeiro aumento em comparação com a taxa de 2014 que foi de 7,2 casos por 100.000 nascidos vivos (European Centre for Disease Prevention and Control, 2018).

Os programas de triagem sorológicas de França e Áustria surgiram em 1975, a partir de um monitoramento trimestral. No ano seguinte, adotou-se o monitoramento mensal (Aspöck & Pollak, 1992; Gilbert & Gras, 2003). Essas medidas foram importantes para que ocorresse uma diminuição significativa de casos de toxoplasmose nestes países, garantindo assim o tratamento e o diagnóstico precoce da doença durante a gestação, além de outras medidas como a mudança nos hábitos alimentares e de melhores práticas de higiene na produção de carne, medidas estas, também adotadas no Reino Unido (Gilbert & Gras, 2003). Estes exames precoces serão determinantes para o tipo de interação medicamentosa que será administrada na paciente (Gilbert & Gras, 2003). A estimativa prevista para a prevalência de mulheres soroprevalentes na França no ano de 2020 é de 27% (Nogareda et al., 2013). Embora 84% das mulheres grávidas em Paris tenham anticorpos contra *T. gondii*, apenas 32% na cidade de Nova York e 22% em Londres possuem esses anticorpos (Webster, 2010).

Na Alemanha, a partir de 2001, os casos de toxoplasmose congênita são de notificação obrigatória, obedecendo aos critérios presentes em outros países, como: presença de *T. gondii* em tecidos e fluidos corporais, detecção de IgM e IgG anti- *T. gondii* e persistência de IgG específicos. Estudos de Wilking et al., (2016) na Alemanha, com 6.564 participantes mostram que a soroprevalência aumenta 1,09% em cada ano de idade, ou seja, indivíduos mais idosos, têm maiores chances de serem soroprevalentes para toxoplasmose. Neste mesmo estudo foi observada uma maior prevalência de homens jovens e mulheres idosas infectadas. Esta alta prevalência, onde a cada ano cerca de 1,1% dos adultos e 1,3% das mulheres com idades entre 18-49 serão soroprevalentes, é atribuída a hábitos alimentares (Wilking et al., 2016).

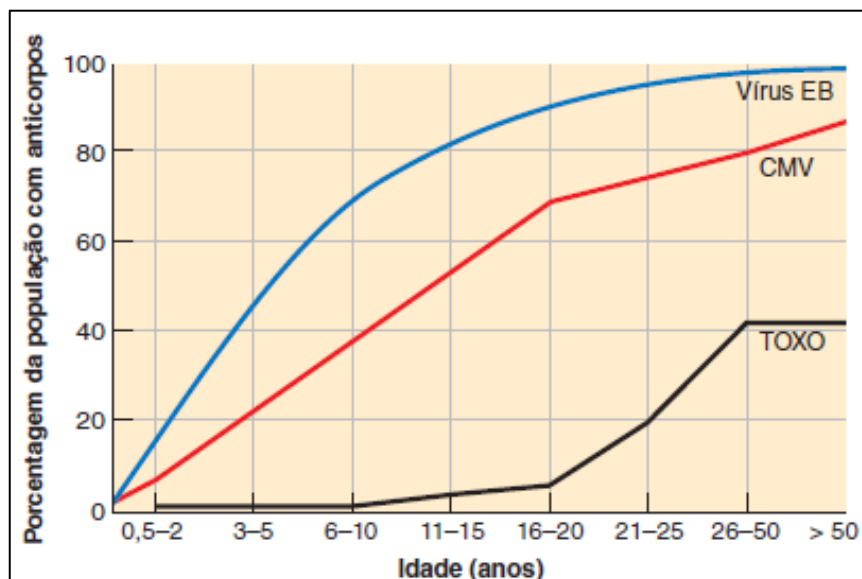
Na Itália, desde 1994, é oferecido rastreamento para toxoplasmose durante o pré-natal e no período pré-concepcional ou precocemente na gestação, permitindo a população se informar sobre prevenção, sendo o procedimento de diagnóstico inteiramente coberto pelo sistema de saúde pública. Caso haja resultados inconclusivos e casos suscetíveis é aplicado um novo teste, sem definição de intervalo (Buffolano, 2003).

Um inquérito sorológico realizado com 47.444 indivíduos na China estimou uma prevalência de 7,9% de soroprevalentes utilizando o ensaio de imunoabsorção enzimática – ELISA (Zhou et al., 2011). Em 2010 a prevalência chegou a 12,3% para IgG, sendo considerada uma baixa prevalência quando comparada com outros países. A baixa prevalência de toxoplasmose na China pode ser atribuída a ausência de gatos na maioria das famílias e a preferência das pessoas por comerem carne bem cozida.

Baixas soroprevalências foram encontradas na América do Norte (10 a 30%), no Sudeste Asiático, no norte da Europa e nos países sahelianos da África. Foram encontradas prevalências moderadas (30 a 50%) nos países da Europa Central e do Sul, e altas prevalências foram encontradas na América Latina e nos países tropicais africanos (Robert-Gangneux & Dardé, 2012).

No Panamá, a soroprevalência foi relatada em 13% aos 6 anos de idade (Frenkel et al., 1995) e 90 % aos 60 anos de idade (Sousa, Saenz, & Frenkel, 1988). Os estudos no Panamá, onde ocorre ingestão de carne bem cozida, relataram um rápido aumento da soroprevalência durante a infância que provavelmente refletiu a exposição do solo aos oocistos de *T. gondii* (Sousa et al., 1988). Na cidade de Ibadan, Nigéria, foi verificada uma soroprevalência de 78% entre mulheres grávidas (Onadeko et al., 1992), 44 % entre as pessoas que vivem nas regiões mais secas da Somália e 83% na população do Delta do Sul na Nigéria (Dubey & Beattie, 1988). Estudos realizados em países escandinavos (Ljungström et al., 1995) e na Inglaterra (Jones et al., 2001) apresentaram menor soroprevalência.

Nos Estados Unidos, a soroprevalência encontrada por Jones et al. (2001) foi de 22,5% e entre as mulheres em idade fértil foi encontrada uma soroprevalência de 15%. Estes resultados indicam que os Estados Unidos é um país com pouca soroprevalência de *T. gondii* em comparação com outras nações como a França. O fator relacionado a soroprevalência e idade sugere que o contato com o solo, mais frequente na infância, não é determinante para o mecanismo de transmissão, sendo a transmissão por carne infectada o maior fator de risco da doença nos Estados Unidos (Jones et al., 2001). As grávidas norte-americanas não são rastreadas com frequência. Somente os casos de mulheres grávidas com ultrassonografia fetal anormal sugestiva de infecção congênita ou fatores de risco para infecção aguda (Boyer et al., 2005; Peyron et al., 2017). Os Estados de Massachusetts e New Hampshire são os únicos a realizar a triagem neonatal (Guerina et al., 1994). O custo financeiro de complicações geradas pela toxoplasmose gira em torno de US \$ 3 bilhões, sendo a segunda parasitose transmitida por alimentos mais importante nos EUA, perdendo apenas para a salmonelose, sendo responsável por um dos maiores custos diretos para a assistência médica entre as doenças que são transmitidas pela água (Batz et al., 2011; Buzby & Roberts, 1997; Collier et al., 2015). A Figura 6 relaciona a prevalência do *T. gondii*, vírus Epstein-Barr (vírus EB) e o citomegalovírus (CMV) para demonstrar que as imunoglobulinas anti-*T. gondii* são mais prevalentes em idades avançadas, enquanto que as outras doenças podem resultar em infecções na infância. Estimativas sugerem que 23% dos adolescentes e adultos estejam infectados com *T. gondii*, o que representa 24% das mortes por doenças transmitidas por alimentos nos EUA (Hussain et al., 2017).



**Figura 6** - A prevalência típica de anticorpos contra o vírus Epstein-Barr (vírus EB), o citomegalovírus (CMV) e *Toxoplasma gondii* (TOXO) por idade, nos Estados Unidos (Extraído de Tortora et al., 2017)

Os países com clima tropical apresentam-se com as maiores prevalências, por conta do clima úmido e quente. Nos países de clima temperado ou com grande aridez as prevalências são mais baixas. Além do clima e de questões antropomórficas (hábitos alimentares - método de cozinhando carne, lavagem das mãos, tipos de carne ou vegetais consumidos e limpeza de vegetais; hábitos econômicos, sociais ou culturais; qualidade da água; e cobertura de saneamento), o nível socioeconômico também é um fator de aumento de prevalência da doença (Robert-Gangneux & Dardé, 2012).

Surtos pontuais de toxoplasmose ocorreram por contaminação de reservatórios de água, como o ocorrido no Canadá em 1995, causando aumento de casos de toxoplasmose aguda e congênita (Bowie et al., 1997; Silveira, 2002). Os surtos de toxoplasmose são comuns em saúde pública e devem ser analisados de forma universal, já que podem fornecer dados sobre origem e prevenção da doença. Para que a doença não se espalhe pela sociedade é de extrema importância para que o poder público tome as devidas providências e crie medidas preventivas adequadas, especialmente quando a contaminação de um grande reservatório de água é implicada com uma grande população em risco, e um aumento da incidência de infecção por *T. gondii* (Meyreles et al., 2015). A tabela 3 ilustra o quantitativo de casos confirmados de toxoplasmose congênita entre os anos de 2011 e 2015 de acordo com o Centro Europeu de Prevenção e Controle das Doenças. Em 2017, 40 casos de toxoplasmose congênita foram relatados na União Europeia por 19 países. Sete países (Bulgária, República Checa, Alemanha, Polónia, Eslovénia, Espanha e Reino Unido) comunicaram menos um caso confirmado de toxoplasmose, na forma congênita, e 12 países relataram zero casos. A taxa de notificação a União Europeia foi de 1,31 por 100.000 nascidos vivos. Também em 2017, as taxas de notificação específicas por país mais elevadas foram observadas na Eslovénia e na Polónia (9,8 e 4,7 casos por 100.000 nascidos vivos, respectivamente). A Polónia representou 47,4% de todos os casos confirmados comunicados a nível da União Europeia em 2017 e que apresentaram as segundas taxas de notificação mais elevadas depois da França, durante o período de 4 anos em 2013–2016. Não foram registrados casos fatais devido a toxoplasmose congênita (EFSA & ECDC, 2018).

**Tabela 3** - Casos confirmados de toxoplasmose congênita: números e taxa por 100.000 nascidos vivos, por país e ano, EU/EEA, 2011–2015 (European Centre for Disease Prevention and Control, 2018)

Países	CC (2011)		CC (2012)		CC (2013)		CC (2014)		CN CR		CC (2015)		ASR
	N	t	N	t	N	t	N	t	N	t	N	t	
Alemanha	14	2,1	20	3,0	0	0,0	0	0,0	S	15	0	0,0	-
Áustria	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bélgica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bulgária	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	S	0	0	0,0	-
Chipre	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	S	0	0	0,0	-
Croácia	-	-	-	-	0	0,0	0	0,0	S	0	0	0,0	-
Dinamarca	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eslováquia	0	0,0	0	0,0	2	3,6	0	0,0	S	0	0	0,0	-
Eslovênia	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	S	1	1	4,8	-
Espanha	1	-	0	-	0	-	0	-	N	0	0	-	-
Estônia	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	S	0	0	0,0	-
Finlândia	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	S	0	0	0,0	-
França	186	22,6	104	12,7	179	22	216	26,4	S	246	246	30,8	-
Grécia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Holanda	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hungria	0	0,0	0	0,0	0	0,0	3	3,2	S	1	1	1,1	-
Irlanda	1	1,4	1	1,4	1	1,5	0	0,0	S	1	1	1,5	-
Islândia	-	-	-	-	-	0,0	0	0,0	S	0	0	0,0	-
Itália	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Letônia	0	0,0	1	5,0	0	0,0	0	0,0	S	0	0	0,0	-
Liechtenstein	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lituânia	0	0,0	1	3,3	1	3,3	0	0,0	S	1	1	3,2	-
Luxemburgo	0	0,0	1	16,6	0	0,0	0	0,0	S	0	0	0,0	-
Malta	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	S	0	0	0,0	-
Noruega	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Polónia	3	0,8	10	2,6	18	4,9	20	5,3	S	15	15	4,1	-
Portugal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reino Unido	7	0,9	5	0,6	2	0,3	11	1,4	S	7	7	0,9	-
República Tcheca	2	1,8	1	0,9	0	0,0	1	0,9	S	1	1	0,9	-
Roménia	-	-	-	-	-	-	1	0,5	S	-	-	-	-
Suécia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EU/EEA	214	6,2	144	4,2	203	5,9	252	7,2	-	288	273	7,9	-

Fonte: Relatórios de país. Legenda: S = sim, - = nenhum dado informado, ASR: taxa padronizada por idade, - = nenhuma taxa de notificação calculada, N (número), t (taxa), CC (casos confirmados), CN (cobertura Nacional), CR (casos relatados).

## 1.6 Transmissão

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, o *T. gondii* é a quarta protozoose mais importante quando o veículo de transmissão são os alimentos. No contexto europeu, a toxoplasmose é a segunda em transmissão via alimentos contaminados (Tefera et al., 2018). A contaminação de reservatórios por fezes de felinos infectados pode levar a surtos ou epidemias, envolvendo uma cidade ou mesmo uma região (FUNASA, 2002).

Os materiais de transmissão como carnes e leite, são veículos importantes na epidemiologia da doença (Dubey, 1980; Dubey et al., 2009; Powell et al., 2001; Riemann et al., 1975; Skinner et al.,



1990). O alto consumo da carne (suína, caprina e de coelhos), a viabilidade dos cistos na musculatura destes animais por mais de 150 dias (Dubey et al., 1984) e a sobrevivência do *T. gondii* nestes cistos (Hill & Dubey, 2002), torna o consumo deste alimento, cru ou malcozido, um importante vetor de transmissão ao homem (Cademartori, 2007; Koski, 1990; Xiao et al., 2010). Estudos mostram que 30% a 63% das infecções em diferentes cidades da Europa foram atribuídos ao consumo de produtos à base de carne mal cozidas e 6% a 17% ao contato do solo (Cook et al., 2000). Além disso, os taquizoítos podem ser encontrados no leite de hospedeiros (cabras, ovelhas e vacas). O leite não pasteurizado de cabras está associado ao quadro agudo da toxoplasmose (Bonametti et al., 1997). Algumas pesquisas sugerem que a carne é mais importante do que os gatos na transmissão do parasita (Dubey & Beattie, 1988), sendo a prevalência maior da doença em trabalhadores que lidam com carnes potencialmente infectantes (Jones & Dubey, 2014).

A água pode ser considerada uma importante via de transmissão para a toxoplasmose, atuando como um disseminador de oocistos para a população que venha a utilizá-la (Dias et al., 2011; Lopes et al., 2009). Trabalhadores expostos a frutas e vegetais crus não lavados sugerem que o manuseio desses produtos parece não ser um risco ocupacional importante para a infecção por *T. gondii* (Liesenfeld et al., 2011).

O *T. gondii* utiliza mecanismos para potencializar sua transmissão aos felídeos: o *parasita* remove o medo instintivo de um rato por odores de gato e, em vez disso, gera uma atração (Berdy et al., 2000; House et al., 2011). Acredita-se que essa mudança seja uma manipulação parasitária do comportamento do hospedeiro, devido ao requisito obrigatório para o intestino do gato na reprodução sexual do parasita. É possível que os mecanismos empregados pelo *T. gondii* para reduzir o medo possam fornecer uma ferramenta heurística para o manejo clínico do medo excessivo. A presença destes animais e a ingestão de salada crua aumenta em 2,6 a 3,4 vezes, respectivamente, as chances de infecção de imunossuprimidos com HIV-SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida) (Oliveira, 2016).

De fato, os felinos são importantes hospedeiros do *T. gondii*, onde metade desta população apresenta anticorpos anti – *T. gondii* (Veronesi, 1991). Nos gatos, a toxoplasmose (doença) não é muito frequente quando comparada a taxa de infecção verificada nestes animais através de levantamentos sorológicos (Germano, 1985). Porém, alguns felinos podem desenvolver doença aguda. Nestes casos os sinais mais frequentemente observados incluem febre, tosse, dispneia, letargia, anorexia, vômito, diarreia e icterícia, além de alterações miocárdicas, hiperestesia muscular, alterações neurológicas e oculares

(Lucas et al., 1998). O quadro clínico pode evoluir para a morte, principalmente se o animal não for convenientemente tratado (Germano, 1985). Há a possibilidade do ciclo do *T. gondii* ocorrer na ausência de felinos. Quando gatos jovens se alimentam com um hospedeiro intermediário que apresente toxoplasmose aguda ou crônica, começam a aparecer oocistos imaturos em suas fezes. O mesmo acontece se o felino se contaminar através da ingestão de oocistos esporulados. Também podem ocorrer surtos por transmissão de cistos teciduais, contidos em alimentos compostos por carne crua ou pouco cozida (Bonametti et al., 1997), sendo este alimento, o principal fator de risco para infecção com toxoplasma.

A transmissão vertical da toxoplasmose é desempenhada pelos taquizoítos, no entanto, sua fragilidade às condições ambientais (temperatura, umidade e disponibilidade de alimento) o torna um parasita inócuo no que se refere a transmissão horizontal (Tenter et al., 2000). O transplante de órgãos de pacientes infectados para pacientes sem o parasita tem sido relatado como fonte de infecção (Tenter et al., 2000) já que a presença dos taquizoítos no sangue ou tecido do doador podem resultar em rompimento dos cistos presentes, contaminando as células do receptor do órgão (Cosme Alvarado-Esquivel et al., 2018; Derouin & Pelloux, 2008). A transmissão da toxoplasmose congênita ocorre por via hematogênica, sendo obrigatória a via placentária que ocorre em dias, podendo chegar à semanas até a infecção fetal (Bichara, Andrade, & Lago, 2014; Cortina-Borja et al., 2010; Wallon et al., 2013).

Outras formas de transmissão, de baixo valor epidemiológico e com baixo risco de contaminação, é a falta de cuidados com a manipulação de material infectado ou acidentes laboratoriais (Barbosa et al., 2014).

A capacidade de conversão de estágio agudo proliferativo causador da doença, através de taquizoítos, a um estágio crônico adormecido, na forma de bradizoítos, confere um fator crítico de transmissão e na patogênese do *T. gondii* (Jeffers et al., 2018).

## 1.7 Quadro clínico

### 1.7.1 Toxoplasmose em imunocompetentes

A toxoplasmose adquirida é, geralmente, assintomática em 80% a 90% nos indivíduos que possuem sistema imune íntegro. A infecção no homem saudável e mulheres que não estejam grávidas não representa grandes riscos de doença. Nesses grupos os sintomas podem ser confundidos com outras doenças, apresentando febre, cefaleias e dores musculares (Mitsuka-Breganó et al., 2010). As

manifestações clínicas da toxoplasmose podem se apresentar na forma linfoglandular, meningoencefalite, coriorretinite, pneumonite, miocardite, hepatite, miosite e erupção cutânea.

Apesar da meningoencefalite estar associada aos indivíduos imunocomprometidos, já foram relatados casos em indivíduos imunocompetentes. Os distúrbios do comportamento e nível de consciência são as principais manifestações (Carvalho & Farhat, 1999).

O *T. gondii* é associado a mudanças de comportamento humano, personalidade e outros traços fenotípicos têm sido estudados com maior profundidade, muitas vezes no contexto da teoria da manipulação, sugerindo que muitos parasitas modificam o fenótipo do hospedeiro para aumentar suas chances de transmissão, sendo considerado um modelo preferido para parasitologistas evolutivos, biólogos e também psiquiatras (Flegr, 2013). Doenças psiquiátricas, como: esquizofrenia (Al-Hussainy et al., 2015; Dickerson et al., 2014; Ebrahimzadeh, Shahraki, & Mohammadi, 2018; Fond et al., 2013; Hamidinejat et al., 2010; Kannan & Pletnikov, 2012; Mortensen et al., 2007; Torrey & Yolken, 2003), transtorno obsessivo-compulsivo (Fond et al., 2013; Miman et al., 2010), distúrbio explosivo intermitente (Coccaro et al., 2016), surtos psicóticos (Lindgren et al., 2018), depressão, bipolaridade e humor (Al-Hussainy et al., 2015; Duffy, 2013; Halaris & Yolken, 2018), transtorno de depressão maior (Al-Hussainy et al., 2015), agressividade e impulsividade em adultos saudáveis (Cook et al., 2015), comportamento suicidas (Coccaro et al., 2016; Lester, 2010; Ling et al., 2012; Pedersen et al., 2012) e distúrbio de ansiedade generalizada (Markovitz et al., 2015; Suvisaari et al., 2017). A afinidade do *T. gondii* com o sistema nervoso e sua capacidade de gerar distúrbios nervosos é uma nova frente de pesquisas para estabelecer relações entre o parasita e hospedeiro, estabelecendo uma relação que pode levar a novas matrizes preventivas e terapêuticas (Al-Hussainy et al., 2015). Outros estudos, como: provável relação com a doença de Parkinson (Fallahi et al., 2017; Miman et al., 2010) (Miman et al., 2010), epilepsia criptogênica (Yazar et al., 2003), correlação positiva entre anticorpos anti-*Toxoplasma* e incidências de câncer cerebral (Thirugnanam et al., 2013), doenças hepáticas (Liesenfeld et al., 2011) e associação a hérnia abdominal (Alvarado-Esquivel., 2011). As manifestações psiquiátricas podem ser explicadas através da liberação de componentes do parasita que infectam as células cerebrais e podem ter efeitos nas células circundantes e impactar o modo ou comportamento do hospedeiro (Carruthers & Suzuki, 2007; Kochanowsky & Koshy, 2018). Alguns estudos, ainda em desenvolvimento, tem associado a presença do *T. gondii* a esclerose múltipla (Saberri et al., 2018).

As manifestações clínicas no recém-nascido representam apenas 10% das anormalidades ao exame físico, podendo apresentar um quadro generalizado. Dois terços dos fetos que apresentam

sintomas que são localizados no sistema nervoso central e nos olhos, com microcefalia ou hidrocefalia, convulsões, microftalmia e catarata (Levi, 2014).

### 1.7.2 Toxoplasmose em imunodeprimidos

O quadro clínico da toxoplasmose em indivíduos imunocomprometidos pode variar conforme a intensidade da imunossupressão (Avelino-Silva & Kallás, 2014). Os indivíduos imunossuprimidos, portadores de HIV ou doença debilitante, por seus mecanismos de defesas estarem comprometidos, podem sofrer danos maiores tais como, cegueira e lesões cerebrais, podendo às vezes, em casos extremos, evoluir para a morte (Kodym et al., 2015). Em indivíduos imunossuprimidos, 10% a 20% dos adultos infectados apresentam, na fase aguda da doença, as seguintes formas clínicas: linfoglandular (mais frequente), meningoencefalite, pneumonite, hepatite, miosite, erupção cutânea e retinocoroidite (Avelino-Silva & Kallás, 2014). A linfadenopatia, acompanhada de mialgia, mal-estar e febre, é a manifestação clínica mais frequente. Essas manifestações podem ser de rápida duração ou persistirem por meses. A encefalite, a miocardite e a pneumonite são manifestações típicas em imunocomprometidos. A toxoplasmose é uma doença de risco para pacientes com SIDA, ocorrendo cerca de 10% de óbitos nos EUA e até 30% na Europa (Hill & Dubey, 2002). A tabela 4 mostra as principais manifestações clínicas da encefalite por toxoplasma.

**Tabela 4** - Principais manifestações clínicas da encefalite por toxoplasma em pacientes imunocomprometidos (extraído de Souza & Belfort Jr, 2014)

Manifestações clínicas	Frequência de apresentação
Cefaleia	49% - 63%
Febre	41% - 68%
Déficits focais	22% - 80%
Convulsões	19% - 29%
Confusão mental	15% - 52%
Ataxia	15% - 25%
Letargia	12% - 44%
Alterações de pares cranianos	12% - 19%
Alterações visuais	8% - 15%

### 1.7.3 Toxoplasmose congênita

As manifestações clínicas da toxoplasmose atingem maior severidade quando adquirida de forma congênita (Beverley, 1973; Daffos et al., 1988). Existem variáveis que podem ser citadas para aumentar

o risco de infecção, como: idade gestacional, virulência da cepa do parasita, resposta imune da mãe, permeabilidade da placenta e o tratamento pré-natal (Chaudhry et al., 2014; Dunn et al., 1999). Sua taxa de óbitos varia de 40 a 50% e os neonatos sobreviventes podem adquirir sequelas irreversíveis, como: convulsões, espasticidade, microcefalia, hidrocefalia, meningoencefalomielite, retardamento mental, coriorretinite, hepatoesplenomegalia, icterícia e erupções cutâneas (Prusa et al., 2012; Remington et al., 2006). De entre as mulheres que foram infectadas pelo *T. gondii* durante a gravidez, 39% vão transmitir a doença ao feto, 26% das crianças vão apresentar infecção subclínica e 13% vão desenvolver uma infecção clínica (7% de forma grave e 6% de forma moderada) (Mandai et al., 2007).

A virulência do protozoário no feto é desencadeada de acordo com o período em que aconteceu a infecção. Nos três primeiros meses, a infecção pode levar a morte fetal. No segundo trimestre o feto apresenta hidrocefalia, com macro ou microcefalia (em 50% dos casos), retinocoroidite (em 90% dos pacientes com infecção), calcificações cerebrais (em 69%) e retardo mental ou perturbações neurológicas (em 60% dos casos); o recém-nascido também pode apresentar lesões iniciais como nódulos miliares disseminados por todo o encéfalo, ou em torno de focos necróticos; os ventrículos cerebrais podem estar dilatados e as lesões cerebrais podem se calcificar. Podem também ocorrer alterações, como: graus variáveis de degeneração e edema de retina, lesões vasculares da coroide, neurite óptica, microftalmo, nistagmo e estrabismo são possibilidades que podem acometer pacientes (Galván-Ramírez & Mondragón-Flores, 2017). A toxoplasmose ocular congênita provoca principalmente malformação congênita, anótalos, aniridia congênita, catoratografia congênita, neurite óptica, estrabismo, ambliopia, nistagmo, atrofia óptica, defeitos do campo visual, etc. As lesões oculares originadas por infecções adquiridas ocorrem após o parto, o que resultou em destruição de tecidos e respostas inflamatórias (Zhou et al., 2011). Essas lesões, juntamente com as lesões intracranianas, são frequentes, sendo observadas em 20 a 30% dos casos aos três anos de idade. Em alguns casos sintomáticos podem ocorrer febre, cefaleia, fadiga e miocardite (Tenter et al., 2000).

A sobrevivência de crianças a toxoplasmose pode gerar, na maioria das vezes, deficiência mental (Galván-Ramírez & Mondragón-Flores, 2017). Os danos neurológicos e o comprometimento visual associados a toxoplasmose congênita são referenciados em 3% dos recém-nascidos com toxoplasmose congênita (Cook et al., 2000; Guerina et al., 1994; Lebech et al., 1999).

## 1.8 Prevenção e tratamento

Medidas que possam diminuir a eliminação de oocistos por gatos domésticos são importantes para reduzir a transmissão da infecção para os seres humanos e outros animais (Frenkel, 1971). Para

evitar esta transmissão propõe-se manter os gatos domésticos no interior de residências com o mínimo de contato com o meio externo, com a alimentação controlada, com a oferta de ração ou alimentos que sofreram tratamento térmico adequado (acima de 67°C) (Dubey, 1996; Tenter et al., 2000), não devendo alimentá-los com carne não cozida, vísceras ou ossos, evitando que se alimentem de animais vetores, como o rato.

A viabilidade dos cistos de *T. gondii* em carne suína e ovina, mesmo no interior da geladeira, é um importante mecanismo de transmissão. Entretanto, tornam-se inviáveis em temperaturas abaixo de -12°C ou em temperaturas superiores da 67°C (Dubey et al., 1996). Neste sentido torna-se necessário cozinhar adequadamente estas carnes. Além disso, as mãos devem ser higienizadas após o manuseio de carnes cruas, pois os cistos poderão estar ativados. Materiais como sabão, água, álcool e desinfetantes são bons materiais para inativar estes cistos (Dubey & Foreyt, 2000). A utilização de luvas ao manusear o solo também é um fator de prevenção, já que a mesma pode estar contaminada com fezes de gatos (Kapperud et al., 1996).

As estratégias preventivas devem visar reduzir prevalência de infecção na carne, expor em embalagens os métodos de cultivo e processamento e intensificar as campanhas de informações a respeito da doença em mulheres grávidas (Cook et al., 2000). Vegetais devem ser bem lavados antes da ingestão, pois podem ser infectados pelo solo contaminado com fezes de gatos. Outro método de prevenção, a triagem sorológica é um importante instrumento na profilaxia da toxoplasmose congênita, pois a partir do levantamento da sorologia, podem-se adotar medidas preventivas e terapêuticas, a fim de diminuir possíveis transmissões ao feto (Castilho-Pellosso et al., 2005). A realização de sorologias deve ser frequente, preferencialmente uma vez a cada trimestre. O primeiro trimestre da gestação é fundamental, pois pode-se identificar os casos agudos e iniciar imediatamente a administração medicamentosa com antimicrobianos. Se a infecção materna ocorrer antes da décima quinta semana de gestação, o feto possui 5% de chances de adquirir a doença ou adquirir doença menos grave. Se a infecção ocorrer no final da gravidez, o feto adquire o protozoário, não apresentando sintomas ou apresentando doença menos grave.

O tratamento da toxoplasmose não tem sido modificado desde a década de 90, tendo foco em alterar o metabolismo de nucleotídeos do parasita. O mecanismo farmacológico do tratamento se dá pela combinação de fármacos que bloqueiam a síntese de ADN do parasita, pois inibem a síntese de ácido fólico nos taquizoítos do *T. gondii*. A terapêutica é fundamentada em uma combinação sinérgica de pirimetamina e sulfadiazina, medicamentos que promovem o bloqueio da síntese e diminuição dos

níveis de ácido fólico nos taquizoítos (Souza, 2017) e, portanto, é um fármaco tóxico para a medula, devendo a paciente receber ácido folínico (nunca ácido fólico, que anula a ação terapêutica da pirimetamina) para prevenir alterações como neutropenia, trombocitopenia e anemia. Nos casos em que a infecção fetal não for confirmada, o tratamento com espiramicina poderá ser continuado durante toda a gestação. O tratamento específico nem sempre é indicado nos casos em que o hospedeiro é imunocompetente, exceto em infecção inicial durante a gestação ou na vigência de comprometimento de outros órgãos, como coriorretinite e miocardite. Recomenda-se o tratamento em gestantes, recém-nascidos e pacientes imunodeprimidos.

## 1.9 Interação com o hospedeiro

A função primordial do sistema imunológico humano é a defesa contra antígenos, mesmo substâncias não infecciosas podem causar processos inflamatórios. As células responsáveis por esta defesa também podem desencadear processos que causem danos teciduais em algumas situações. Todo o repertório imunológico deve trabalhar de forma conjunta e harmoniosa para que os processos de defesa obtenham sucesso. As moléculas que atuam na defesa do organismo são diversificadas e específicas, dentre elas estão as imunoglobulinas. As imunoglobulinas são moléculas de glicoproteína que são produzidas pelos plasmócitos em resposta a um imunógeno e que funcionam como anticorpos. As imunoglobulinas derivam seu nome da descoberta de que elas migram com as proteínas globulares quando soro contendo anticorpos é colocado em um campo elétrico.

Na toxoplasmose, como em outras infecções por parasitas intracelulares, a proteção é assegurada principalmente pela imunidade celular, cabendo aos anticorpos um papel secundário.

### 1.9.1 Resposta imune do hospedeiro

Os mecanismos de infecção do *T. gondii* acontecem em meio intracelular e podem ter tempos de permanência elevados, já que, evolutivamente, estes adquiriram a capacidade de combater as agressões desencadeadas pelo sistema imune. O sistema imunitário humano suprime grande parte das ações desenvolvidas pelos protozoários, ou seja, serão infectados apenas uma parcela de indivíduos. A permanência dos protozoários nos tecidos não causa, necessariamente, uma infecção, a não ser que o equilíbrio “resposta imune” *versus* “parasita” seja perdido (declínio do sistema imune ou resposta imunitária exacerbada) (Machado et al., 2004).

O *T. gondii* expressa os antígenos de superfície (SAG), importantes nos mecanismos imunológicos (imunidade humoral), patogênicos e de invasão do parasita (Aubert et al., 2000;

Dzierszynski et al., 2000; Alexander & Hunter, 1998; Aliberti, 2005; Denkers & Marshall, 1998)). As imunoglobulinas que participam da defesa imunológica do *T. gondii* são importantes na fixação de fragmentos do complemento no parasita permitindo a fusão dos lisossomos aos vacúolos parasitóforos onde estão contidos, reduzindo sua inacessibilidade dentro dos macrófagos infectados (Wyler, 1990; Hegab & Al-Mutawa, 2003). Embora com papel secundário, a imunidade humoral também colabora no controle da infecção pelo *T. gondii*, facilitando os mecanismos de destruição do parasita (Alexander & Hunter, 1998; Aliberti, 2005; Denkers & Marshall, 1998; Dupont et al., 2014). A ação das imunoglobulinas é dirigida especialmente ao taquizoíto, aderindo à sua membrana e dificultando sua adesão aos receptores da célula hospedeira (Hegab & Al-Mutawa, 2003).

As células T atuam na mediação da resposta imunológica da toxoplasmose, induzindo, assim, a produção de células apropriadas, como as células TCD4 e TCD8. Além das células T, as células B e as imunoglobulinas IgG, IgM e IgE atuam na vigilância epidemiológica e proteção do organismo contra o parasita (Joiner & Dubremetz, 1993). Na fase inicial da infecção, a imunidade inata tem papel importante na resistência ao *T. gondii*. Esta resposta não específica inibe também a coinfeção do hospedeiro por microrganismos como *Listeria monocytogenes*, *Schistosoma mansoni* e certos vírus, e limita o desenvolvimento de alguns tumores. Nesta fase o parasita ativa algumas células como macrófagos, células NK, células dendríticas e neutrófilos. Essa ativação tem duas principais consequências: limita a replicação dos taquizoítos e dirige o desenvolvimento dos linfócitos Th1, ao iniciar a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (Aliberti, 2005; Denkers & Marshall, 1998). A IL-12, citocina importante no desenvolvimento da resposta imune adaptativa, ativa os macrófagos e suas funções microbicidas, aumenta a produção de IFN- $\gamma$  pelas células NK e dirige a proliferação dos linfócitos T CD4+ e CD8+, que produzem mais IFN- $\gamma$ , assumindo o perfil Th1 característico. O IFN- $\gamma$  tem grande importância no controle da infecção pelo *T. gondii*, tanto na fase aguda como na crônica. Sua produção pelos CD4+ estimulados pela IL-12 ocorre já a partir do quinto dia de infecção (Alexander & Hunter, 1998; Aliberti, 2005).

As respostas associadas às citocinas pró-inflamatórias podem ser altamente tóxicas para o hospedeiro, mas ao mesmo tempo o *T. gondii* estimula mecanismos de controle que modulam a resposta imunológica, diminuindo os danos e prevenindo a morte do hospedeiro, através da produção de citocinas anti-inflamatórias (como IL-10, IL-4 e TGF- $\beta$ ) e substâncias como óxido nítrico.. Apesar de serem de certa forma protetores, estes mecanismos subvertem a resposta imune e permitem a evolução da infecção para a fase crônica, que predispõe a reativações e serve como reservatório para eventual transmissão a outros hospedeiros. As citocinas anti-inflamatórias podem também predispor à encefalite toxoplásmica



por diminuir o papel protetor do IFN- $\gamma$ , que tem grande importância na manutenção da fase latente. Em sinergia com o TNF- $\alpha$ , o IFN- $\gamma$  media a morte dos taquizoítos e promove sua transformação em bradizoítos, tendo também papel protetor sobre a ruptura dos cistos. Tanto os linfócitos CD8+ como os CD4+ são importantes na manutenção da latência da infecção toxoplásmica, atuando sinergicamente (Hegab & Al-Mutawa, 2003).

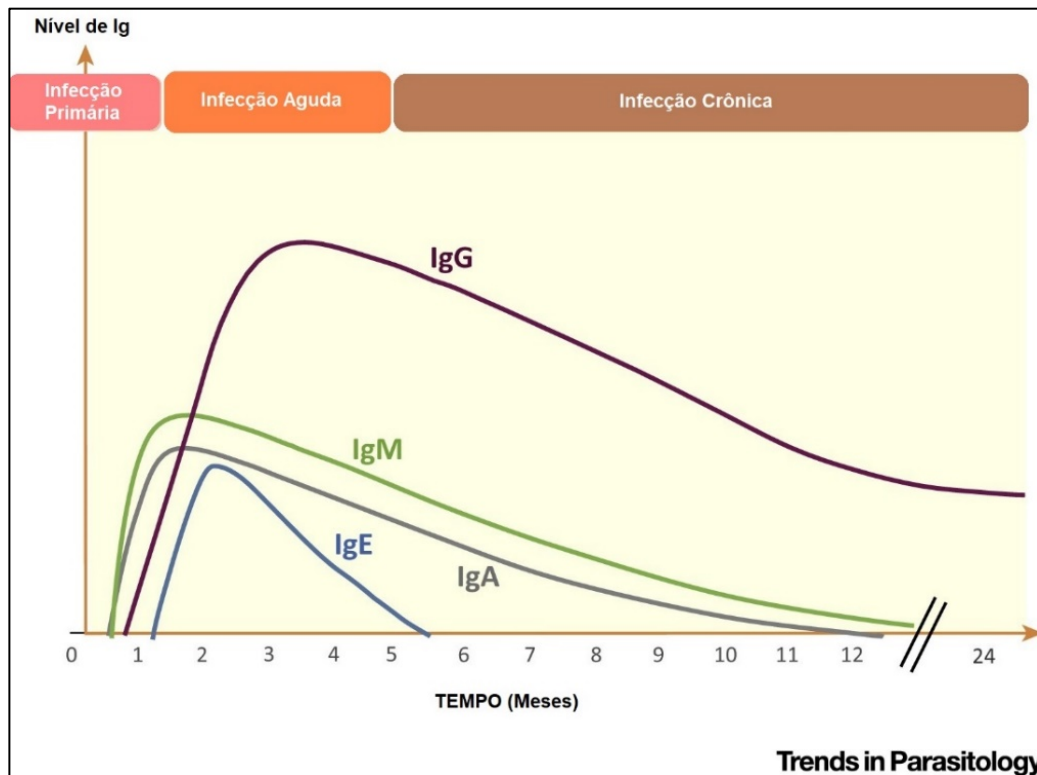
Nas gestantes, a resposta imunológica é essencial para a manutenção da gravidez. A secreção de hormônios pela placenta (citocininas e quimiocininas) atua na tolerância materna frente ao feto e sua participação ativa na regulação da resposta imune sistêmica. O aumento da produção de alguns hormônios na circulação da gestante influencia a modulação da resposta imune: a progesterona inibe a produção de IL-12, FNT- $\alpha$  e NO pelo macrófagos, aumenta a produção de IL-10, reduz a atividade das células NK, inibe a resposta do tipo Th1 e estimula a Th2 (Pfaff et al., 2007).

### **1.9.2 Estrutura e algumas propriedades de classes e subclasses de imunoglobulinas IgG e IgM**

A alta afinidade que possui o anticorpo e o antígeno é determinada precisamente pela formação de pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas, forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas. Os domínios, na metade carboxiterminal, chamados de domínios C (constantes), são típicos de cada espécie e participam na regulação da resposta imunológica, representando cerca de 90% da massa total do anticorpo. Esta divisão é que determina o papel bifuncional dos anticorpos: uma fração da molécula intervém na união específica com o antígeno, enquanto que a outra é responsável pela união dos tecidos e moléculas do hospedeiro, incluindo diversas células do sistema imunológico (Nunes, 2005). A ativação de distintas funções biológicas depende das diferentes cadeias pesadas que possuem as imunoglobulinas, o que lhes confere uma classificação segundo a estrutura dessas cadeias.

A fase aguda em indivíduos imunocompetentes é caracterizada pela produção de IgM e, posteriormente, ocorre a produção de IgG. Se a infecção for adquirida pela via oral, a imunoglobulina produzida será a IgA (mais comum em secreções, decai mais rapidamente que o IgM e o IgG e na maioria das vezes não é possível sua detecção). Dependendo da técnica utilizada para quantificar essas imunoglobulinas, os anticorpos IgM podem ser dosados entre uma e duas semanas após o início da infecção, ocorrendo alta produção em até oito semanas, quando decrescem. Títulos baixos podem persistir por mais de doze meses. O anticorpo IgG persiste por toda a vida na maioria dos pacientes (Cantos et al., 2000), sendo um marcador sorológico de fase crônica, ou seja, pode ser detectado a qualquer tempo, e sua alta quantidade no plasma sanguíneo facilita a identificação em testes diagnósticos. O IgM é a principal imunoglobulina de resposta primária aos antígenos, sendo utilizado

como marcador sorológico de fase aguda e da presença da toxoplasmose congênita em fetos. As outras classes de imunoglobulinas (IgA e IgE) também são marcadores de fase aguda, estando pouco presentes no plasma sanguíneo, no caso da IgA, ou são mais específicas para outros tipos de parasitas.



**Figura 7** - Cinética das imunoglobulinas envolvidas na infecção do *T. gondii*. A produção das imunoglobulinas é variável, dependendo do paciente. (Extraído de Dard et al., 2016)

As imunoglobulinas G e M possuem maior tempo de duração no sistema imunológico, sendo os principais anticorpos para detecção de patologias.

A IgG é um monômero, diferenciando de outras classes a partir da quantidade de pontes dissulfetos, que ligam as cadeias pesadas, e o comprimento da região de dobradiça (Figura 8). Esta imunoglobulina possui uma unidade básica de quatro cadeias, consistindo de duas cadeias polipeptídicas leves idênticas, e outras duas pesadas, também idênticas. A porção Fc desta molécula possui uma estrutura semelhante à de um fragmento Fc isolado, com a porção carboidrato desempenhando um papel central como o principal contato entre os domínios CH<sub>2</sub> (Silverton et al., 1977).

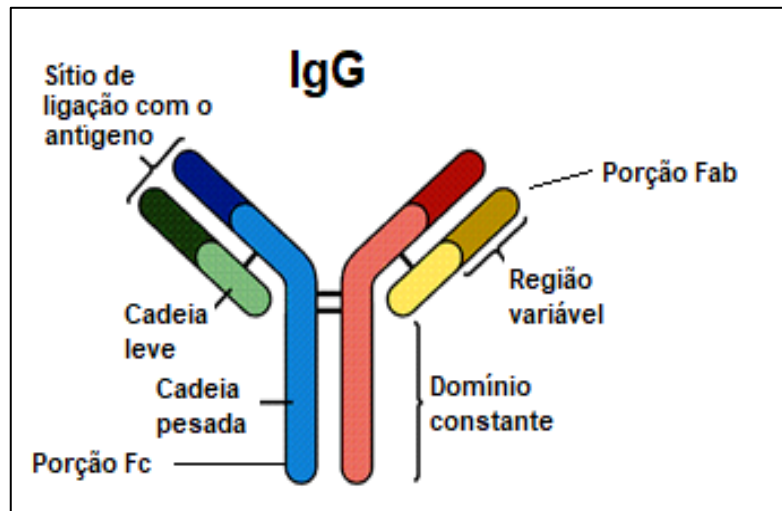
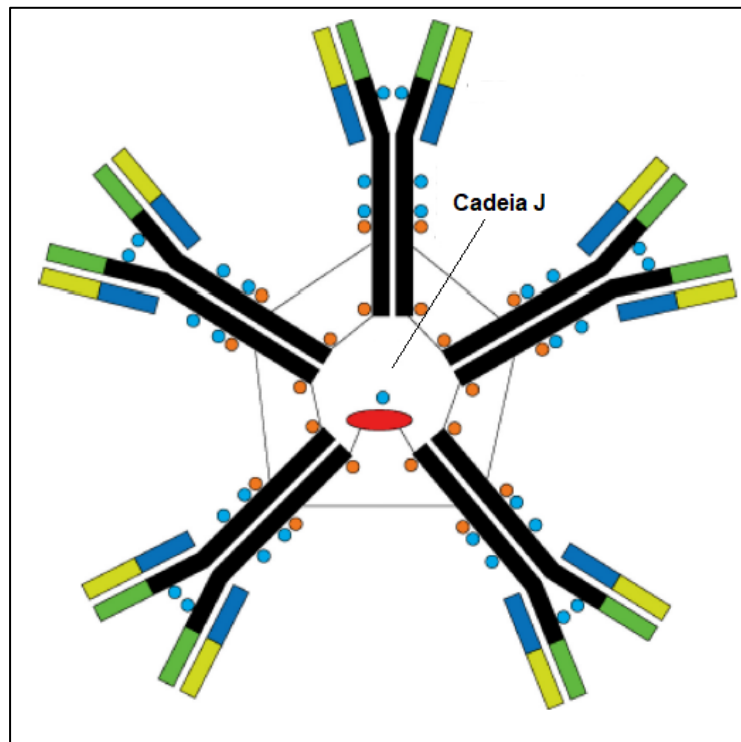


Figura 8 - Estrutura do IgG (extraído de Mader, 1997)

A principal característica do IgG é a versatilidade, pois é capaz de realizar todas as funções das moléculas de imunoglobulinas. Está presente em 70-75% do soro sanguíneo, atuando, principalmente, em espaços extra vasculares, e em 5-10% do plasma sanguíneo. Suas subclasses não respondem de forma única no que se refere à passagem pela placenta. Sua porção Fc é responsável pela ligação em algumas células, como: macrófagos, linfócitos e monócitos.

A estrutura da IgM está apresentada na figura 9. Diferentemente da IgG, a IgM se apresenta como um pentâmero, podendo ser encontrada como um monômero (em superfícies de células B onde atua como receptor de antígenos). Suas cadeias, pesadas e leves são idênticas e ligadas entre si por pontes dissulfetos e por uma cadeia polipeptídica chamada cadeia J. Esta cadeia funciona em polimerização da molécula a um pentâmero. Como consequência da sua estrutura pentamérica, o IgM é uma boa imunoglobulina fixadora do complemento e aglutinadora de organismos. Assim, anticorpos IgM são muito eficientes causando lise de microrganismos, além de respostas mais rápidas a uma variedade de antígenos (Schroeder & Cavacini, 2010).



**Figura 9** - Estrutura do IgM com os 10 sítios de ligação com o antígeno, pontes dissulfetos e a cadeia J (Extraído de Schroeder & Cavacini, 2010)

O IgM é a terceira imunoglobulina mais comum no soro sanguíneo, sendo a primeira a ser produzida pelo feto e por células B virgens ao serem estimuladas pelo antígeno. Esta imunoglobulina é encontrada, principalmente, no espaço intravascular, é produzida na fase aguda e desencadeia as respostas humorais. Além disso a IgM não atravessa a placenta, por conta de sua estrutura pentamérica, sua valência de interação é polivalente, pois possui mais sítios ativos, tornando sua avidéz de interação alta. Sua vida média é curta, dificultando a detecção desta imunoglobulina em exames diagnósticos, exceto quando o IgM é persistente. Esse tipo de imunoglobulina positiva-se em 5 a 14 dias após a infecção e atingem produção máxima após 30 dias, permanecendo ativos até 18 meses (Mitsuka-Breganó et al., 2010).

### 1.10 Métodos de diagnóstico da toxoplasmose

A complexidade da toxoplasmose (ausência de sintomas, acometimento durante a gestação e a forma congênita) tornam a toxoplasmose uma doença complexa. A interpretação dos recursos diagnósticos deve ser encarada de forma holística, seja sob a ótica da sensibilidade, especificidade ou outro parâmetro, sendo respeitado o momento provável da infecção (Garweg, 2005). O diagnóstico da toxoplasmose é uma ferramenta importante para o profissional de saúde avaliar a enfermidade, pois a toxoplasmose pode ser confundida com outras doenças, dificultando o início do tratamento e controle

(Cantos et al., 2000; Vidotto, 1992). De facto o diagnóstico clínico da toxoplasmose é pouco confiável, pois os sintomas desta doença são inespecíficos e podem ser confundidos com outras doenças (Hill & Dubey, 2002), tornando o diagnóstico sorológico uma ferramenta imprescindível (Mitsuka-Breganó et al., 2010)

A maioria dos testes sorológicos disponíveis indicam o contato do parasita com o hospedeiro em um dado momento, já que detectam a presença de imunoglobulinas de fase crônica e fase aguda e não a presença de protozoário viável à infecção. Deste modo, são associados ao exame sorológico outros métodos de diagnóstico (Dubey, 2010) que são necessários para a interpretação da condição de saúde do paciente, assegurando sua saúde e bem-estar. Os chamados métodos indiretos (métodos que buscam a pesquisa de imunoglobulinas específicas do parasita) são os métodos mais comumente utilizados (Nasir et al., 2017). Como as variações no quantitativo de anticorpos anti - *T. gondii* obedecem a ritmos variados e são indicativos de fase crônica ou aguda da infecção (Ferreira & Moraes, 2013), estas imunoglobulinas são geralmente utilizadas como alvo do teste complementar. A cinética dessas imunoglobulinas demonstra uma correta interpretação dos exames, refletindo o processo evolutivo da infecção.

Os testes que detectam o *T. gondii* necessitam de preparação de antígenos (taquizoítos colhidos de camundongos ou sistemas de culturas de células). No entanto, o uso destes antígenos de taquizoítos íntegros pode resultar em reações falso-positivos (Hassi et al., 1991; Taylor et al., 1990). Assim, os principais avanços na área de diagnósticos de toxoplasmose são baseados na geração de antígenos recombinante, mais baratos e fáceis de padronizar, como os testes de IgG e IgM (Martin et al., 1998).

A precisão desses resultados é o ponto chave para se chegar a um diagnóstico apropriado, pois a existência de falsos positivos/negativos gera danos, às vezes irreversíveis, aos pacientes, além de tratamentos inadequados, desnecessários e altos gastos com repetitivas realizações de uma mesma análise. A escolha do melhor método diagnóstico deve ser baseada na sensibilidade da técnica, ou seja, deve ser capaz de identificar se um indivíduo está verdadeiramente com a doença. Os testes automatizados facilitam a triagem de rotina por serem mais práticos e de fácil manuseio, identificando imunoglobulinas específicas, seja IgG ou IgM, fornecendo resultados semelhantes (Gharavi et al., 2008). No entanto, mesmo utilizando os mesmos princípios para detectar a presença destas imunoglobulinas, podem surgir resultados equivocados, o que pode ser devido às diferentes cepas do protozoário ou a padronização dos antígenos utilizados (Souza et al., 2012). A virulência dessas cepas está caracterizada

nos modelos murinos (camundongos), sendo classificadas em virulentas, não virulentas e virulência intermediária (grau de morbidade e mortalidade) (Ferreira & Vitor, 2014).

O benefício da detecção precoce de doenças gera um tratamento que evita danos ao paciente e, conseqüentemente, a diminuição de possíveis sequelas. Além disso, os métodos devem ser capazes de detectar o parasita e devem ter custos acessíveis. Variáveis, como: taxas de prevalência (Stillwaggon et al., 2011), recomendações locais ou nacionais de acordo com os órgãos de saúde, mulheres grávidas, recém nascidos e imunodeprimidos devem ser levadas em consideração para que o diagnóstico seja o mais confiável possível, já que estes métodos podem ter desempenho variável (Bobic et al., 2009).

Tal como referido acima, nas infecções agudas são detectados níveis de IgM e IgG logo após a primeira ou segunda semana de infecção (IgM e IgG positivas). Habitualmente, níveis elevados de anticorpos IgG específicos sugerem que já tinha ocorrido infecção prévia. A presença de anticorpos IgM não assegura uma infecção recente, já que estes podem persistir no organismo por vários meses ou mesmo anos e ser um indicativo de toxoplasmose congênita, já que essa imunoglobulina não atravessa a placenta, indicando produção do anticorpo pelo próprio recém-nascido (Giannoulis et al., 2008). Por esse motivo, nos casos em que há presença, quer de IgM, quer de IgG, deverá ser avaliada a avidéz dos anticorpos IgG. Quando os resultados dos testes apresentam IgG positiva e IgM negativa, pode assegurar-se a existência de um contato prévio com o *T. gondii* (caso estes resultados sejam obtidos pela primeira vez numa idade gestacional já avançada, deverão ser solicitados exames prévios para excluir ou confirmar infecção durante a gravidez). A reativação da infecção durante a gravidez é extremamente rara. Os casos de IgM positiva com IgG negativa não são comuns; mediante estes resultados, não pode ser excluída a infecção. Segundo Giannoulis et al. (2008), em um período de 7 a 14 dias após infecção por *T. gondii* é possível detectar a presença de IgG anti-*T. gondii* em testes sorológicos. A presença destes anticorpos não indica, necessariamente, a fase aguda da infecção, mas apenas contato recente, por serem detectados por até 18 meses após a primoinfecção com IgM residuais (Beck et al., 2010). Os padrões sorológicos, IgG e IgM-negativas, IgG negativo e IgM positivo, IgG positivas e IgM negativas, e IgG e IgM positivo, são encontrados na população e sua distribuição obedece certos critérios (Sensini, 2006).

A pesquisa de IgM anti - *T. gondii* deve estar associada a outros testes de rotina. Quando positiva, deve ser feita a confirmação, tanto na mãe, quanto no feto e investigação completa e acompanhamento do lactente. Nos casos de IgM anti - *T. gondii* negativa esse acompanhamento deve continuar, pois essa imunoglobulina pode negatar-se precocemente no lactente infectado e passar despercebido pela triagem neonatal (Guerina et al., 1994; Vasconcelos-Santos et al., 2009). As análises das amostras devem ser realizadas com intervalos de duas semanas para determinar infecção recente. A Figura 10

resumo os procedimentos que devem ser adotados em uma unidade de saúde para triagem sorológica de toxoplasmose.

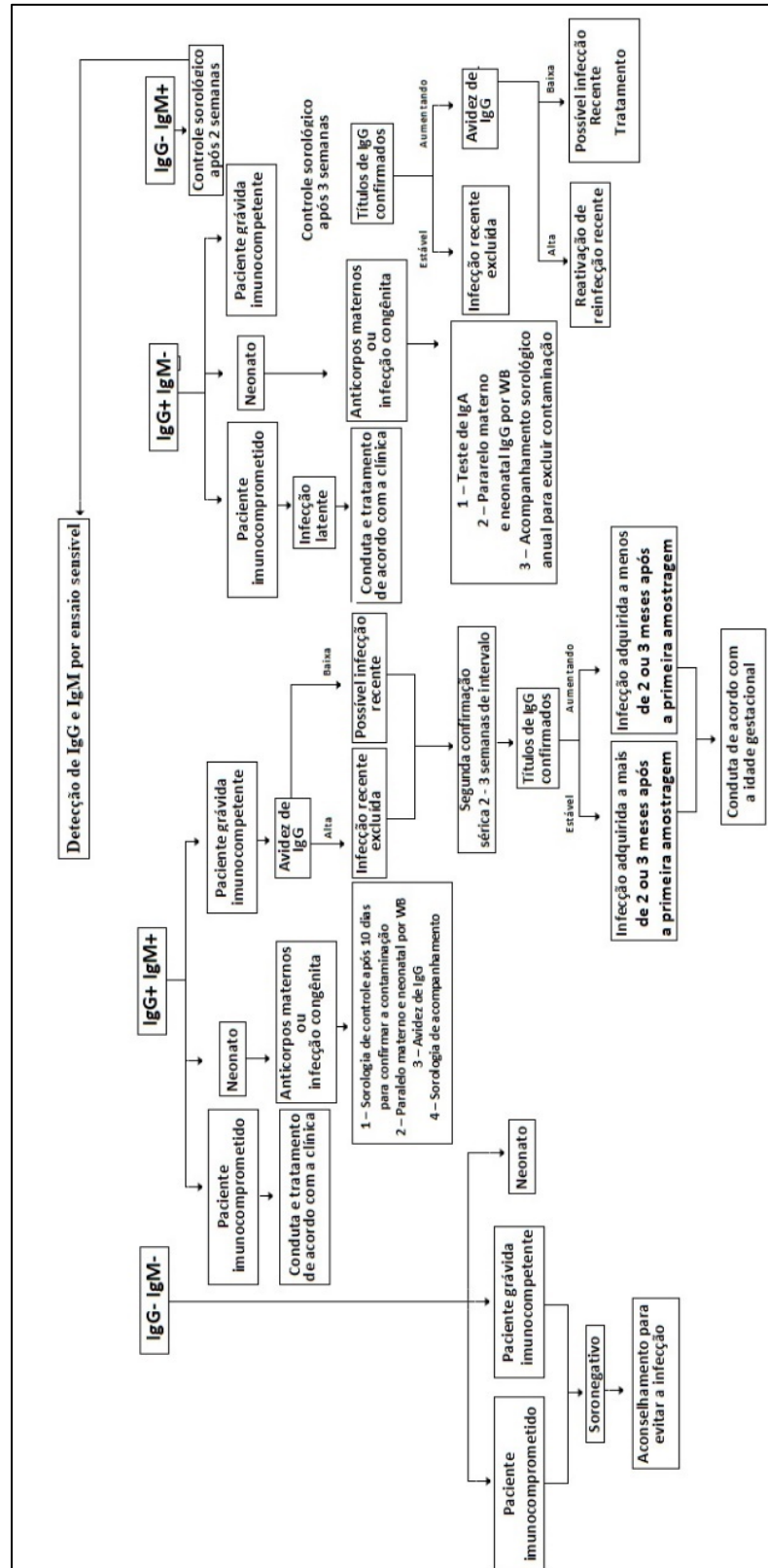


Figura 10 - Estratégias de diagnóstico para toxoplasmose. As estratégias de diagnóstico para detectar a toxoplasmose de acordo com a situação clínica e fundo imunológico do paciente, incluindo imunocompetentes, imunocomprometidos, grávidas e recém-nascidos (Zhang, Lin, Han, & Li, 2016)

Os diagnósticos *in vitro*, mais danosos aos pacientes, como a biópsia, podem detectar a presença de taquizoítos (Hill & Dubey, 2002), indicando uma infecção ativa, ou cistos teciduais, no caso de infecção latente. No caso de autópsias, o parasita, por depender do mecanismo celular do hospedeiro, pode não ser encontrado, já que o tecido do parasitado está em degeneração (Dubey, 2010). Outra forma de diagnosticar a toxoplasmose pode ser a associação, aos exames sorológicos, com o diagnóstico molecular, o qual busca detectar o ADN do *T. gondii* em amostras biológicas. Como exemplo, pode ser associada à sorologia a técnica de reação em cadeia da polimerase – PCR (Carneiro, 2011), pois o ADN do agente parasita é a prova concreta de sua presença no hospedeiro (Singh, 1997). O bioensaio em animais susceptíveis à doença é uma alternativa para indicar a viabilidade do parasita (Silveira, 2009).

O desenvolvimento de novos instrumentos com bases científicas, bem como a eficácia, a qualidade e o custo-benefício dessas técnicas, torna-se necessário para a melhoria da qualidade de vida da população. As técnicas verificadas neste estudo buscam atender a comunidade médica que anseia por instrumentos que atestem uma grande sensibilidade/especificidade e afastem os resultados falso positivos e falso negativos.

A toxoplasmose possui baixa parasitemia durante a infecção, mesmo na fase aguda, permitindo aos testes sorológicos identificar a imunidade do indivíduo (fator mais evidente). Os testes disponíveis não obedecem a protocolos únicos para a detecção de estágio da doença (aguda/crônica), forma infectante (taquizoíto, cisto e bradizoítos) e o tipo de cepa (I, II e III e/ou recombinantes). A junção de protocolos possibilitaria o acompanhamento e tratamento mais adequados para cada indivíduo. As cepas do *T. gondii* podem gerar respostas específicas, causando diferença na cinética da infecção e sintomatologia. Essas informações são especialmente importantes quando o indivíduo infectado faz parte de um dos grupos de riscos para a toxoplasmose (gestantes e/ou portadores do HIV) (Lopes et al., 2016). Cepas tipo I têm sido encontradas em pacientes com doenças congênitas; as cepas tipo II tem sido isoladas de pacientes imunocomprometidos com reativação da infecção crônica; as cepas do tipo III, em sua maioria, têm sido isoladas de animais. O uso de antígenos totais de *T. gondii* compromete a especificidade dos testes, pois o protozoário possui epítopos comuns com organismos filogeneticamente relacionados. Desta forma, estudos utilizando alvos antigênicos mais específicos têm sido uma tônica de trabalho na área, incluindo aí antígenos purificados, recombinantes ou sintéticos (Lopes et al., 2016).

Em indivíduos imunocomprometidos os testes diagnósticos possuem parâmetros diferenciados, como: aparecimento de linfoma primário do sistema nervoso central, abscessos bacterianos, tumores primários e metastáticos e doenças vasculares (Pereira-Chioccola et al., 2009). A produção de antígenos excretórios/secretórios pelos taquizoítos e as bandas oligoclonais de IgG no líquido cefalorraquidiano



também podem ser utilizados para indicar a reativação da doença, obtendo sensibilidade e especificidade variável (Avelino-Silva & Kallás, 2014).

Algumas técnicas de detecção de imunoglobulinas entraram em desuso, seja pela baixa sensibilidade, por não estarem mais disponíveis comercialmente ou restrições de uso. As novas tecnologias devem ser empregadas com cuidado e com bom senso para que a sociedade possa usufruir de todas as benesses geradas pelas técnicas de diagnóstico (Granato & Paulini Júnior, 2014).

### 1.10.1 Reação em cadeia da polimerase

A reação em cadeia de polimerase (PCR) é um método com elevada precisão e a sensibilidade. No entanto, esta técnica não pode ser a única, não devendo substituir os métodos tradicionais (Su et al., 2016). Por ser uma doença de fase crônica e aguda, o diagnóstico da toxoplasmose deve ser associado a dois ou mais métodos de diagnóstico, indicando o real estágio da infecção (Kompalic-Cristo et al., 2005). A vantagem desta técnica é a detecção do *T. gondii* mesmo em quantidades reduzidas ou lisadas, sendo o protozoário identificado pelos segmentos característicos de seu ADN (amplificado pelo PCR) e conclusão do exame em menos de 48 horas. Esta técnica é eficiente quando os títulos de anticorpos anti - *T. gondii*, em pacientes imunocomprometidos, são baixos ou ausentes ou em pacientes com gamaglobulinopatias, cujos títulos de anticorpos para *T.gondii* forem muito altos, mas que podem não estar causando tal condição clínica (Ho-Yen et al., 1992).

As desvantagens deste método molecular são o alto custo e falta de padronização quanto aos procedimentos de extração dos ácidos nucléicos ou aos segmentos ampliados, com resultados por vezes heterogêneos entre laboratórios diferentes (Pelloux et al., 1998).

### 1.10.2 Reação de Aglutinação por Imunoabsorção

O método de reação de aglutinação por imunoabsorção (ISAGA) é utilizado para identificação de anticorpos no diagnóstico de infecção aguda. Os antígenos adicionados constituem-se em uma suspensão de toxoplasmas que se aglutinam na presença de IgM, IgA e IgE específica (Remington et al., 2011; Sáfadi & Farhat, 1999). Alguns autores ressaltam a sensibilidade deste exame no diagnóstico de infecção aguda em gestantes e em recém-nascidos com infecção congênita. A detecção de precocidade da doença também é uma característica deste exame (Remington et al., 2011).

A ocorrência da persistência de reatividade ISAGA é indicativo de uma avaliação sorológica complementar para comprovar possíveis riscos de toxoplasmose congênita (Duffy et al., 1989).

### 1.10.3 Hemaglutinação Indireta

O teste de Hemaglutinação Indireta (IHA) detecta a presença de IgM. No entanto, a sua desvantagem se dá pela detecção de IgM e aglutininas não específicas de toxoplasmose, confundindo, também, com as IgM naturais, gerando os falso-negativos. É um teste prático e de baixo custo, não exigindo equipamento sofisticado e métodos de triagem mais específicos (Camargo et al., 1989). O teste é compatível com a imunofluorescência indireta. É útil para indicar prevalência, mas não para o diagnóstico de infecção neonatal ou quadro recente em gestante, pois pode confundir IgM e IgG. Detecta anticorpos mais tardiamente que a imunofluorescência e que os testes imunoenzimáticos.

### 1.10.4 Reação de Sabin e Feldman

O teste de reação de Sabina e Feldman utiliza taquizoítos vivos e o tipo de anticorpo/antígeno testado é o IgG, IgM e IgA (Sabin & Feldman, 1948). Foi a partir deste teste que se popularizou a criação de inquéritos epidemiológicos (Amato-Neto, 1995). Ainda é considerado um teste padrão-ouro por pesquisadores na obtenção de prevalências de parasitoses (Bahia-Oliveira et al., 2001). Possui alta sensibilidade e especificidade, mas é utilizado apenas em laboratórios de referência (Beazley & Egerman, 1998). É um método para detecção da fase aguda ou crônica. É específico e não cruza com outras doenças, porém não é usada rotineiramente devido a necessidade de manipular o parasita na sua forma infectante (Neves, 2016).

### 1.10.5 Ensaios imunoenzimáticos

Os ensaio imunoenzimáticos (ELISA) possui positividade de 80% , sendo muito importante na infecção congênita (Silveira, 1997; Thalhammer, 1962; Wilson et al., 1980). A detecção de IgM com toxoplasmose recentemente adquirida e que eram negativas, demonstrou que o ELISA é simples, rápido e acurado no diagnóstico de toxoplasmose aguda em adultos e na forma congênita. Esta maior sensibilidade ao IgM pode ser atribuída pelo fato de que há eliminação da inibição da demonstração de imunoglobulinas IgM em presença de IgG sérico (Naot et al., 1981; Sáfadi & Farhat, 1999). A desvantagem do método se dá pelo uso de proteínas que contém vários antígenos de *T. gondii*, fator este, que aumenta a reatividade cruzada, gerando falsos positivos (Conde de Felipe et al., 2007).

Os testes de ELISA possuem alta sensibilidade e especificidade, em contrapartida são caros e necessitam de laboratórios e mão de obra especializados (Liu et al., 2015).

### 1.10.6 Ensaios de quimiluminescência

O exame de quimiluminescência (CLIA) é um método imunológico que se baseia na emissão de energia luminosa a partir de uma reação química. Este teste possui características quantitativas na detecção de antígenos e anticorpos, atuando também na identificação de hormônios, marcadores tumorais e proteínas séricas. Possui elevada sensibilidade e especificidade, é automatizado e pode analisar várias moléculas simultaneamente. A técnica é baseada na ligação antígeno-anticorpo. O anticorpo específico é revestido de poliestireno. Um dos dois agentes é conjugado a uma substância que, quando ativada, emite luz. A emissão desta luz é proporcional ao reagente pesquisado. Este princípio se assemelha ao eletroquimiluminescente (ECLIA), diferenciando-se no uso de energia química ao invés de energia elétrica (Vaz, 2006).

### 1.10.7 Imunofluorescência indireta

O teste de Imunofluorescência indireta (RIFI) possui boa sensibilidade e especificidade. Seus bons resultados na detecção do antígeno específico vêm da amplificação do sinal fluorescente. Neste método o *T. gondii* é preservado e fixado em lâminas de microscopia. Este teste identifica as imunoglobulinas de acordo com as suas classes, facilitando a identificação das fases aguda e crônica, de modo semelhante ao método de imunofluorescência indireta e o teste de aglutinação. Devido a possibilidade de resultados falso-positivos é aconselhável a repetição da sorologia em 3 semanas e a sua confirmação com um outro método mais específico.

### 1.10.8 Teste de aglutinação em látex

O princípio do teste de aglutinação em látex (LAT) é decorrente da formação de agregados originados da interação antígeno-anticorpo. A aglutinação pode ser detectada sem o auxílio de aparelhos especiais. É eficaz na detecção de vírus, bactérias, protozoários e fungos.

Esta metodologia utiliza como antígeno as partículas de látex de tamanho uniforme, que são sensibilizadas com antígenos depurados de *T. gondii*. Este teste é simples e rápido, não necessitando de diluições prévias da amostra. A presença de fatores reumatóides é um fator limitante do teste (Chandramukhi, 2004).

### 1.10.9 Teste de avides de IgG no soro

Este teste se baseia na ligação antígeno-anticorpo através do teste de quimiluminescência. Em fase aguda, as imunoglobulinas (IgG) se ligam fracamente ao antígeno (baixa avides), enquanto que na

fase crônica, essas imunoglobulinas se ligam fortemente ao antígeno (alta avidéz). A alta avidéz demonstra uma infecção que ocorreu há mais de três meses (Iqbal & Khalid, 2007; J. S. Remington & Klein, 2011). A persistência dos anticorpos de baixa avidéz pode mascarar o exame, como, por exemplo, tratamento antiparasitário pode manter baixa a avidéz por mais de quatro meses (Pardini, 2002). Mulheres grávidas com IgG+/IgM+ são as pacientes mais indicadas para realizar este teste. A avidéz de IgG é um importante marcador imunológico para distinguir infecção recente e determinar a presença de IgM residual (Araújo and Ferreira 2008).

Mesmo uma baixa avidéz não pode ser interpretada como infecção recente, pois o IgG pode persistir por mais de cinco meses. Esta técnica associada ao PCR no líquido amniótico é útil para identificar gravidez de alto risco e toxoplasmose congênita (Yamada et al., 2011). A medição de avidéz também se mostrou eficaz na detecção de toxoplasmose ocular (Tanyuksel et al., 2004) e na distinção entre a fase crônica e aguda da doença (Candolfi et al., 2007). A descoberta da avidéz de anticorpos específicos como medida de afinidade com o antígeno, resultou em aplicação diagnóstica importante para uma série de doenças infecciosas, dentre elas, as virais e a toxoplasmose (Bobic et al., 2009), tornando-se uma importante ferramenta para diagnóstico.

#### 1.10.10 *Western blot*

A técnica de *western blot* (WB), é um método capaz de detectar proteínas em um homogenato ou extrato de tecido biológico. Neste teste são utilizados antígenos lisados de taquizoítos e antígenos recombinantes (Rilling et al., 2003). A separação das proteínas de interesse é efetuada através da eletroforese e transferidas, através de transferência eletroforética, para um suporte sólido com membranas de nitrocelulose, PVDF (*Polyvinylidene difluoride*) ou de catiônicas de nylon. Um anticorpo específico vai reagir com um epítipo da proteína para que seja visualizada a proteína de interesse. A membrana é incubada com outro anticorpo, no caso anti-IgG, que reconhece a imunoglobulina responsável pela ligação ao antígeno. Esta técnica permite a distinção entre a toxoplasmose aguda e crônica (Cañete, 2010; Deshpande et al., 2013).

A detecção de toxoplasmose congênita com esta técnica mostrou ser uma ferramenta eficaz com boa sensibilidade para IgG e IgM (Machado et al., 2010; Magi & Migliorini, 2011).

#### 1.10.11 Método de Eletroquimioluminescência

A eletroquimioluminescência é produzida a partir de reações eletroquímicas em soluções. Na solução em estudo, os anticorpos são marcados e ligados ao antígeno (complexo sanduiche). Esse

conjugado é aspirado para uma célula de leitura onde e fixados magneticamente a um eletrodo. São fornecidas partículas de TPA (triptofano) que a partir de estímulos elétricos fornecerá cargas elétricas, emitindo um sinal luminoso detectado por um fotomultiplicador. O sinal luminescente gerado é equivalente a concentração dos antígenos presentes na amostra.

Apesar das suas vantagens por ser um método muito específico e fácil, possui alto custo, aparelho com pouca mobilidade, reagentes específicos, disponibilidade de espaço e reatividade cruzada com algumas fármacos esteroides cruzadas (Zita et al., 2014).

#### **1.10.12 Avaliação econômica das técnicas**

Estudos econômicos em saúde fornecem informações aos tomadores de decisão para o uso eficiente dos recursos disponíveis para maximizar os benefícios à saúde. A avaliação econômica é uma parte da economia da saúde, e é uma ferramenta para comparar custos e consequências de diferentes intervenções. A avaliação de tecnologias em saúde é uma técnica de avaliação econômica bem adaptada por países desenvolvidos. As avaliações econômicas de tecnologias em saúde surgiram na década de 60 para sistematizar e comparar as alternativas tecnológicas em relação aos seus benefícios em saúde e aos custos que uma tomada de decisão pode trazer aos pacientes (da Silva et al., 2014).

O estudo do aprimoramento de tecnologias em saúde tornou-se um grande aliado ao bem-estar da sociedade, fazendo das pesquisas na área biomédica uma contínua produção de alternativas que auxiliam a comunidade médica no diagnóstico e prevenção de patologias. Um fator que está intimamente ligado ao desenvolvimento dessas tecnologias é o custo, já que as restrições orçamentárias podem limitar o acesso de muitos pacientes a métodos mais eficientes. O modelo adotado, seja público ou privado, depara-se com um crescente custo e, conseqüentemente, aumento do volume de recursos, seja absoluto ou relativo. O aumento da participação dos gastos em saúde, aloca recursos de outras áreas, trazendo questionamentos aos gestores para equilibrar as contas para atender as demandas da sociedade como um todo (Ministério da Saúde, 2009b).

Em outras áreas, os mecanismos de detecção de patologias tendem a ocupar o espaço de tecnologias já existentes, o que pode não acontecer na saúde, pois os novos procedimentos e novas técnicas são incorporadas pelos profissionais, não ocorrendo, em algumas situações, a substituição dos métodos, e sim uma acumulação. A decisão para guiar a escolha das intervenções que provavelmente poderão oferecer maiores benefícios para a população é, muitas vezes, inadequado e sujeito a pressões diversas, incluindo-se nelas as indústrias de insumos de saúde (Ministério da Saúde, 2009b). Essas avaliações são holísticas, compreendendo disciplinas como epidemiologia, pesquisa clínica e economia.

Nem sempre as avaliações das tecnologias empregadas na saúde possuem viés econômico, pois as técnicas comprovadamente mais eficientes do que a técnica padrão podem apresentar custos globais mais elevados. As técnicas com efetividade similar e com custos mais elevados são dispensáveis. Além dos custos adicionais, as novas tecnologias trazem efeitos adicionais, tornando-as mais caras e mais efetivas em relação à tecnologia padrão usada, exigindo então que estas diferenças sejam analisadas por meio de outros métodos de avaliação econômica, como os estudos de custo-efetividade, muito utilizados na área da saúde e que têm sido discutidos e aperfeiçoados desde a década de 1970 (Weinstein & Stason, 1977). A valorização da avaliação econômica na gestão pública, porém, é, no mundo todo, um fenômeno mais recente na saúde.

Fala-se em ética ou moral a imposição de valores sobre a vida do paciente, já que a mesma não possui preço. A geração dessa imposição, em várias ocasiões, ignora os benefícios que a saúde traz por considerar apenas os custos. Os custos jamais devem ser alocados à frente do bem-estar do indivíduo.

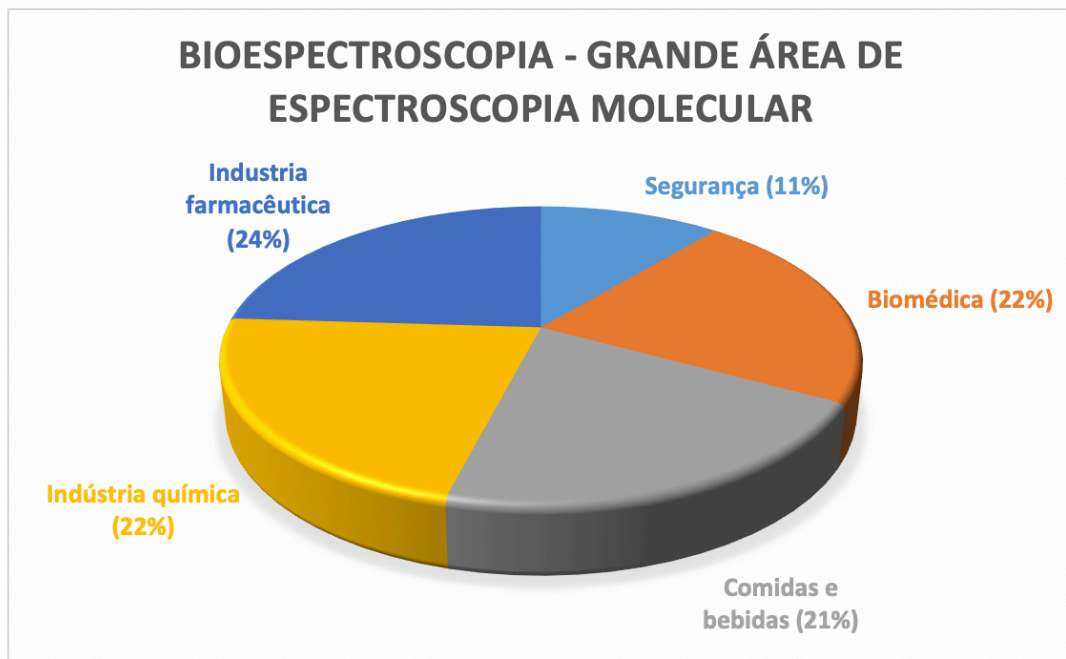
Países como a Austrália já possuem estudos econômicos para a área de tecnologia em saúde, exigindo que as decisões de incorporação de novas tecnologias sejam baseadas na relação custo-efetividade (Taylor, 2004). Em países da Europa e América do Norte adotam modelos similares ao modelo australiano. Tomando o Canadá como exemplo, existe a orientação, por meio de suas agências, da necessidade de inclusão de estudos econômicos quando da submissão de processos para incorporação de novas tecnologias. Na Europa a política de uso de estudos econômicos para tomada de decisão de inclusão de novas tecnologias é marcante na Inglaterra. Em outros países, Bélgica, Finlândia, Noruega, Portugal, Suécia e Hungria, essa avaliação econômica é solicitada pelas agências de saúde (Taylor, 2004).

No Brasil o processo de avaliação econômica das novas metodologias é recente e raramente aplicado. A criação, pela Secretaria de Ciência e Tecnologia e Insumos Estratégicos (SCTIE), de uma área específica para avaliação de tecnologias em saúde aconteceu somente em 2003, através de portaria nº 1.418, de 24/07/2003, instituindo o Conselho de Ciência, Tecnologia e Inovação do Ministério da Saúde para subsidiar a tomada de decisões do Sistema Único de Saúde (SUS) em relação a incorporação, alocação e utilização de tecnologias, além da criação da comissão de Incorporação de Tecnologias pelo Ministério da Saúde. Os custos crescentes na área da saúde, desperdício de recursos, garantia de direitos constitucionais e a intervenção do Poder Judiciário faz com que o poder público busque meios mais formais de aprimoramento do processo de decisão quanto à incorporação e ao uso das tecnologias em saúde (Ministério da Saúde, 2009a).

Em Portugal existe o Sistema Nacional de Avaliação de Tecnologias de Saúde (SiNATS), que integra todas as entidades públicas e privadas na área da saúde com o objetivo de obter ganhos em saúde, harmonizado com outros sistemas europeus que procuram atingir o mesmo objetivo. O SiNATS pode materializar -se em recomendações gerais para a sua utilização no sistema de saúde, como em condições de utilização e aquisição para as instituições e serviços do Serviço Nacional de Saúde (SNS), baseando-se no conhecimento técnico do INFARMED (Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde) e no acervo de informações estruturadas para determinar as condições de utilização (Ministério da Saúde, 2015). O decreto Lei n° 97/2015 explicita que a qualidade, economia, eficiência e eficácia de tecnologias sejam variáveis importantes na tomada de decisões de introdução de novas tecnologias no mercado e que os recursos públicos, destinados à prestação de cuidados de saúde, sejam utilizados para implementar métodos tecnológicos que tragam benefícios aos cidadãos portugueses. Posteriormente à criação do Decreto-Lei n° 97/2015, estabeleceu-se um regime específico de comparticipação (diferença que existe entre o preço de um serviço e o valor do mesmo coberto por um plano de saúde) de dispositivos médicos, causando mudança no modo de utilização e aquisição das tecnologias de saúde. O Decreto-Lei n° 195/2006 estabelece que os medicamentos novos devem ser avaliados e que demonstrem um valor terapêutico acrescentado e a respectiva vantagem econômica. Gastos em saúde pelo governo português somam 8,9% do PIB do país (2017), tendo chegado a 9,9% em 2009 (PORDATA, 2017), gastos esses que incluem a aquisição de bens e encargos com instalações. Em comparação os Estados Unidos gastam 15,3% do seu PIB em saúde (Pereira, 2009) e o Brasil com 9,1% (IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística., 2017).

### **1.11 Métodos espectrofotométricos de diagnóstico**

As aplicações da espectroscopia na área biomédica são baseadas na Espectroscopia de absorção UV, espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) e espectroscopia Raman. A Figura 11 ilustra as áreas em que a espectroscopia atua e o percentual de atividade de cada uma. Na área biomédica a espectroscopia já é utilizada na análise de macromoléculas biológicas (ácidos nucleicos, proteínas e lipídios), patologias sanguíneas (anemias, leucemias e talassemias), diagnóstico de câncer (cérebro, mama, cervical, cólon, etc), processos químicos em células sanguíneas (malária, reações a medicamentos), ADN em cromossomos e pigmentos em granulócitos (hemácias e hepatócitos), imunoenaios, ensaios citológicos (organelas, células, microrganismos) e análise de tecidos diversos (Truong et al., 2016).



**Figura 11** - Ramos que a bioespectroscopia atua

Dentre os métodos sorológicos mais utilizados, o teste de ELISA apresenta boa sensibilidade na detecção de IgG e IgM. Outros métodos, como: o ECLIA e o RIFI também apresentam boa especificidade. A desvantagem destes métodos está na preparação das amostras (lavagem, diluição e incubação). A existência de múltiplos antígenos de *T. gondii* é um obstáculo, aumentando a reatividade cruzada inespecífica, gerando os falsos positivos. Assim, outras técnicas de diagnóstico, tais como espectroscopia de FTIR e de Raman poderão permitir uma elevada sensibilidade para a detecção molecular de um modo rápido e mais barato. Uma vez que são testes não destrutivos, não há necessidade para uma preparação de amostras e, portanto, podem ser automatizados. Estudos com sangue de gatos, utilizando técnicas espectrofotométricas, já conseguem identificar a presença de IgG e IgM nestes felinos (Duarte et al., 2013).

A tabela 5 mostra um comparativo entre as técnicas Espectrofotométricas de FTIR e Raman. A espectroscopia vibracional tem o potencial de fornecer informações sobre materiais biológicos e realizar análises de desordem celular. No entanto pode algumas dificuldades podem resultar pelo fato das amostras possuírem grandes quantidades de moléculas, podendo influenciar no diagnóstico de patologias. Pode-se coletar dados e submetê-los a uma análise multivariada (estatística), permitindo ao pesquisador a identificação de tendências espectrais difíceis de serem percebidas visualmente.

A espectroscopia é uma técnica já utilizada na detecção de outros componentes biológicos, pois suas propriedades de analisar a constituição bioquímica de fluidos e tecidos auxilia na diferenciação de



compostos. A espectroscopia de FTIR e o Raman podem fornecer informações estruturais e quantificação de moléculas bioquímicas e fosforiladas em amostras biológicas. Assim, estas técnicas podem ser utilizadas para diagnóstico precoce de doenças, de forma não invasiva e com resposta satisfatória, já que as mudanças moleculares em células, tecidos ou biofluidos, que são a causa ou o efeito de doenças, podem ser detectadas e quantificadas por estas técnicas, obtendo a chamada biópsia óptica, onde analisa amostras biológica, sendo minimamente invasivas (Bitar, 2009).

**Tabela 5** - Comparativo entre a espectroscopia FTIR e Raman

	FTIR	Raman
Faixa espectral	13300 - 3300	4000 - 50
Análise de:		
Gases	Não	Sim
Líquidos	Sim	Sim
Sólidos	Sim	Sim
Sistemas aquosos	Difícil	Sim
Amostra macroscópica	Sim	Sim
Amostra microscópica	Não	Sim
Sinal	Forte	Fraco
Amostragem	Fácil	Fácil
Quantitativa	Sim	Sim
Não-invasivo	Sim	Sim
Interface de fibra ótica	Sim	Sim
Conteúdo informativo	Baixo. Limitado a O-H, N-H e C-H	Alta
Monitoramento de reação e modelagem	Requer quimiometria	Sim

A espectroscopia de FTIR e o Raman são métodos capazes de identificar desorganização celular para identificação de câncer em diferentes tecidos (Gajjar et al., 2013a; Harris et al., 2009; Martin et al., 2010). As doenças levam a mudanças na composição molecular dos tecidos afetados, essas mudanças podem ser refletidas nos espectros. Se essas alterações forem específicas o suficiente para modificar o espectro, pode-se identificar a patologia a partir desses marcadores espectrais (Choo-Smith et al., 2002). A espectroscopia vibracional inclui diferentes técnicas, como o infravermelho e a espectroscopia Raman. Podem ser usados para estudar uma ampla gama de tipos de amostras para análises qualitativas e análises quantitativas (Flannery, 2014). O desenvolvimento das técnicas espectroscópicas (FTIR e Raman) aliadas às técnicas de computação trouxeram significativas contribuições acerca da estrutura das moléculas presentes em amostras líquidas ou sólidas. As patologias existentes levam a mudanças estruturais e químicas que alteram os espectros vibracionais das moléculas e que podem ser usadas

como referência na identificação de doenças. A automatização dessas técnicas é um grande atrativo para laboratórios de diferentes ramos da ciência (Krafft et al., 2009). Com relação aos modos vibracionais, a matéria, ao receber um espectro de luz, possui um caráter vibracional, ou seja, esses espectros estimulam as ligações químicas desta matéria. Estas ligações podem esticar, contrair e dobrar (Smith, 1998). Basicamente ocorrem dois modos fundamentais de vibração molecular: 1) Estiramento ou deformação axial, onde a distância entre dois átomos aumenta ou diminui, mas os átomos permanecem no mesmo eixo de ligação; e 2) Deformação angular, onde a posição do átomo muda em relação ao eixo original da ligação. As inovações trazidas pela espectroscopia de FTIR e Raman, como a identificação das propriedades físico-químicas das moléculas orgânicas e inorgânicas de amostras de estudos, trouxeram um melhor entendimento e compreensão das funções desses aparelhos. Os espectros produzidos possuem melhor resolução e, conseqüentemente, a identificação precisa de substâncias através do modo vibracional das moléculas presentes na substância em estudo (Ramos, 2006).

A tabela 6 mostra os números de ondas associados ao comportamento realizado pelas substâncias. As diferenças das técnicas de espectroscopia para estudos de doença resultam de análises de espectroscopistas e pesquisadores médicos. A espectroscopia vibracional tem o potencial de fornecer informações sobre materiais biológicos e realizar análises de desordem celular. Os estudos que utilizam essas matérias biológicas relatam dificuldades pelo fato de as amostras possuírem grandes quantidades de moléculas, podendo influenciar no diagnóstico de patologias. Pode-se coletar dados e submetê-los a uma análise multivariada (estatística), permitindo ao pesquisador a identificação de tendências espectrais difíceis de serem percebidas visualmente.

O espectrofotômetro infravermelho fornece a o mesmo tipo de informação do espalhamento Raman (energias de vibração das moléculas). A diferença entre as técnicas está em seu mecanismo físico: a espectroscopia de FTIR trabalha com absorção de radiação e o Raman com a dispersão da luz.

**Tabela 6** - Valores de números de onda com as vibrações correspondentes para cada um dos métodos espectrofotométricos FTIR e Raman baseados nas frequências vibracionais e no comportamento das moléculas presentes nas substâncias

Comprimento de onda (cm <sup>-1</sup> )	FTIR	Raman
650		Alongamento de vibrações de fosfolipídios
758		Alongamento de vibrações de fosfolipídios
800		Alongamento de vibrações de fosfolipídios
904		Ligação de deformação C - H e ligações C - C do esqueleto proteico
1057	Vibrações simétricas do grupo fosfolipídico PO <sup>2-</sup>	
1249	Vibrações assimétricas do grupo fosfolipídico PO <sup>2-</sup>	
1314	Amida III	
1395	Vibrações simétricas do grupo COO <sup>-</sup>	
1456	Vibração do grupo C=C	
1544	Vibrações de flexão de NH e alongamento de vibrações do CN-amida II	Vibrações de flexão de NH e alongamento de vibrações do CN-amide II
1648	Alongamento da vibração da amida I	Alongamento da vibração da amida I
1740		Alongamento da vibração de grupos C - O das proteínas
1780		Alongamento da vibração de grupos C = O das proteínas
1816		Vibração do grupo C = O

### 1.11.1 Espectroscopia Raman

As análises de materiais feitas por espectroscopia de vibração são utilizadas para medir quantitativamente concentrações de substâncias dentro de amostras líquidas (sangue, saliva e urina), sólidas (tecidos, órgãos e cultura de células), mudanças estruturais de proteínas (Benevides et al., 1986; Lyng et al., 2007; Wen, 2007) e mapeamento de estruturas de imunoglobulinas (Painter & Koenig, 1975), permitindo diagnósticos minimamente invasivos (Butler et al., 2016; H. Wang et al., 2010). Esses fluidos corporais podem conter biomoléculas de interesse diagnóstico (Hanlon et al., 2000), permitindo ao investigador a detecção de modificações nas substâncias. As amostras biológicas são expostas a uma fonte de excitação (laser), onde o fóton torna-se excitado. O retorno deste fóton ao seu nível de energia original emite uma frequência diferente que é medida pelo aparelho. A informação química da amostra é a sua identidade, ou seja, as transformações ocorridas, tanto a nível celular, quanto extracelular, pelo aparecimento de uma doença, podem ser detectadas pelo Raman (Hanlon et al., 2000). O laser do Raman pode discriminar diferentes tipos de células e tecidos para serem utilizados no diagnóstico (Motz

et al., 2005; Pence & Mahadevan-jansen, 2016), sendo uma ferramenta eficaz para eliminar ou reduzir a necessidade de biópsias (Ember et al., 2017). A preferência dos pesquisadores por essa técnica se deve ao fato da mesma não utilizar marcadores ou cromóforos que possam influenciar nos espectros (Notingher, 2007).

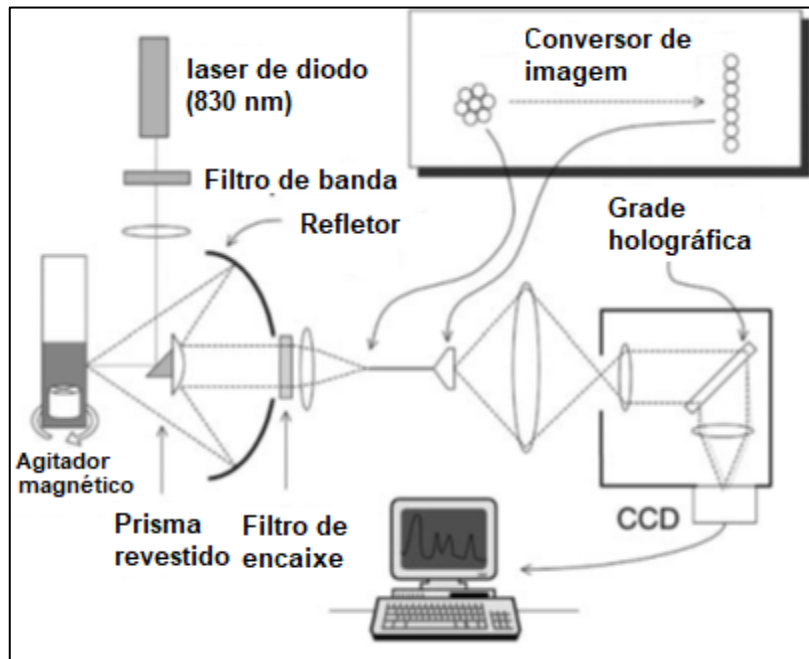
O Raman pode ser utilizado para análise de componentes do sangue. Neste caso, os espectros produzidos possuem picos específicos e podem diferenciar os analitos presentes, tanto no sangue, quanto no plasma (Tatarkovič et al., 2015).

As técnicas Raman conhecidas foram desenvolvidas através de características específicas. A tabela 7 demonstra as ferramentas das técnicas Raman e suas aplicações em problemas biológicos.

**Tabela 7 -** Resumo das técnicas de espectroscopia Raman (extraído de Ember et al., 2017)

Técnica Raman	Descrição breve	Vantagens	Aplicações em biomedicina	Fonte
Espectroscopia Raman espontânea	Detecta a dispersão intrínseca Raman de moléculas. Pode ser combinado com sondas de fibra ou microscopia para fornecer informações espaciais e bioquímicas	Etiqueta livre, não invasiva e não destrutiva, não é necessária preparação de amostras	Diagnóstico, cirurgia guiada, patologia molecular, pesquisa de células estaminais, engenharia de tecidos	(Chan et al., 2009; Crow et al., 2003; Haka et al., 2006; Jermyn et al., 2015; Lyng et al., 2007; Tan et al., 2012; Verrier, Zoladek, & Nottingher, 2011)
Espectroscopia Raman de ressonância	Faixas particulares melhoradas ao combinar o comprimento de onda de excitação com ressonância eletrônica de moléculas, podem ser acopladas ao SERS	$10^3 - 10^5$ vezes maior em sinal-ruído, os cromóforos podem ser investigados	Caracterizando biomoléculas específicas, por exemplo, carotenoides, citocromo	(Hu et al, 1993; Mayne et al., 2013; Spiro, 1974)
Espectroscopia Raman amplificada por superfície	O sinal Raman é aumentado usando superfície de metal rugosa, por exemplo, nanopartículas, deslizando revestido de metal	10 aumento de $5$ vezes em nanopartículas funcionais a ruidosas e funcionalizadas	Medições de pH e redox, ensaios baseados em células, imunossaios	(Driskell et al., 2007; Jamieson et al., 2015; Jiang et al., 2014; Sathuluri et al., 2011; Shi et al., 2015)
Espectroscopia Raman com deslocamento espacial	Sinal de Raman medido no local de deslocamento do ponto de excitação, para coleta de fótons difusamente dispersos	Permite uma maior penetração na amostra, mais informações de profundidade em tecidos mais espessos	Deteção potencial de calcificações e margens do câncer no tecido mamário	(Keller et al., 2011; Xie et al., 2012)
espalhamento Raman estimulado / espectroscopia Raman anti-carregamento de coerente	Variantes não-lineares que requerem fonte laser pulsada e sincronizada.	Taxa de vídeo, imagem biomolecular livre de róticos, aumento de $5 \times$ em sinal de ruído	Imaginando moléculas específicas de interesse, por exemplo, hidroxiapatita, lipídios, drogas	(Downes, 2011; Evans et al., 2005; Uckermann et al., 2014)

A Figura 12 representa como é realizada a análise dos componentes das amostras. As regiões espectrais mais significativas do Raman para a análise de materiais biológicos estão inseridas nas bandas compreendidas entre 400 e 2.000  $\text{cm}^{-1}$ , associados a vibrações de ligação de proteínas (1.500-1.700  $\text{cm}^{-1}$ ), carboidratos (470-1.200  $\text{cm}^{-1}$ ), grupos fosfato de ADN (980, 1.080 e 1.240  $\text{cm}^{-1}$ ) e biomoléculas celulares adicionais. Os números de onda mais altos (2.700–3.500  $\text{cm}^{-1}$ ) estão associados ao alongamento CH, NH e OH em lipídeos e proteínas (Movasaghi et al., 2007).



**Figura 12** - Diagrama esquemático do sistema espectroscópico Raman para análise de componentes do sangue

Fonte: Hanlon et al. (2000)

A técnica Raman, ao analisar diferentes componentes presentes em amostras, pode ser utilizada na detecção de patologias importantes, como descrito na tabela 8.

Tabela 8 - Fatores de interesse detectados pela espectroscopia Raman

FATOR DE INTERESSE	FONTE
Ácido láctico intramuscular	(Souza et al., 2003)
Investigação de pré-eclampsia	(Başar et al., 2012)
Verificação da eficácia de tratamento da leucemia	(Denbigh et al., 2017)
Detecção de síndrome de ovários policísticos	(Momenpour et al., 2018)
Presença de imunoglobulinas anti - <i>T. Gondii</i> em soro sanguíneo de gatos	(Duarte et al., 2013)
Câncer de próstata	(Mackanos & Contag, 2009; Mistro et al., 2015; Theophilou et al., 2015)
Detecção de malignidade oral	(Sahu et al., 2015; Venkatakrishna et al., 2001)
Diagnóstico pré-operatório de neoplasia da glândula parótida	(Yan et al., 2015)
Detecção do vírus da SIDA em saliva	(Wang et al., 2009)
Detecção de carcinoma basocelulares	(Bodanese, 2008)
Identificação de hepatite C em soro de sangue	(Saade et al., 2008)
Detecção de artrite reumatoide	(Carvalho et al., 2004)
Detecção de depressão a partir do balanço fosfolipídico-proteínas em indivíduos com depressão	(Depciuch et al., 2016)
Diagnóstico de melanoma cutâneo	(Bitar, 2009)
Detecção de linfócitos humanos a partir de infecções virais	(Kozicki et al., 2013)
Monitoramento em tempo real de gases respiratórios e anestésicos durante cirurgias	(Westenskow et al., 2018)
Análise do vírus da dengue em soro de sangue	(Khan et al., 2016; Saleem et al., 2013)
Triagem de IgM baseada em espectroscopia Raman para identificação de soros positivos e negativos para infecção do vírus da dengue	(Bilal et al., 2016)
Identificação de traços de sêmen e sangue	(Sikirzhytski, Sikirzhytskaya, & Lednev, 2012)
Diagnóstico de asma	(Sahu et al., 2018)
Análise de fluidos corporais para utilização em ciência forense	(Sikirzhytski et al., 2010; Virkler & Lednev, 2009)
Detecção de câncer de nasofaringe em soro de sangue	(Feng et al., 2010)
Identificação de patógenos	(Maquelin et al., 2000)
Rastreamento de substâncias toxicológicas presente em células	(Notingher, 2007)
Identificação de bactérias patogênicas	(Dina et al., 2017)
Detecção e identificação de agentes patogênicos microbianos	(Kotanan et al., 2016)

FATOR DE INTERESSE	FONTE
Diagnóstico de displasia de esôfago	(Mads Sylvest Bergholt et al., 2014)
Medição das concentrações de substâncias químicas no soro sanguíneo, como: glicose, ureia, proteínas, colesterol e triglicédeos	(Rohleder et al., 2004)
Análise de soro sanguíneo para diagnosticar a asma e monitorar a resposta ao tratamento	(Sahu et al., 2013)
Medição e quantificação da concentração de proteína C-reativa (PCR) no plasma sanguíneo como biomarcador de resposta inflamatória	(Bergholt & Hassing, 2009)
Diagnóstico sorológico de malária - <i>Plasmodium falciparum</i> - em eritrócitos	(Bilal et al., 2015; Bonifacio et al., 2008; Chen et al., 2016)
Detecção de lesões pré neoplásicas	(Short et al, 2011)
Verificação de danos isquêmicos em soro sanguíneo	(Baranov, Vlasova, & Saletsky, 2004)
Detecção de açúcar na urina de diabéticos	(Zou et al., 2016)
Detecção de diabetes tipo II em soro sanguíneo medição	(Birech et al., 2017)
Da concentração de fibrinogênio no plasma sanguíneo para detectar fatores coagulantes e anticoagulantes	(Poon et al., 2012)
Diagnóstico da doença de Alzheimer e outros tipos de demência	(Ryzhikova et al., 2015)
Monitoramento da oxigenação sanguínea	(Brazhe et al., 2018)
Detecção de câncer de mama	(Haka et al., 2005; Marro et al., 2014)
Detecção de marcadores séricos para identificação de câncer colorretal	(Feng et al., 2015; J. Wang et al., 2014)
Diagnóstico de câncer de laringe	(Lin et al., 2012)
Medição de fosfolípidios e identificação e avaliação de lesões ateroscleróticas humanas	(Silveira et al., 2018)
Detecção de rejeição aguda após o transplante renal	(Tu & Chang, 2012)

A tabela 9 mostra os modos vibracionais, associados a amostras sanguíneas e que substâncias podem ser identificadas pelo Raman. O diagnóstico de câncer tem impulsionado as pesquisas com o Raman, pois uma das hipóteses é que esta técnica pode detectar alterações moleculares em células, tecidos e biofluidos, principal causa/efeito deste grupo de doenças (Kong et al, 2015). A espectroscopia Raman não é influenciada pela presença da água, já que esta substância pode funcionar como um dispersor, permitindo que as amostras analisadas com o Raman sejam biofluidas (Ellis & Goodacre,



2006). Em geral proporciona mais detalhes espectrais e seus picos apresentam menor desordem de picos.

**Tabela 9** - Principais modos vibracionais e assinaturas de moléculas do sangue humano por Espectroscopia Raman

Faixa (cm <sup>-1</sup> )	Sangue humano	Assinatura molecular	Referências
510-1200	Soro	Lipídeos (HDL e LDL)	(Espinosa-Mansilla et al., 2005)
510-1320	Sangue e soro	Glicose	(Espinosa-Mansilla et al., 2005; Levy et al., 2005)
510-1800	Sangue e soro	Triglicérides	(Espinosa-Mansilla et al., 2005; Levy et al., 1995)
550-1800	Soro	Creatinina	(Espinosa-Mansilla et al., 2005)
565-1746	Soro	Colesterol	(Levy et al., 1995)
720-1602	Sangue e soro	Albumina	(Espinosa-Mansilla et al., 2005; Levy et al., 1995)
744/760/1342/48	Sangue e soro	Triptofano	(Krone & Nägele, 1988; Papadakis et al., 1999)
829-851	Soro	Tirosina	(Hadda et al., 2007; Papadakis et al., 1999)
1000/1003	Sangue e soro	Fenilalanina	(Krone & Nägele, 1988; Papadakis et al., 1999)
1000-1800	Soro	Globulina	(Espinosa-Mansilla et al., 2005)
940-1320	Plasma	Amida III- $\alpha$ hélix	(Papadakis et al., 1999)
960	Plasma	Amida III- random coil	(Papadakis et al., 1999)
990/1240	Plasma	Amida III- $\beta$ sheet	(Papadakis et al., 1999)
1230-1309	Plasma e soro	Amida III	(Steiner & Urowitz, 2009)
1542/1620	Sangue e soro	Hemoglobina	(Krone & Nägele, 1988)
1645-1680	Plasma	Amida I	(Steiner & Urowitz, 2009)
1654	Soro	Amida I	(Seven et al., 2008)

### 1.11.2 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de FTIR foi aplicada em pesquisas biomédicas por muitos anos e a literatura vem se expandindo a cada ano, sendo aplicado à detecção de marcadores de doenças em fluidos corporais, como urina e sangue.

A técnica de espectroscopia no infravermelho atua na absorção de luz que se encontra na região do infravermelho do espectro eletromagnético. Como já foi referido, as técnicas espectroscópicas podem identificar diferentes compostos bioquímicos presentes em uma amostra sanguínea (Benezzeddine-Boussaidi et al., 2009), além de biofluidos (Oliver, 2015). Esses compostos bioquímicos possuem ligações que vibram de forma específica (níveis de energia), já que essas moléculas possuem energia potencial, geometria molecular e massas, também, específicas. A medida fundamental obtida na espectroscopia por infravermelho é o espectro infravermelho, caracterizado por um gráfico que ilustra a medida da intensidade da luz infravermelha versus o comprimento de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ). O mais prevalente tipo de espectrômetro é chamado de Espectrometria no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). A espectroscopia de FTIR é primariamente utilizado para detecção de grupos funcionais químicos na amostra. Os picos produzidos no espectro infravermelho são proporcionais a concentração dos analitos presentes na amostra, ou seja, esta técnica também pode ser eficiente para medir concentrações (Smith, 1998). Grande parte das pesquisas utiliza a região de 4000 a 900  $\text{cm}^{-1}$  para análise no FTIR, pelo fato desta região apresentar bandas com informações referentes aos compostos orgânicos. A espectroscopia no infravermelho permite analisar simultaneamente aminoácidos, ácidos graxos, proteínas e polissacarídeos, bem como possui diferenciais significativos, por fornecer uma análise rápida, prática e reprodutível, sem haver necessidade do uso de reagentes químicos e de grande quantidade de amostra (Kaderbhai et al., 2003).

A espectroscopia de FTIR é uma técnica que utiliza um interferômetro ao invés de um monocromador, permitindo que a leitura de um espectro seja mais rápida, já que as frequências são colhidas simultaneamente (múltiplas leituras de uma amostra, tirando a média e aumentando a sensibilidade delas). Os espectrofotômetros FTIR mais modernos já são equipados com esse sistema de monocromador.

A espectroscopia de infravermelho é utilizada para diagnóstico de várias patologias, como descrito na tabela 10.

Tabela 10 - Fatores de interesse que são detectados pela espectroscopia FTIR

FATOR DE INTERESSE	FONTE
Identificar tipos sanguíneos de espécies diferentes	(Mistek & Lednev, 2015; Zhang et al., 2016)
Monitoramento da oxigenação tecidual	(A. Lima & Bakker, 2011)
Identificação de biomoléculas para diagnóstico de esôfago de Barret	(Wang et al., 2007)
Identificação de grupos sanguíneos	(Ushasree & Ahmad, 2017)
Análise de multicomponentes de lipídios no sangue	(Bazar, Eles, Kovacs, Romvari, & Szabo, 2016)
Detecção e tipagem de arbovírus (dengue, Zika e Chikungunya)	(Santos, 2018)
Análise óssea para diagnóstico da osteoporose	(Boskey & Mendelsohn, 2005)
Detecção de aneurisma	(Bonnier et al., 2006)
Monitoramento de glicose no sangue	(Shen et al., 2003; Yadav et al., 2015)
Medição dos efeitos das alterações intra e extracraniana da pressão arterial transitória	(Minati, Kress, Visani, Medford, & Critchley, 2011)
Avaliação da qualidade dos oócitos e na detecção de biomarcadores em líquido sinovial	(Ellis & Goodacre, 2006)
Avaliação da qualidade dos oócitos e na detecção de biomarcadores em sangue	(Lechowicz et al., 2016)
Diagnóstico de artrite, detecção de LDL – lipoproteínas de baixa densidade – para pacientes com dislipidemia	(Sato et al., 2010)
Medição de TSH (hormônio trófico estimulante) em soro de sangue	(Mello et al., 2011)
Medição de oxigênio em tecidos do fígado	(Schulz et al., 2002)
Identificação de albumina glicada	(Chesne et al., 2006)
Detecção de colite ulcerosa e doença de Crohn	(Titus et al., 2017)
Detecção de insuficiência renal	(Khanmohammadi et al, 2015)
<b>Diagnóstico de câncer</b>	
Câncer cervical e melanoma	(Mordechai et al., 2004)
Câncer pulmonar	(Hang et al., 2018; Lewis et al., 2010; Wang et al., 2014)
Próstata	(Baker et al., 2008; Siqueira & Lima, 2016)
Ovário	(Gajjar et al., 2013)
Melanoma	(Srisayam et al, 2014)
Sarcoma de Ewing	(Chaber et al., 2017)
Leucemia	(Mostaço-Guidolin & Bachmann, 2011; Rahim et al., 2016)
Cólon	(Rigas et al., 1990)

FATOR DE INTERESSE	FONTE
Esofágico	(Wang et al., 2003)
Gástrico	(Colagar et al., 2011; Liu et al, 2017)
Bexiga urinária	(Li et al., 2015; Ollesch et al., 2014)
Cérebro	(Gajjar et al., 2013; Hands et al., 2016)
Linfoma	(Ghimire et al., 2017)
Alterações na pele devido ao carcinoma	(C. A. Lima, Goulart, Côrrea, Pereira, & Zezell, 2015)

A tabela 11 identifica os modos de vibração de moléculas encontradas em sangue humano, obtidas a partir da análise espectral por espectroscopia FTIR. Os trabalhos listados identificam as composições bioquímicas de diferentes constituintes, tanto do plasma, como do sangue.

**Tabela 11** - Modos vibracionais e atribuições de compostos presentes no sangue por espectroscopia FTIR

POSIÇÃO PICO (cm-1)	AMOSTRA	ATRIBUIÇÃO	MODOS VIBRACIONAIS	REFERÊNCIAS
565-1746	Sangue	Colesterol, triglicérides e proteína		(Berger et al., 1999)
720-1602	Sangue	Glicose e albumina		(Berger et al., 1999)
900-1300	Plasma	Glicose, sacarídeos, lactato e glicerol	v (C-O)	(Délérís & Petibois 2003)
900-1300	Plasma	Glicose e lactato	v (C-O)	(Petibois, Cazorla, Cassaigne, & Délérís, 2001)
925-1250	Soro	Fosfolípidos de proteínas	vas (C-O-C)	(Sankari et al., 2010)
1137-1150	Plasma	Imunoglobulina A		(Benezzeddine-Boussaidi et al., 2009)
1464-1560	Plasma	Imunoglobulina G		(Benezzeddine-Boussaidi et al., 2009)
1289-1420	Plasma	Imunoglobulina M		(Benezzeddine-Boussaidi et al., 2009)
950-1100	Soro	Colesterol		(Budínová et al., 1997)
950-1185	Soro	Glicose		(Budínová et al, 1997)
1430-1480	Plasma	Ácidos graxos, fosfolípidos e triglicérides	$\delta$ as (CH <sub>3</sub> ), $\delta$ as (CH <sub>2</sub> ), $\delta$ s (CH <sub>3</sub> ),	(Délérís & Petibois, 2003)

POSIÇÃO PICO (cm-1)	AMOSTRA	ATRIBUIÇÃO	MODOS VIBRACIONAIS	REFERÊNCIAS
			$\delta_s$ (CH <sub>2</sub> )	
1360-1430	Plasma	Aminoácidos	$\nu$ (C-OO-)	(Déléris & Petibois, 2003)
2950-2990	Plasma	<i>Ésteres de colesterol e triglicérides</i>	$\nu_{as}$ (CH <sub>3</sub> )	(Déléris & Petibois, 2003)
1732-1739	Plasma	Lipídeos, ésteres de colesterol e triglicérides	$\nu$ (C=O)	(Déléris & Petibois, 2003)
1592	Soro	Amida I e II	$\delta$ (NH <sub>2</sub> )	(Erukhimovitch et al., 2006)
1056	Soro	Carboidratos		(Erukhimovitch et al., 2006)
3303	Soro	Amida A	$\nu$ (N-H)	(Gunasekaran & Uthra, 2008)
3068	Soro	Amida B		(Gunasekaran & Uthra, 2008)
1403, 1455	Soro	Grupo metil		(Gunasekaran & Uthra, 2008)
1151-1599	Plasma	Ácido úrico		(Heise et al., 1994)
1351-1700	Plasma	Proteínas totais		(Heise et al., 1994)
1130-1801	Plasma	Ureia		(Heise et al., 1994)
1739	Soro	Fosfolipídeos (HDL)	$\nu$ (C=O)	Liu et al., 2002
1220-1330	Soro	Amida III		(Petibois et al., 2001)
1107-1163	Soro	Lactato	$\nu$ (C-O)	(Petibois et al., 2001)
1405-1411	Plasma	IgG, IgA e IgM		(Petibois et al., 2001)
1480-1600	Plasma	Proteínas	$\delta$ (N-H)	(Petibois et al., 2001)
1200-1400	Soro	Proteínas (metil e metileno)	$\delta$ (C-H)	(Sankari et al., 2010)

O uso da técnica espectrofotométrica FTIR em conjunto com a regressão de mínimos quadrados parciais (*Partial Least-Squares* - PLS) faz com que este método possua sensibilidade, especificidade e acurácia satisfatórios (Riley et al., 2007). Um espectro biológico infravermelho com atribuições moleculares é mostrado na Figura 13.

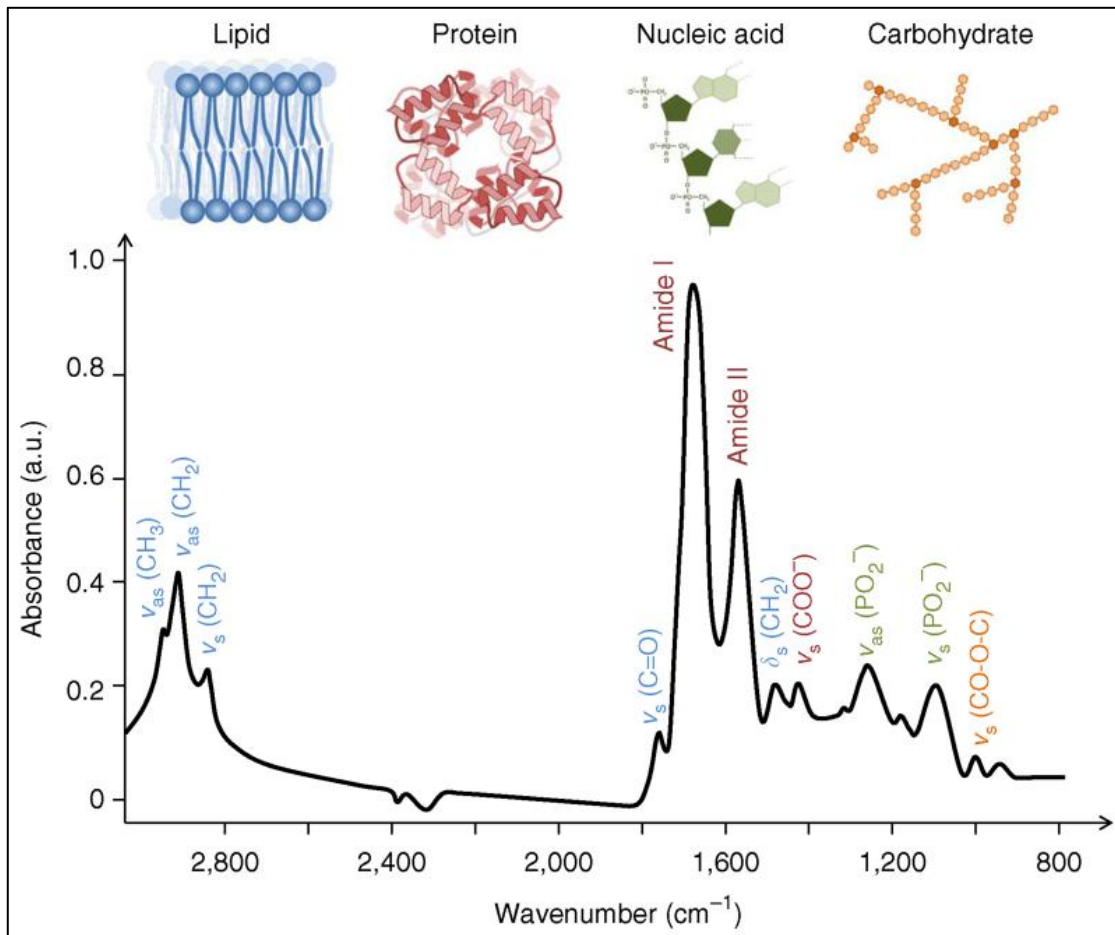


Figura 13 - Espectro biológico de carcinoma humano com as absorções de pico biomolecular de 3.000-800 cm-1 (Extraído de Baker et al., 2015)

---

## Capítulo 2 – Objetivos e estrutura da tese

---

A descoberta do causador da toxoplasmose instigou pesquisadores de todo o mundo a investigarem o comportamento do *T. gondii*. Esse parasita é conhecido como um importante patógeno oportunista de fetos, recém-nascidos e pacientes com uma variedade de imunodeficiências primárias genéticas e adquiridas. A detecção do parasita é dificultada pela existência de epítopos diferentes, sendo necessária a utilização de alvos antigênicos específicos (antígenos purificados, recombinantes ou sintéticos), além da baixa sensibilidade dos métodos parasitológicos onde existe uma carga parasitológica mínima. A detecção do *T. gondii*, diferentemente de outras parasitoses, não é por pesquisa de ovos, mas através da presença de imunoglobulinas específicas que precisam de um imunodiagnóstico. A variedade de testes padronizados e disponíveis no mercado não é suficiente para que se produza um consenso global sobre quais métodos laboratoriais que devem ser utilizados para determinar o estágio da infecção (aguda/crônica), forma infectante (taquizoíto, cisto ou oocisto) e genótipo da cepa. A identificação destes parâmetros facilita um tratamento mais adequado ao paciente, principalmente em indivíduos dos grupos de risco (gestantes e portadores de VHI).

A produção do conhecimento científico que possa fornecer parâmetros de controle através da saúde pública é uma medida eficaz na própria prevenção da doença. O rastreamento da toxoplasmose é imprescindível para que seus males não se perpetuem na sociedade.

Esta tese está dividida em seis capítulos. O capítulo I abrange uma revisão sistemática sobre a biologia do patógeno, distribuição geográfica, epidemiologia e aspectos gerais da doença e descrição de métodos utilizados para detectar os anticorpos específicos. O capítulo II compreende os objetivos, geral e específico, e estruturação da tese. O capítulo III descreve os aparelhos utilizados na tese e as variáveis estatísticas utilizadas para embasamento matemático dos resultados produzidos pelas técnicas. O capítulo IV apresenta os resultados obtidos com relação ao perfil epidemiológico, avaliação econômica das técnicas e análise dos espectros do Raman e FTIR. O Capítulo V oferece as principais conclusões da tese, enquanto o capítulo VI apresenta as sugestões para trabalhos futuros

## 2.1 Objetivo geral

Verificar a presença de anticorpos antitoxoplasmose no sangue de usuários utilizando o espectrofotômetro Raman e FTIR, a fim de implementar um rastreamento sorológico em escala maciça, utilizando métodos mais rentáveis e utilizando baixas quantidades de soro.



## 2.2 Objetivos específicos

- Identificar anticorpos IgM e IgG no sangue de voluntários utilizando a técnica da espectrofotometria Raman e FTIR;
- Identificar os espectros produzidos pelo IgM e IgG em soro sanguíneo;
- Comparar as análises do espectrofotômetro com o teste imunoenzimático (tradicional) para verificar a confiabilidade do diagnóstico, utilizando uma Análise Estatística Multivariada;
- Comparar o custo/benefício das técnicas utilizadas na tese com a técnica utilizada padrão ouro;
- Contribuir com a epidemiologia da toxoplasmose;
- Verificar a reprodutibilidade (repetitividade) e a validade (acurácia) entre os dois métodos.

---

### Capítulo 3 – Materiais e métodos

---

Este estudo foi avaliado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Todos os procedimentos foram devidamente esclarecidos aos participantes, tendo sido utilizado um Termo de Consentimento Livre e Esclarecimento (TCLE). A pesquisa de campo foi realizada exclusivamente no Laboratório DNA Center de Natal, estado do Rio Grande do Norte, Brasil.

As amostras de soro sanguíneo de 400 pacientes (valor obtido de acordo com o cálculo amostral) foram obtidas no referido laboratório e cedidas espontaneamente como consta no TCLE, no período de 20/05/2016 a 23/06/2016. As amostras originadas de pacientes menores de dezoito anos, idosos, pacientes graves, isentos de HbsAg (hepatite B) e de anticorpos para o VHC (hepatite C) e o HIV foram excluídos da pesquisa.

As amostras foram previamente preparadas (cadastradas no sistema e centrifugadas por dez minutos) e avaliadas pelo teste de ECLIA. Em seguida foram transportadas em caixa isoladora de temperatura com resfriamento interno a 3°C para que não houvesse desnaturação de proteínas na análise do Raman e FTIR. Os testes duravam, em média, 5 minutos.

### 3.1 Teste de ECLIA

O teste de ECLIA foi realizado no Laboratório DNA Center de Natal. Visando a detecção da presença de anticorpos anti-*T. gondii* (IgG e IgM) no soro de pacientes, foi realizado o teste seguindo o protocolo do laboratório e os resultados foram quantificados. O aparelho utilizado foi um Cobas® e411, marca Roche, totalmente automatizado para ensaios imunológicos. Os reagentes utilizados foram inseridos no aparelho e protegidos de elementos externos, evitando a contaminação das amostras, dos reagentes e das calibrações. A amostra (10 ml) foi automaticamente pré-diluída a 1:20 com o diluente Elecsys Diluent Universal (Roche®). Em seguida, foi adicionado antígeno recombinante específico de *T. gondii* marcado com um complexo de rutênio (Complexo Tris – (2,2' bipiridil) rutênio(II) Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>). São adicionados anticorpos monoclonais biotinizados específicos anti-IgG/IgM humana e micropartículas revestidas de estreptavidina. O complexo formado liga-se à fase sólida pela interação da biotina e da estreptavidina. A mistura de reação foi aspirada para a célula de leitura, onde as micropartículas são fixadas magneticamente à superfície do eléctrodo. Os elementos não ligados foram então removidos com ProCell (Kit com 6x380mL). A aplicação de uma corrente eléctrica ao eléctrodo induz uma emissão quimioluminescente que é medida por um fotomultiplicador. Os resultados foram determinados automaticamente pelo software Elecsys comparando o sinal de eletroquimioluminescência obtido do produto de reação da amostra com o sinal do valor de cutoff anteriormente obtido pela calibração do ensaio toxoplasmose IgG/IgM.

### 3.2 Espectroscopia FTIR

Antes da análise por espectroscopia FTIR as amostras foram preparadas misturando 10 ml de plasma sanguíneo dos pacientes e 100  $\mu$ L de conjugado (anti-IgG/IgM + peroxidase, BioClin®) em tubos de vidro da marca Labor® e aguardados por 5 min. Foi utilizado um espectrofotômetro infravermelho de modelo Spectrum 65 FTIR da marca Perkin Elmer®. A análise foi feita colocando uma gota da amostra previamente preparada no compartimento do aparelho. Foi mantida uma temperatura de 28° C durante a análise, para diminuir a influência da água na produção das bandas.

Os espectros foram obtidos na faixa de 1800 a 800  $\text{cm}^{-1}$ , já que a maioria das assinaturas espectrais biomoleculares residem nessa área (Theophilou et al., 2015), com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ , de alta resolução. O espectrofotômetro FTIR utilizado estava equipado com um detector DTGS para aumentar a sensibilidade do aparelho.

As vibrações de cada banda foram realizadas no espectro infravermelho nos soros sanguíneos ao comparar com uma amostra controle, sem a presença das IgG e IgM (comprovado pelo ECLIA).

### 3.3 Espectroscopia Raman

As amostras foram preparadas tal como descrito acima para o método de espectroscopia FTIR. As análises do plasma sanguíneo foram feitas no DXR 2 SmartRaman da marca Thermo Scientific®.

Os espectros foram obtidos na faixa entre 1800 a 650  $\text{cm}^{-1}$  e potência do laser de 14 mV. Foram aplicadas a correção de fluorescência e a correção de linha de base, ocorrendo a medição em triplicatas. O laser foi aquecido por três minutos para que as amostras fossem medidas pela mesma quantidade de energia. O aparelho foi configurado com o software OMNIC™ para a quantificação, calibração e validação.

### 3.4 Bioestatística associada aos exames diagnósticos

Os métodos diagnósticos que utilizam variáveis dicotômicas (positivo / negativo) abordam a sensibilidade e especificidade como avaliação de desempenho quando comparadas com o método de referência. O melhor teste diagnóstico seria um teste com 100% de sensibilidade e especificidade, mas os valores destas propriedades são dependentes da quantidade de positivos e negativos e do valor do teste que define os valores anormais. Assim, os verdadeiros positivos (VP) referem-se ao número de doentes que foram detectados pelo exame em estudo e pelo exame padrão-ouro. Os verdadeiros negativos (VN) referem-se ao número de pessoas sem a doença, tanto no teste em estudo, quanto no teste padrão-ouro. Os falso-positivos (FP) refletem o número de pacientes que foram diagnosticados como sendo doentes pelo exame em avaliação e sadio pelo teste padrão-ouro. Os falso-negativos (FN)

representam o número de pacientes que foram negativos no exame em estudo e positivos no teste padrão-ouro.

Os cálculos estatísticos utilizados foram embasados nas fórmulas descritas abaixo:

- **Cálculo amostral** – O cálculo amostral para se determinar o quantitativo de amostras a serem analisadas foi baseado na seguinte fórmula:

$$(\delta.p)^2 = (p.q / n) . Z$$

**Equação 1** - Fórmula para cálculo da quantidade de amostras analisadas

Onde:

- **n** e o tamanho da amostra;
- **δ**= erro padrão;
- **p** = probabilidade de o evento ocorrer;
- **q** = probabilidade do evento não ocorrer;
- **Z** = valor tabelado da distribuição Normal (1,96 para o IC= 95%) (Vieira, 2008)

Utilizando um intervalo de confiança de 95%, admitindo um erro de 10% e a média de prevalência de Toxoplasmose de 60% (baseado na maioria dos estudos sorológicos), obtém-se que o tamanho mínimo da amostra necessária para esse estudo e de **130 amostras**. Para se obter o dimensionamento numérico e a técnica de amostragem dos elementos de um estudo é necessário realizar o planejamento amostral, ou seja, vislumbrar o problema investigado a fim de que se possa unir a significância estatística dos testes ao significado clínico dos resultados (Miot, 2011).

- **Regressão logística binária:** A regressão logística na área de saúde é muito comum. É um modelo estatístico que utiliza uma função logística para modelar uma variável dependente binária ou multinomial. Quando aplicados corretamente, as análises de regressão logística fornecem informações muito poderosas sobre quais atributos (ou seja, variáveis) são mais ou menos prováveis de prever o resultado do evento em uma população de interesse. Esses modelos também mostram até que ponto as mudanças nos valores dos atributos podem aumentar ou diminuir a probabilidade prevista de resultado do evento.
- **Sensibilidade (S)** - é a capacidade que o teste diagnóstico/triagem apresenta de detectar os indivíduos VP, ou seja, de diagnosticar corretamente os doentes. Foi obedecida a seguinte formulação:

$$S = \frac{VP}{VP + FN}$$

**Equação 2** - Equação para determinação de sensibilidade do teste

Os testes com alta sensibilidade devem ser utilizados para afastar outras doenças na fase inicial do diagnóstico, quando o ônus de não fazer o diagnóstico é alto (tratamento imediato pode melhorar a sobrevivência de um paciente com uma doença que ameaça a sua vida) e rastreamento (screening) de doenças na população.

- **Especificidade (E)** - é a capacidade que o teste diagnóstico/triagem tem de detectar os VN, isto é, de diagnosticar corretamente os indivíduos sadios, de acordo com a equação 2.

$$E = \frac{VN}{FP + VN}$$

**Equação 3** - Equação para determinação de especificidade do teste

Os testes com alta especificidade são indicados para confirmar um diagnóstico sugerido por outros exames (menos especificidade) e resultados falso positivos que podem ser lesivos ao paciente (certeza no diagnóstico para iniciar um tratamento clínico que acarreta mudanças nos hábitos do paciente).

- **Valor preditivo do teste** – Em epidemiologia, o sucesso de um teste diagnóstico depende da extensão que o mesmo pode prever sobre a ocorrência da doença ou infecção. Calcula-se a probabilidade de o paciente estar verdadeiramente com a doença ou livre dela.

- ✓ **Valor preditivo positivo (VPP)** - é a proporção de doentes entre os positivos pelo teste.

$$VPP = \frac{VP}{VP + FP}$$

**Equação 4** - Equação para determinação do Valor Preditivo positivo do teste.

- ✓ **Valor preditivo negativo (VPN)** - é a proporção de sadios (sem a doença) entre os negativos ao teste.

$$VPN = \frac{VN}{VN + FN}$$

**Equação 5** - Equação para determinação do Valor Preditivo negativo do teste

- **Índice Kappa (k)** - Uma maneira muito utilizada para expressar a confiabilidade de um teste é através do índice k que constitui um avanço em relação à taxa geral de concordância, por ser um indicador de consonância ajustada. O k informa a proporção de concordância não aleatória (além da esperada pela chance) entre observadores ou medidas da mesma variável categórica, e seu valor varia de "menos 1" (completo desacordo) a "mais 1" (concordância total). Se a medida concorda mais frequentemente do que seria esperado pela chance, então o índice k é positivo; se a concordância é completa k = 1. Zero indica o mesmo que leituras feitas ao acaso. A tabela 12 apresenta a referência para o valor de Kappa.

$$k = \frac{p_o - p_e}{1 - p_e}$$

**Equação 6** - Estatística de Kappa

Onde:

- ✓  $p_o$ : proporção observada estimada;
- ✓  $p_e$ : proporção esperada estimada

**Tabela 12** - Referência do Índice Kappa (K) e níveis de interpretação de concordância

ÍNDICE KAPPA (K)	NÍVEL DE CONCORDÂNCIA
< 0,00	Insignificante
0.00 a 0.20	Fraco
0.21 a 0.40	Razoável
0.41 a 0.60	Moderada
0.61 a 0.80	Bom
0.81 a 0.99	Ótimo
1.00	Perfeito

- **Curva ROC (Receiver Operating Characteristic)** – É uma medida da capacidade de um observador para determinar se um método diagnóstico é confiável ou não e em que grau. A área sob a curva ROC é um indicador importante porque fornece uma medida da precisão total independente de um limiar

particular. A leitura das curvas ROC permite quantificar a relação entre sensibilidade e especificidade de um teste diagnóstico, já que esta medida é de difícil conciliação, observando o delineamento gerado pela comparação com uma curva em diagonal e a área sob a curva, gerando medidas diretamente proporcionais: quanto maior a área, melhor o teste. Na representação da curva ROC, a área sob a curva define a probabilidade do teste em detectar os verdadeiro-positivos e os verdadeiro-negativos, ou seja, expressa a acurácia do teste. Quando mais perto do canto superior esquerdo estiver a curva, melhor é o teste. A curva gerada demonstra se a sensibilidade vem em detrimento da especificidade e vice-versa. Quanto maior a área definida pela curva, melhor será o teste. A curva ROC é traçada colocando-se no eixo das abscissas (x) as probabilidades de ocorrência de resultados falso-positivos, que também pode ser expresso como 1-especificidade. No eixo das ordenadas (y) colocamos as probabilidades de ocorrência de resultados verdadeiro-positivos que também podem ser expressos como a sensibilidade do teste para aquele valor.

- **Verossimilhança** – Esta análise descreve o desempenho de um teste diagnóstico. É utilizada para calcular a probabilidade de doença depois de um teste positivo ou negativo. A razão de verossimilhança ou razão de probabilidades é dada em chances (razão de duas probabilidades) e é definida como a probabilidade de um resultado do teste em pessoas com a doença, dividida pela probabilidade do resultado do teste em pessoas sem a doença. Seus resultados mostram quantas vezes mais provável, ou menos, encontramos um resultado de um teste em pessoas doentes comparadas com as não doentes. Os resultados dicotomizados, que nessa pesquisa se adotou como sendo “positivo” e “negativo”, associam-se a um teste positivo e o outro a um teste negativo. Este dado estatístico é menos susceptível a mudanças de prevalência da doença.

**Verossimilhança positiva** – Chance de um resultado positivo ser verdadeiro positivo. Quanto maior a razão de verossimilhança, melhor será o teste.

$$VP = \frac{\frac{VP}{VP + FN}}{\frac{FP}{FP + VN}}$$

**Equação 7** - Equação para determinação do valor de Verossimilhança positiva

**Verossimilhança negativa** – Chance de um resultado negativo ser verdadeiro negativo. Quanto menor a razão de verossimilhança negativa, melhor será o teste.



$$VN = \frac{\frac{FN}{VP + FN}}{\frac{VN}{FP + VN}}$$

**Equação 8** - Equação para determinação do valor de Verossimilhança negativa

Os estudos de comparação de testes diagnósticos devem obedecer aos critérios de aleatorização. É necessário verificar se os testes atendem aos princípios estatísticos quando comparados aos pacientes sadios e doentes. Além disso, os testes em estudo devem ser aplicados nas mesmas condições da clínica média e ter a capacidade de detectar tanto pacientes graves, quanto portadores da doença com sintomas semelhantes a outras doenças.

- **Coefficiente de correlação de Pearson:** Medição da correlação entre duas variáveis que se associam a partir da distribuição das frequências ou pelo compartilhamento de variância (Paranhos et al., 2014).

$$r = \frac{1}{n-1} \sum \left( \frac{x_i - \bar{X}}{s_x} \right) \left( \frac{y_i - \bar{Y}}{s_y} \right)$$

**Equação 9** - Equação da correlação de Pearson

Tendo como base a tabela 13 abaixo, pode-se atribuir valores (entre 0 e 1) para correlacionar variáveis. Quando a relação é positiva “r” tomará o valor 1 quando a relação é perfeita. Quando a relação é negativa “r” tomará o valor -1 quando a relação é perfeita (contrária). Quando a relação é difusa ou não linear “r” será igual a 0.

**Tabela 13** - Coeficiente de correlação de Pearson

Coeficiente de correlação de Pearson	
Variação	Correlação
0	Nula
0,01 – 0,35	Fraca
0,36 - 0,65	Média
0,66 – 0,95	Forte
0,96 – 0,99	Muito forte
1	Perfeita

- **Perfil epidemiológico** – O perfil epidemiológico é um importante indicador de condições de vida de uma população. As variáveis utilizadas servem para traçar um perfil de uma comunidade, se comprometendo a expor uma análise verdadeira das condições de saúde da população, construindo o desenvolvimento de um sistema de saúde (Rouquayrol, 2013). Essa variável é fundamentada em outras variáveis inseridas no contexto social (faixa etária, renda, escolaridade, saneamento básico, conhecimento sobre a doença, presença de cães e gatos, consome carne e vegetais crus ou mal passado e hábitos de higiene) e na avaliação das condições de vida e saúde de uma população. As variáveis descritas foram analisadas neste estudo para traçar o perfil populacional e associá-las às condições relacionadas a presença das imunoglobulinas.
- **Método Stepwise Forward** – Os métodos de seleção e exclusão de variáveis são baseados em cálculos que verificam a importância de cada variável para serem inseridas nos modelos. Essa importância é definida de acordo com a significância estatística do coeficiente associado à variável. Em cada passo do procedimento a variável mais importante, em termos estatísticos, é aquela que produz a maior mudança no logaritmo da verossimilhança em relação ao modelo que não contém a variável.
- **Estatística de Wald** – Este teste é obtido a partir da comparação entre a estimativa de máxima verossimilhança e a estimativa de seu erro padrão. Esta estatística teste tem distribuição Normal, sendo seu valor comparado com valores tabulados de acordo com o nível de significância definido.

### 3.5 Avaliação econômica dos métodos diagnósticos

Os métodos em estudo foram submetidos a uma avaliação econômica. Os custos de maquinário e insumos foram comparados para designar o melhor teste, seja no custo minimização ou no custo efetividade.

O custo minimização foi calculado a partir de dos custos da técnica padrão menos os custos da técnica em estudo, como descrito na fórmula abaixo:

$$C_{\text{Raman/FTIR}} - C_{\text{ECLIA}}$$

**Equação 10** - Fórmula custo minimização.  $C_{\text{Raman/FTIR}} = \text{Custo Raman/FTIR} - C_{\text{ECLIA}} = \text{Custo ECLIA}$

Esse tipo de análise econômica possui praticidade, pois necessita apenas mensurar custos. Para o cálculo do custo efetividade, utilizou a seguinte fórmula para análise:

$$\text{RICE} = \frac{C_s - C_c}{\text{Efetividade IgG/IgM}}$$

RICE - Rácio Incremental;  $C_s$  – Custo nova tecnologia;  $C_c$  – Custo tecnologia atual; Efetividade tecnologia atual.  
**Equação 11** - Rácio incremental custo-efetividade de IgG (extraído de Pereira, 2009)

A efetividade das técnicas é baseada no número de amostras positivas que as mesmas conseguem detectar, sendo uma avaliação que utiliza desfechos concretos da prática clínica.

---

## Capítulo 4 – Resultados e discussão

---

Dentre as 400 amostras analisadas, 363 pacientes eram do sexo feminino (90,75%) e 37 eram do sexo masculino (9,25%). As amostras foram caracterizadas, numa primeira fase, quanto ao perfil epidemiológico da distribuição da doença na população, tendo como base os resultados do métodos padrão - ECLIA. Posteriormente as amostras foram avaliadas por dois métodos alternativos de identificação de IgG e IgM, a espectroscopia Raman e FTIR. Esta avaliação foi feita por observação dos espectros e por análise estatística. Foi também efetuada uma análise de custos às 3 técnicas indicadas.

#### 4.1 Perfil epidemiológico

O perfil epidemiológico foi feito para identificar o quadro de saúde da população e os fatores que são responsáveis pela distribuição da doença na região estudada. Com o levantamento do perfil epidemiológico, os gestores podem avaliar a doença e identificar os pontos críticos que precisam de solução imediata (saneamento básico, tratamento das doenças, campanhas de prevenção e controle). Dessa forma, as ações serão voltadas aos problemas de forma pontual, facilitando o trabalho dos profissionais e contribuindo para a melhoria da saúde da população.

As amostras com imunoglobulina G, ou seja, pacientes já expostos ao parasita, apresentaram frequência de 65% (IC95% [60,2%, 69,6%]) (Tabela 14).

**Tabela 14** - Frequência de IgG em plasma sanguíneo

		Count	Column N %	95,0% Lower CL	95,0% Upper CL
Sorologia IgG	Negativo	140	35,0%	30,4%	39,8%
	Positivo	260	65,0%	60,2%	69,6%
	Total	400	100,0%	.	.

A distribuição das imunoglobulinas de acordo com as variáveis estudadas (sexo, faixa etária, escolaridade, renda, conhecimento da doença, saneamento básico, animais (Cães e gatos), consumo de carne crua ou mal passada, consumo de vegetais crus e hábitos de higiene) conduziu aos resultados reportados na tabela 15.

Tabela 15 - Distribuição das variáveis segundo a sorologia IgG

		Positivo			
		N	nP	%	pvalue
<b>Sexo</b>	Feminino	363	240	66,1%	<0,001
	Masculino	37	20	54,1%	0,642
<b>Faixa etária</b>	18 - 22	52	32	61,5%	0,031
	23 - 27	111	78	70,3%	<0,001
	28 - 32	106	72	67,9%	<0,001
	33 - 37	69	43	62,3%	0,006
	38 - 42	50	31	62,0%	0,028
	43 - 50	12	4	33,3%	0,221
<b>Escolaridade</b>	Ens. fund inc ou sem escolaridade	42	26	61,9%	0,049
	Ens. fund comp	91	63	69,2%	<0,001
	Ens. médio inc.	98	66	67,3%	<0,001
	Ens. médio comp.	108	68	63,0%	<0,001
	Ens sup inc	33	19	57,6%	0,325
	Ens sup comp ou pós-graduação	28	18	64,3%	0,061
<b>Renda</b>	Um salário	220	151	68,6%	<0,001
	Entre um e dois	152	90	59,2%	0,002
	Entre dois e três	22	16	72,7%	0,007
	Acima de quatro	6	3	50,0%	1,000
<b>Conhecimento sobre a doença</b>	Não	132	95	72,0%	<0,001
	Sim	268	165	61,6%	<0,001
<b>Saneamento básico</b>	Não	266	167	62,8%	<0,001
	Sim	134	93	69,4%	<0,001
<b>Animais (cães e gatos)</b>	Não	339	217	64,0%	<0,001
	Sim	61	43	70,5%	<0,001
<b>Consome carne crua ou malpassada</b>	Não	256	168	65,6%	<0,001
	Sim	144	92	63,9%	<0,001
<b>Consome vegetais crus</b>	Não	24	13	54,2%	0,773
	Sim	376	247	65,7%	<0,001
<b>Hábitos de higiene</b>	Não	30	20	66,7%	0,020
	Sim	370	240	64,9%	<0,001

A partir dos resultados obtidos na tabela 15, é possível inferir que a variável "faixa etária" tem uma probabilidade de soropositividade de 1,48 vezes maior, principalmente nas faixas etárias entre 23 e 37 anos. A variável "sexo" apresentou significância estatística para o sexo feminino, atingindo maior

probabilidade de soropositividade do que o sexo masculino. O grau de significância das variáveis foi medido e avaliado em separado. As variáveis mais significativas (idade, sexo e conhecimento da doença) segundo Hosmer & Lemeshow (Hosmer & Lemeshow, 2000) ( $p < 0,15$ ) foram agrupadas para a construção da tabela 16.

De seguida utilizando o método Stepwise Forward, onde a cada etapa é incorporada uma variável, que seja mais relevante de acordo com  $p = 0,15$  e  $p = 0,20$ , de forma a construir o modelo mais estável numericamente, minimizando o número de variáveis, já que quanto mais variáveis incluídas no modelo mais ele se torna dependente dos dados, foram incluídas, no modelo final as variáveis: sexo, faixa etária e conhecimento da doença para a previsão da presença de anticorpos IgG contra toxoplasmose (Braga & Carneiro, 2016).

Neste estudo foram verificados os fatores de risco sociodemográficos no desenvolvimento da doença utilizando o modelo de regressão logística. Os fatores de risco sociodemográficos utilizados foram a faixa etária, sexo e conhecimento da doença. O modelo de regressão logística binária foi utilizado para observar se há correlação entre as variáveis e a presença da imunoglobulina G. Em cada etapa foi incorporada uma variável mais relevante para que o modelo apresente números mais estáveis. Foram incorporados oito passos. Utilizando a seleção automática de variáveis, foi incluído, na construção do modelo, apenas os fatores de risco que contribuíram significativamente para a análise. Ocorreu associação estatística significativa, em nível de significância de 95%, entre as variáveis: sexo, faixa etária e conhecimento da doença e a presença de anticorpos IgG contra toxoplasmose ( $p < 0,005$ ).

**Tabela 16** - Resultado da aplicação da técnica Stepwise forward para seleção das variáveis dependentes

	B	S.E	Wald	df	p	Exp(B)	95% IC para EXP(B)	
							LI	LS
Faixa Etária			8,311	5	0,140			
Faixa Etária(1)	0,389	0,357	1,188	1	0,276	1,475	0,733	2,969
Faixa Etária(2)	0,366	0,360	1,037	1	0,309	1,442	0,713	2,919
Faixa Etária(3)	0,077	0,384	0,041	1	0,840	1,080	0,509	2,291
Faixa Etária(4)	-0,061	0,413	0,021	1	0,883	0,941	0,419	2,116
Faixa Etária(5)	-1,268	0,682	3,455	1	0,063	0,281	0,074	1,072
Sexo	-0,619	0,361	2,940	1	0,086	0,538	0,265	1,093
Conhecimento sobre a doença	-0,489	0,237	4,269	1	0,039	0,613	0,386	0,975
Constante	1,470	0,514	8,169	1	0,004	4,348		

B, estimativas para os coeficientes declive do modelo de regressão logística binária contendo a variável; S.E., erro padrão estimado para o coeficiente estimado; Wald, Estatística de Wald; df, graus de liberdade; valor p, valor associado ao teste de coeficiente estatístico; exp (B), odds ratio estimado; IC, intervalo de confiança de 95% para odds ratio; LI, limite inferior; LS, limite superior.

Um *odds ratio* de 0,613 para a variável conhecimento da doença significa que o conhecimento da doença diminui o risco de uma IgG positiva de 0,613 vezes, o que pode ser visto como um fator contribuinte para a não ocorrência de IgG positiva. O *odds ratio* de 0,538 para o sexo indica que a ocorrência de IgG positivo está mais associada ao sexo feminino do que ao sexo masculino. Assim a partir deste modelo, por exemplo um indivíduo do sexo feminino, na faixa etária dos 28-32, e sem conhecimento da doença, tem uma probabilidade de ter IgG positivo igual a 0,7715. As variáveis sexo feminino e o conhecimento da doença estão relacionadas, já que esta zoonose é amplamente difundida por médicos ginecologistas e/ou obstetras para a mulher grávida, permitindo a este grupo uma melhor compreensão da doença.

A validação interna do modelo foi realizada utilizando a metodologia através da curva ROC (Figura 14). A área estimada para a curva ROC empírica para o modelo é de 0,614 (IC 95% [0,556, 0,672]), o que indica que a capacidade de discriminação deste modelo para o resultado de IgG é aceitável.



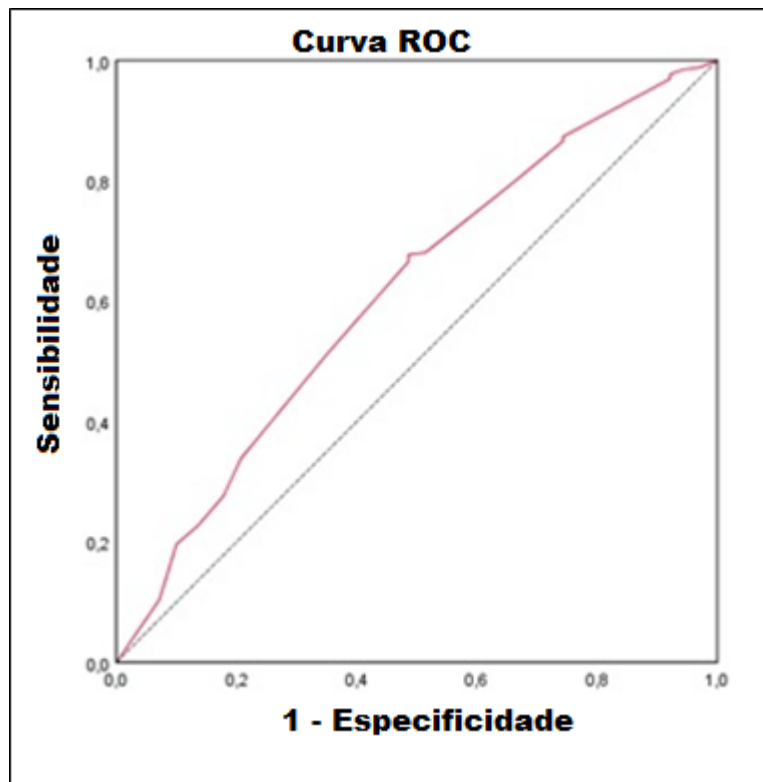


Figura 14 - Curva ROC empírica para o modelo

O valor da estatística de Wald (constante 34,872) atesta que os valores encontrados são significativamente diferentes de zero. As três variáveis categóricas acima (sexo, faixa etária e conhecimento da doença), em comparação com os grupos de referência, são significativas.

A maior significância estatística obtida foi atribuída à idade. A maior prevalência nessa variável (faixa etária) pode ser explicada pelo maior tempo de exposição dos pacientes aos fatores de risco relacionados a essa infecção. O conhecimento da doença foi estatisticamente significativo, pois acredita-se que um maior número de consultas e maior acesso à informação na mídia podem influenciar positivamente os indivíduos na prevenção da doença, obtendo um efeito protetor para a soropositividade.

As taxas de soroprevalência da toxoplasmose foram maiores na população entre 28 e 32 anos, indicando contato prévio com o parasita, e corroborando outros estudos que descrevem que a prevalência de toxoplasmose aumenta em indivíduos adultos e longevos. A busca por anticorpos anti-*T. gondii* na população é um importante mecanismo de prevenção, principalmente em mulheres suscetíveis em idade fértil (16 a 49 anos). Esse rastreamento de anticorpos varia dependendo da política de saúde de cada país. No Brasil, a triagem é realizada semanalmente para que a detecção e o consequente tratamento sejam mais rápidos, tanto para a gestante como para a criança. O maior número de mulheres

analisadas deve-se ao fato deste exame ser exigido por médicos em gestantes, a fim de identificar grupos de risco e evitar a toxoplasmose congênita.

Na América Latina, a soroprevalência de IgG para *T. gondii* pode variar de 51% a 72% e nos países do Golfo da Guiné pode variar de 54 a 77%, semelhante aos encontrados em Natal (69,9%) (Barbosa et al., 2009) e 65% na presente pesquisa. Diferentes soroprevalências podem ser encontradas dependendo da localização geográfica, uma vez que aspectos climáticos, condições ambientais e hábitos culturais são fundamentais para a epidemiologia da infecção.

As variações de soroprevalências podem ser explicadas pela grande variedade socioeconômica, comportamento cultural, clima e padrões de higiene da população (16-18) encontrados no Brasil. Outros estudos não identificaram a mesma associação estatística desta pesquisa, demonstrando que as diferenças culturais, sociais e econômicas são determinantes na distribuição dessa parasitose. Nos estudos de Barbosa (2008), na mesma cidade, mas com perfil populacional diferente (gestantes atendidas em uma maternidade pública), os fatores de risco mais importantes associados à infecção por *T. gondii* foram escolaridade, nível socioeconômico, conhecimento da doença e contato direto com cães e gatos. Embora a água seja um fator importante na transmissão da toxoplasmose, não foi encontrada significância estatística para correlacionar esse fator com a presença de IgG.

Nos testes de correlação não houve associação entre o consumo de carne e frequência de IgG anti-*T. gondii* na população estudada. Esse fator pode ser explicado pelo bom armazenamento das carnes consumidas, já que os cistos do protozoário não suportam temperaturas muito baixas por longos períodos. Estudos na Turquia evidenciaram a falta de correlação entre consumo de carne e a presença de IgG (Ertug et al., 2005).

## **4.2 Avaliação dos métodos alternativos de diagnóstico**

### **4.2.1 Análise dos espectros de FTIR**

As análises do plasma sanguíneo pelo espectrofotômetro FTIR produziram espectros característicos que mostram a diferença espectral entre as amostras (Figura 15).

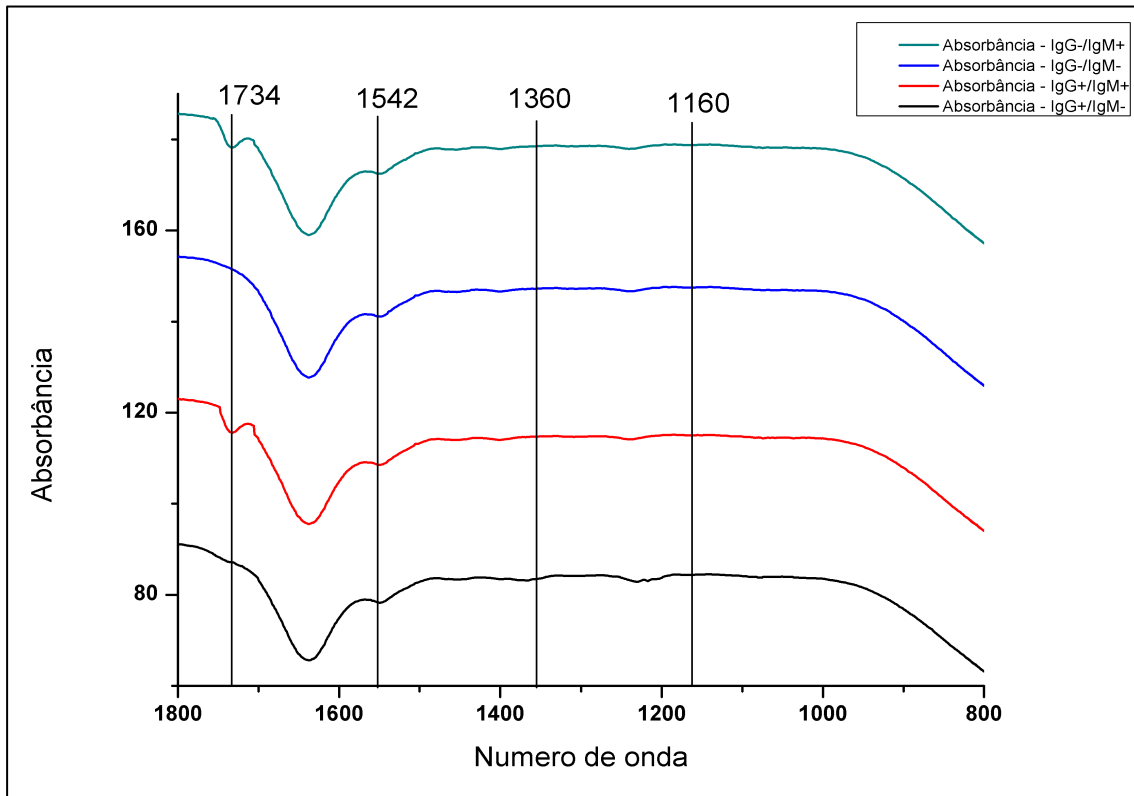


Figura 15 - Espectros produzidos pela espectroscopia FTIR na análise de plasma sanguíneo

A amostra com ausência das imunoglobulinas estudadas foi considerada como amostra controle, permitindo ao estudo a identificação na mudança das faixas nas amostras em que os IgG e IgM estão presentes. A amostra com IgG<sup>+</sup> ( ) possui picos nas faixas de 1360 cm<sup>-1</sup>. A amostra contendo IgM possui um pico de identificação nas faixas de 1542 cm<sup>-1</sup> (N-H em vibração de flexão plana fortemente acoplada ao alongamento C-N vibração de proteína), 1160 cm<sup>-1</sup> (C-O alongamento simétrico) e 1734 cm<sup>-1</sup>.

A mudança nos espectros deve-se a estrutura das imunoglobulinas, onde o IgG apresenta uma conformidade monomérica, enquanto o IgM apresenta estrutura pentamérica com adição de grupamentos químicos (pontes de dissulfeto) que resultaram na identificação desta imunoglobulina pelo espectrofotômetro FTIR. A presença dos eritrócitos pode ser uma barreira para as análises de sangue pelo espectrofotômetro infravermelho, pois esta biomolécula pode interferir com de outras moléculas.

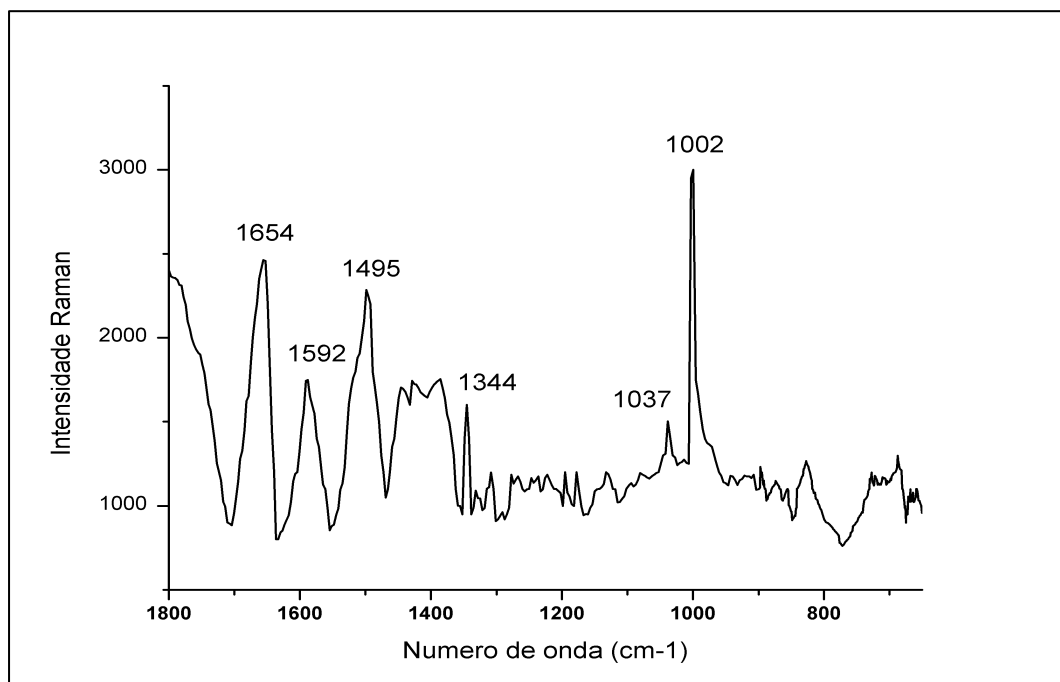
Foi verificado que a absorbância de cada soro é ligeiramente diferente uma das outras. Este fato pode ser explicado por conta da absorção de UV-Vis devido a mudanças estruturais da cadeia de aminoácidos de molécula de proteína.

Apesar dos picos terem saído relativamente próximos, existe um limite para o que o espectrofotômetro FTIR poderia detectar (limitação da aquisição de espectros apenas na região de IV-

médio), caso a amostra fosse diluída em outros compostos.

#### 4.2.2 Análise dos espectros de Raman

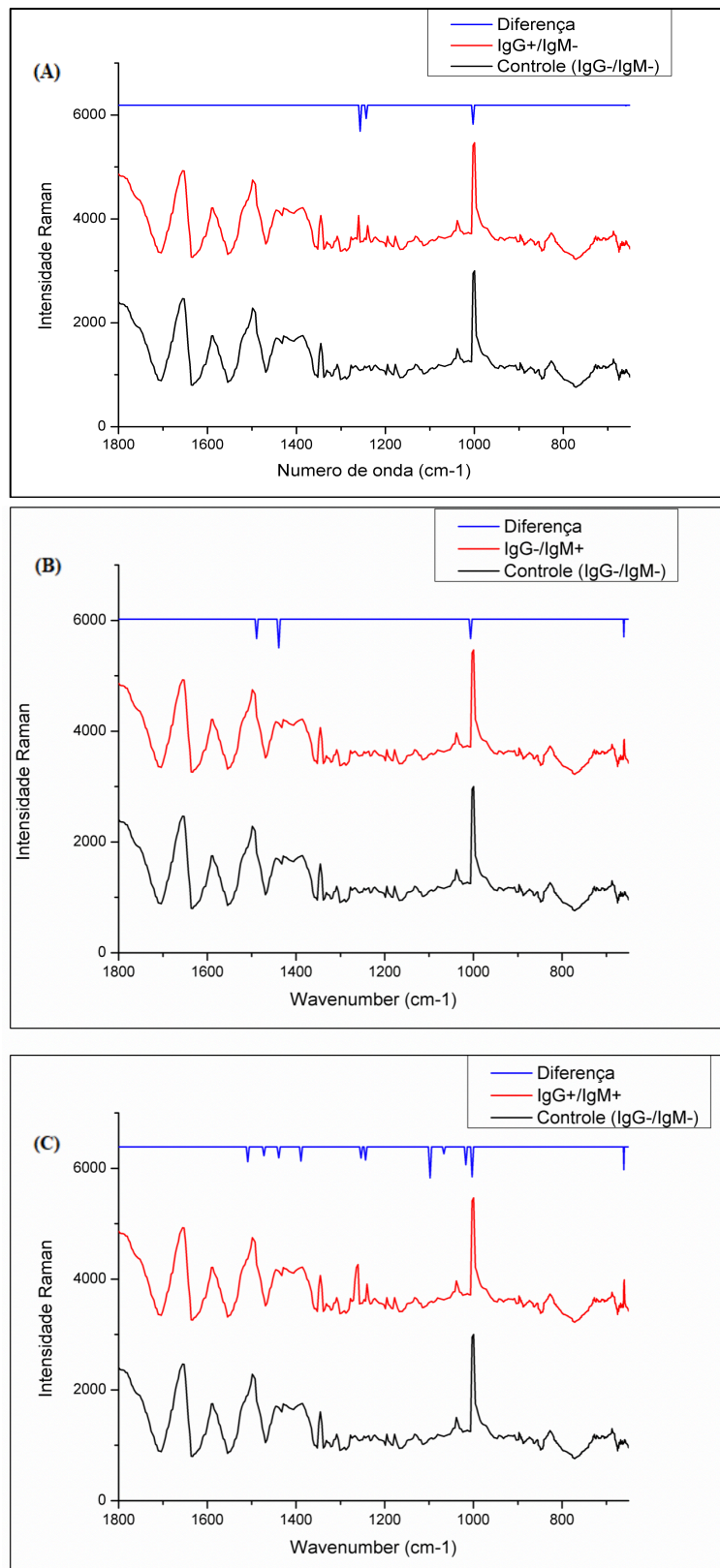
A partir dos espectros produzidos foi possível detectar mudanças de intensidade nos picos. Foi produzido um espectro com uma amostra (Figura 16), chamada controle, sem a presença das IgG e IgM (IgG/IgM) e o resultado obtido foi comparado com os espectros das amostras contendo IgG<sup>-</sup>/IgM<sup>-</sup>, IgG<sup>+</sup>/IgM<sup>-</sup> e IgG/IgM<sup>+</sup> para a verificação de diferença espectral com a imunoglobulinas presentes em outras amostras. As moléculas que foram identificadas pelas bandas produzidas pelos espectrofotômetro já foram identificadas por outros estudos (Talari et al., 2015).



**Figura 16** - Espectro produzido a partir do grupo controle sem a presença das imunoglobulinas M e G (IgG/IgM-)

A diferença entre os espectros das amostras que continham a IgG com o controle (Figura 17A), evidenciam picos nas regiões 1257 cm<sup>-1</sup> (Amida III – proteínas – Flexão N-H / estiramento C-N), 1236 cm<sup>-1</sup> (Fosfolipídeo) e 1075 cm<sup>-1</sup>. As amostras que continham IgM (Figura 17B) apresentaram mudança no espectro na faixa de 660 cm<sup>-1</sup> (C-S modo de alongamento). Os picos nesta faixa evidenciam a presença da IgM, pois sua estrutura possui cinco sítios de ligação (tendo em sua composição as pontes dissulfetos) com o antígeno. As bandas que apresentaram picos nas faixas 1387, 1437 e 1065 cm<sup>-1</sup> são atribuídas ao ácido palmítico, um ácido graxo saturado, e sua concentração aumenta com altos níveis de IgM no soro, sendo relatado interferência no mecanismo de apoptose em tecidos esplênicos (Graumann et al., 2015; Maes et al., 2011). Os desvios de Raman em 1018, 1437, 1507, 1473

(Proteínas e lipídios, modos de deformação C-H<sub>2</sub>) e 1097 cm<sup>-1</sup> são atribuídos ao ácido mirístico, que é encontrado em concentrações mais altas no soro devido a IgM (Maes et al., 2011).



**Figura 17** - Espectro produzido pelo Raman em plasma sanguíneo contendo imunoglobulina G (A): IgG+/IgM-, (B): IgG-/IgM+, (C) IgG+/IgM+

As amostras que continham ambas as imunoglobulinas produziram um espectro com picos nas regiões  $1257\text{ cm}^{-1}$  e  $1236\text{ cm}^{-1}$ , indicando a presença da imunoglobulina G, e  $660\text{ cm}^{-1}$ , evidenciando a presença da imunoglobulina M na amostra (Figura 17C). Os picos verificados nas bandas  $1514$ ,  $1387$  e  $1318\text{ cm}^{-1}$  são atribuídos a galactosamina (hexosamina derivada da galactose e constituinte do IgM) (Melchers, 1972).

O grupo controle, amostra ausente de IgG e IgM (Figura 16), mostrou que alguns picos são característicos das imunoglobulinas encontradas. A mudança do espectro em comparação ao grupo controle demonstrou que as proteínas do antissoro se associaram às imunoglobulinas presente no plasma sanguíneo (Figura 17). O plasma onde o IgM estava presente e o IgG ausente mostrou pico na faixa de  $660\text{ cm}^{-1}$ , evidenciando a detecção das pontes de dissulfetos presentes nesta imunoglobulina. Na amostra onde estava presente o IgG e o IgM, obteve-se diferença espectral nas faixas  $660\text{ cm}^{-1}$ ,  $1056\text{ cm}^{-1}$ ,  $1236\text{ cm}^{-1}$ ,  $1242\text{ cm}^{-1}$  (proteínas) e  $1257\text{ cm}^{-1}$  (amida III de proteínas)  $\text{cm}^{-1}$ ,  $1003$  (lipídios),  $1065\text{ cm}^{-1}$ ,  $1018\text{ cm}^{-1}$ ,  $1097\text{ cm}^{-1}$ ,  $1387\text{ cm}^{-1}$ ,  $1437\text{ cm}^{-1}$ ,  $1473\text{ cm}^{-1}$  e  $1507\text{ cm}^{-1}$ . A presença de IgG nas amostras demonstrou um pico na faixa de  $1242\text{ cm}^{-1}$ ,  $1003\text{ cm}^{-1}$  e  $1257\text{ cm}^{-1}$  em comparação ao grupo controle. Constatou-se um espectro diferenciado na relação IgM/IgG, pois a imunoglobulina M possui maior quantidade de sítio de ligação com o antígeno, formando ligações químicas mais evidentes para a detecção do espectrofotômetro.

A espectroscopia Raman fornece informações a partir da energia vibracional de uma substância, possuindo processos físicos e regras de seleção diferentes da espectroscopia FTIR (Carvalho, 2012). A espectroscopia Raman pode ser empregada em amostras complexas ou diluídas com um mínimo de amostra, sendo possível a caracterização de proteínas, lipídios e carboidratos (Bitar, 2009), podendo ser utilizada em amostras aquosas, pois possui sensibilidade mínima para interferência de água e possui um tempo de análise curto, o que permite uma resposta rápida.

#### 4.2.3 Comparação estatística dos métodos de diagnóstico

Os resultados obtidos nos 3 testes diagnóstico para detecção de IgG e IgM anti – toxoplasma são apresentadas na tabela 17. As sorologias descritas nesta tabela devem ser interpretadas para diagnóstico e possível intervenção médica. Como já foi referido, pacientes em cujo o sangue não há presença de IgG e IgM correm o risco de adquirir infecção primária, pois ainda não entraram em contato com o protozoário. As amostras que continham as imunoglobulinas IgM e ausência de IgG foram de pacientes com infecção aguda. Elas aparecem no início da infecção e persistem por períodos variáveis, mas a sua detecção dependente do tempo e é determinada pela sensibilidade do teste. Em pacientes

com sistema imune íntegro, a produção de IgG é seguida pela produção de IgM em momentos distintos. A ocorrência de soroconversão é sinal de infecção primária. Em grávidas essa imunoglobulina pode perdurar por toda a gravidez (Konishi, 1987). Nos casos em que há a presença de IgG e ausência de IgM, o paciente detém o padrão sorológico clássico de imunidade contra o *T. gondii*, sendo para a gestante a sorologia ideal para descartar a possibilidade de toxoplasmose congênita (Remington et al., 2011). Nos casos de IgG+IgM+ podem ser interpretados como indicação de infecção recente, infecção passada ou resultado falso-positivo (Montoya, 2002). Pacientes soropositivos apenas para IgM não foram encontrados nesta pesquisa, sendo utilizadas amostras sanguíneas que já possuíam a imunoglobulina.

**Tabela 17** - Percentagens das imunoglobulinas de acordo com as amostras coletadas e verificadas nos três aparelhos

Método	Resultado	Percentagem de IgG+IgM+	(IgG+IgM-)	(IgG-IgM+)	(IgG-IgM-)
ECLIA	Negativo	99,3	35,8	100,0	65,0
	Positivo	0,7	64,2	0,0	35,0
Raman	Negativo	99,3	36,5	99,8	64,5
	Positivo	0,7	63,5	0,2	35,5
FTIR	Negativo	98,8	50,2	98,0	53,0
	Positivo	1,2	49,8	2,0	47,0

Os testes diagnósticos com altos percentuais de resultados falso negativos (FN) e falso positivos (FP) não são adequados, considerando-se que nos casos FN, doenças potencialmente graves e fatais (passíveis de tratamento) como, por exemplo, os cânceres, deixarão de ser diagnosticadas e tratadas, acarretando prejuízos irreparáveis aos pacientes e à sociedade, além do possível aumento de custos decorrente da necessidade da repetição dos testes ou realização de novos exames confirmatórios. Por outro lado, resultados FP inevitavelmente levam a transtornos não menos danosos à população e aos pacientes, ao, sobretudo, rotulá-los (quase sempre pelo resto de suas vidas) como doentes quando na verdade não são, induzindo a distúrbios emocionais, incapacitação e aumentos de custos, quase sempre associados a tratamentos desnecessários (Nunes et al., 2015). O número de VN/FN e VP/FP obtidos neste trabalho encontram-se na tabela 18.

**Tabela 18** - Tabulação cruzada entre as espectroscopias Raman e FTIR para descrição de falsos positivos e negativos (FP e FN), verdadeiros positivos e verdadeiros negativos (VP e VN), utilizando o ECLIA como padrão-ouro na detecção de IgG. A tabela estima a precisão diagnóstica de um resultado de teste quantitativo dicotômico ou dicotomizado

IgG				IgM					
		ECLIA		Total		ECLIA		Total	
		Negativo	Positivo			Negativo	Positivo		
Raman	Negativo	134	9	143	Raman	Negativo	395	1	396
	Positivo	6	251	257		Positivo	2	2	4
<b>Total</b>		<b>140</b>	<b>260</b>	<b>400</b>	<b>Total</b>		<b>397</b>	<b>3</b>	<b>400</b>
ECLIA				Total	ECLIA				Total
		Negativo	Positivo				Negativo	Positivo	
FTIR	Negativo	100	96	196	FTIR	Negativo	385	2	387
	Positivo	40	164	204		Positivo	12	1	13
<b>Total</b>		<b>140</b>	<b>260</b>	<b>400</b>	<b>Total</b>		<b>397</b>	<b>3</b>	<b>400</b>

A tabulação cruzada demonstrou que houve maior concordância entre Raman e ECLIA, tanto para o valor “negativo” quanto para o valor “positivo”. O Raman concordou com 134 amostras negativas (verdadeiros negativos) e 251 amostras foram concordantes para a positividade em ambos os testes, totalizando 96,25% de similaridade entre os resultados (verdadeiros positivos). Das 400 amostras analisadas, o Raman discordou de 15 resultados gerados pelo ECLIA, totalizando 3,75% de discordância (Tabela 18). Relativamente ao espectrofotômetro FTIR, os seus resultados discordaram do ECLIA em 136 amostras (34%), concordando em 254 (66%), como mostra a tabela 18. Esses dados mostram que o espectrofotômetro FTIR possui maior probabilidade de gerar resultados falso positivos e falso negativos do que o Raman.

Os testes com alta especificidade devem ser utilizados para confirmar um diagnóstico com menor especificidade, pois um resultado falso positivo pode ser extremamente danoso ao paciente e que acarrete mudanças nos hábitos de vida do indivíduo. Já os testes de alta sensibilidade devem ser utilizados para afastar a doença de sua fase inicial e onde o rápido tratamento pode dar sobrevida ao paciente ou no rastreio de enfermidades para instruir as medidas profiláticas e de segurança cabíveis. É importante destacar que numa doença com baixa prevalência, o valor discriminatório de um teste diagnóstico para rastreamento, mesmo que com alta sensibilidade e especificidade, é pequeno. Assim um teste ideal deveria ter uma sensibilidade e especificidade 100%, mas o valor destas variáveis depende dos resultados dos testes nos pacientes com e sem as imunoglobulinas. Um teste com alta especificidade deve ser usado quando a prevalência da doença é relativamente baixa (doença rara), mesmo que o teste tenha relativamente baixa sensibilidade. Um teste com alta sensibilidade deve ser usado quando a



prevalência da doença é alta (doença comum), mesmo que o teste tenha relativamente baixa especificidade. A tabela 19 representa as análises estatísticas multivariadas com posterior comparação com o padrão-ouro. Os dados produzidos podem ser utilizados como comparação entre os espectrofotômetros Raman, FTIR e o ECLIA.

Observando ainda a tabela 19, pode-se verificar que o método de Raman possui 22,53 vezes mais chances de encontrar um resultado positivo em pessoas doentes quando comparado com pessoas não doentes (quanto mais distante de zero, melhor será o teste). O espectrofotômetro FTIR obteve apenas 2,21 vezes mais chances de encontrar o resultado positivo nos exames de pacientes doentes. Relativamente à RVN do Raman esta atingiu um valor de 0,04, ou seja, expressa uma baixa probabilidade de encontrar um resultado negativo em pessoas doentes quando comparado com pessoas não doentes (valores mais próximos de zero definem o melhor teste). Para o espectrofotômetro FTIR, a RVN foi de 0,52, ou seja, possui maior chance, do que o Raman, de encontrar um resultado negativo em pessoas saudáveis. Assim, pode-se confirmar que o método Raman apresenta valores de RVP e RVN melhores do que os obtidos com a técnica de FTIR.

Os valores preditivos positivos (VPP) e valores preditivos negativos (VPN), medem a probabilidade da doença, caso o resultado seja positivo ou negativo. De acordo com a tabela 19, o Raman obteve, na detecção de IgG, 96,67% de chances de o paciente realmente ser doente, quando o resultado for positivo, contra 3,33% de não ter doença, apesar do resultado também ser positivo. O FTIR obteve 80,39% para paciente doente e 19,61% de ser sadio, mesmo o exame apresentando resultado positivo. Esses dados demonstram uma confiabilidade maior no espectrofotômetro Raman, pois suas probabilidades de acertos são maiores do que as do espectrofotômetro FTIR. Considerando a IgM o VPP do Raman foi de 50%, resultado pouco satisfatório, contra 7,69% do espectrofotômetro FTIR. Para o VPN, o Raman obteve 99,75% do paciente realmente possuir o IgM quando o resultado for positivo e 0,25% de indivíduos sem IgM, mesmo o resultado demonstrando sua presença. O espectrofotômetro FTIR produziu um VPN de 99,48% e 0,52%. Os valores preditivos são influenciados pela prevalência da doença na população em estudo. Uma alta prevalência acarreta maior valor de VPP e menor VPN, não influenciando a sensibilidade e a especificidade do teste (Dercksen et al., 2000).

**Tabela 19** - Análises estatísticas da espectroscopia Raman e FTIR na comparação com o ECLIA com os respectivos IC a 95% na detecção da imunoglobulina G e M

Estatística	IgG						IgM					
	Raman x ECLIA			FTIR x ECLIA			Raman x ECLIA			FTIR x ECLIA		
	Valor	IC de 95%	Valor	IC de 95%	Valor	IC de 95%	Valor	IC de 95%	Valor	IC de 95%	Valor	IC de 95%
<b>Sensibilidade</b>	96,54%	93,53% a 98,41%	63,08%	56,90% a 68,96%	66,67%	9,43% a 99,16%	33,33%	0,84% a 90,57%				
<b>Especificidade</b>	95,71%	90,91% a 98,41%	71,43%	631,9% a 78,74%	99,50%	98,19% a 99,94%	96,98%	94,78% a 98,43%				
<b>RVP</b>	22,53	10,29 a 49,30	2,21	1,67 a 2,92	132,33	26,79 a 653,69	11,03	2,03 a 60,04				
<b>RVN</b>	0,04	0,02 a 0,07	0,52	0,43 a 0,63	0,34	0,07 a 1,66	0,69	0,31 a 1,53				
<b>Prevalência da doença</b>	65,00% (*)	60,10% a 69,67%	65,00% (*)	60,10% a 69,67%	0,75% (*)	0,15% a 2,18%	0,75% (*)	0,15% a 2,18%				
<b>VPP</b>	97,67% (*)	95,03% a 98,92%	80,39% (*)	75,64% a 84,41%	50,00% (*)	16,84% a 83,16%	7,69% (*)	1,51% a 31,21%				
<b>VPN</b>	93,71% (*)	88,67% a 96,59%	51,02% (*)	46,27% a 55,75%	99,75% (*)	98,76% a 99,95%	99,48% (*)	98,86% a 99,77%				
<b>Acurácia</b>	96,25% (*)	93,89% a 97,89%	66,00% (*)	61,13% a 70,63%	99,25% (*)	97,82% a 99,85%	96,50% (*)	94,20% a 98,07%				

(\*) O tamanho da amostra no grupo positivo (Doença presente) e negativo (ausência de doença) reflete a prevalência real da doença, então os valores preditos positivos e negativos e acurácia podem ser estimados e os valores foram contabilizados.

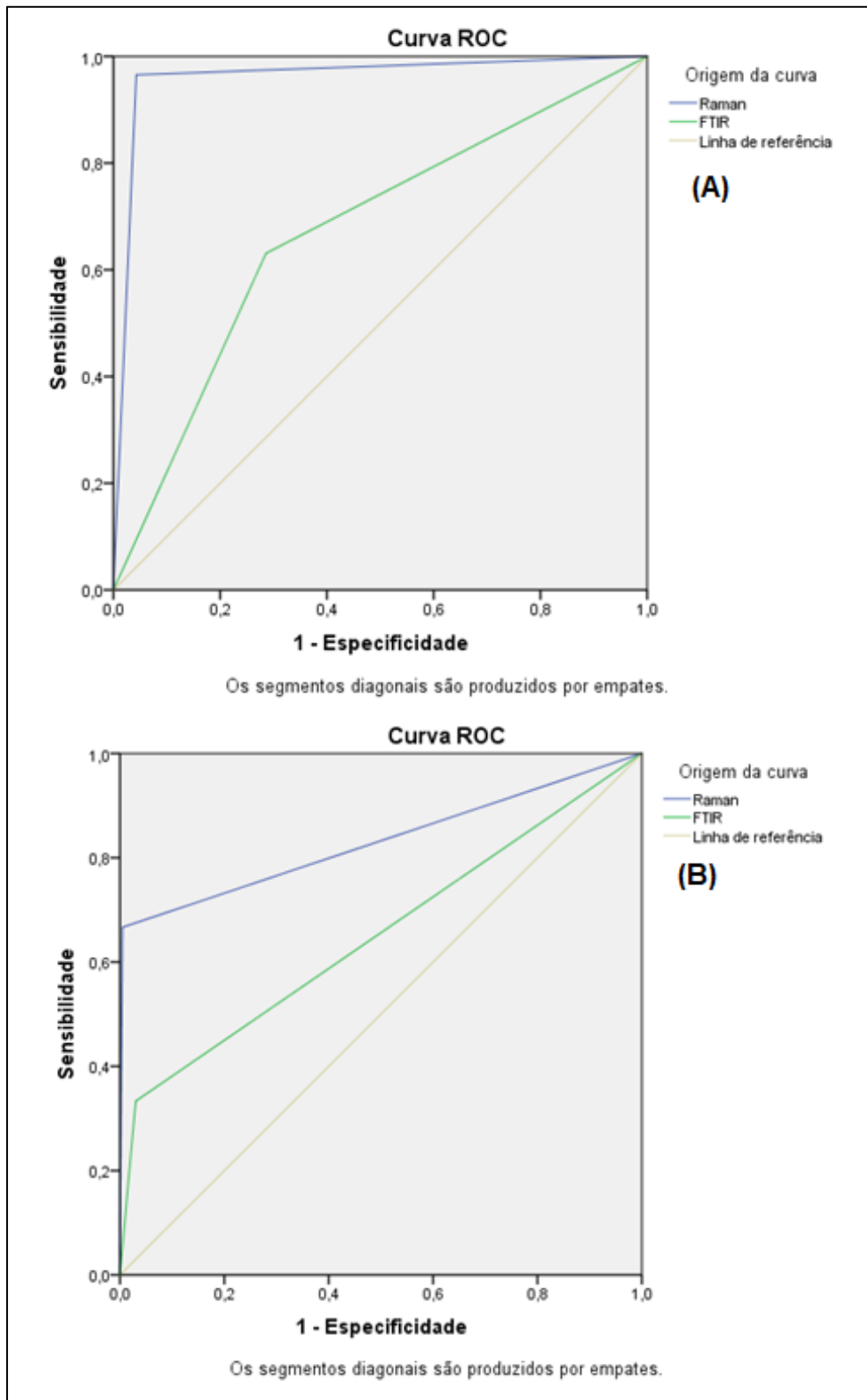
A acurácia dos testes diagnósticos em estudo demonstrou que o Raman possui melhor validade na detecção de IgG e IgM quando comparado ao espectrofotômetro FTIR. O desempenho diagnóstico de acurácia do espectrofotômetro FTIR frente a detecção de IgM foi similar ao Raman. A medida de acurácia dos testes permitiu identificar o Raman como o teste que pode ser utilizado, tanto para medidas de triagem (prevalência baixa) ou clínica médica (prevalência alta). O espectrofotômetro FTIR pode ser utilizado como teste de triagem na detecção de IgM. A verificação do nível de concordância e nível de consistência (fiabilidade) das técnicas estudadas em comparação ao teste padrão-ouro (ECLIA) foi obtida com o cálculo do Índice Kappa (k). Sua distribuição e os respectivos níveis de interpretação estão apresentadas na tabela 12. O valor de k depende da prevalência da patologia em estudo, ou seja, a comparação entre observadores pode ser influenciada pela diferença entre as prevalências, como ocorre entre as medidas estatísticas entre IgG e IgM anti – *T. gondii*, devendo, portanto, utilizar outras medidas estatísticas para comprovar a confiabilidade do método em estudo. Nesse contexto, o valor numérico mínimo adotado para aceitação do Índice Kappa foi o nível de consenso maior que 0,61, considerado nível bom (Tabela 12).

**Tabela 20** - Taxa de concordância (%) e valores de k dos métodos diagnósticos comparados com o ECLIA. O índice de confiança (IC) foi de 95% e o erro padrão

	Método diagnóstico			
	IgG		IgM	
	ECLIA x Raman	ECLIA x FTIR	ECLIA x Raman	ECLIA x FTIR
<b>Concordância (%)</b>	96,25	66	99,25	96,5
<b>Kappa</b>	0,918[0,871-0,965]	0,316 [0,269-0,363]	0,568 [0,558-0,578]	0,114 [0,097-0,131]

Observando a tabela 20 é possível verificar que no método de Raman o índice K teve um valor de 0,918 (ótimo) para verificação de imunoglobulina G e valor 0,568 (regular) para verificação de imunoglobulina M. Por outro lado, o valor de k obtido para o método espectrofotométrico FTIR apresentou valores de 0,16 (fraco) e 0,114 (fraco) para IgG e IgM, respectivamente. Deste modo, os valores encontrados nesta variável estatística mostram que existe maior concordância entre o Raman e o ECLIA quando verificadas as tabelas de tabulação cruzada, corroborando os resultados estatísticos anteriores.

Na representação da figura 18 a linha traçada em diagonal, a 45 graus, expressa a acurácia de 50% e significa que o teste é tão bom quanto qualquer escolha ao acaso.



**Figura 18** - Curva ROC para comparação de ECLIA/Raman e ECLIA/FTIR para detecção de IgG (A) e IgM (B). A visualização da curva ROC do Raman com uma Área de curva de 0,961 e área de curva do FTIR de 0,673 (detecção de IgG) e área de curva de 0,831 e área de curva do FTIR de 0,652 (detecção de IgM)

Os valores obtidos, tanto para o IgG quanto para o IgM, e que ficam acima da linha de referência e mais à esquerda representam corretamente os resultados preditivos. Os valores para baixo e mais à direita representam os resultados incorretos de diagnóstico.

Na linha que representa a detecção de IgG pelo espectrofotômetro FTIR (Figura 18 A) encontra-se uma acurácia de 67,3% (IC 95%; 0,617 – 0,728), que significa que em 67,3% das vezes em que for utilizado, o teste discriminará os verdadeiro-positivos e os verdadeiro negativos. A sensibilidade do teste foi de 63,1% e produção de resultados falsos positivos foi de 28,6% ( $1 - \text{especificidade} = 0,286$ ). A acurácia do espectrofotômetro FTIR na detecção de IgM (Figura 18 B) foi de 65,2% (IC 95%; 0,279 – 1,000), sensibilidade de 33% e produção de falso positivo de 3%. Relativamente ao Raman na detecção de IgG foi encontrada uma acurácia de 96,1% (IC 95%; 0,938 – 0,985), onde em 3,9% das amostras poderão apresentar resultados incoerentes. A sensibilidade do método foi de 96,5% e falsos positivos ( $1 - \text{especificidade}$ ) de 4,3%. A acurácia do Raman na detecção de IgM foi de 83,1% (IC 95%; 0,504 – 1,000) com desempenho de produção de falsos positivos de 0,5% e sensibilidade de 66,7%. Todos os resultados, tanto do espectrofotômetro FTIR como o Raman, foram baseados na determinação do ponto de corte de 0,5 de acordo com as coordenadas produzidas pela curva ROC (Tabela 21).

**Tabela 21** - Área sob a curva na detecção de IgG e IgM pelos espectrofotômetros FTIR e Raman

Método	Área	Erro Padrão <sup>a</sup>	Sig. assintótica <sup>a</sup>	Intervalo de Confiança 95% Assintótico	
				Limite inferior	Limite superior
FTIR (IgM)	0,652	0,19	0,366	0,279	1
FTIR (IgG)	0,673	0,028	0	0,617	0,728
Raman (IgM)	0,831	0,167	0,048	0,504	1
Raman (IgG)	0,961	0,012	0	0,938	0,985

A determinação do ponto de corte (*cutoff point*) de um teste diagnóstico discrimina as duas classes do estudo (doente / não doente). Como a escolha do ponto de corte influência nas características do teste, é necessário que haja uma combinação tanto da sensibilidade quanto da especificidade.

### 4.3 Avaliação económica dos métodos de diagnóstico

No que se refere a avaliação econômica, existem quatro tipos de análises de custos: análise de minimização de custos e análise de custo-efetividade. A minimização de custos avalia a consequência e os custos de uma técnica, caso haja equivalência de resultados, aquela que apresentar menores encargos será a mais eficiente. O Raman possui custo por amostra igual ao espectrofotômetro FTIR, mas efetividade superior. O valor divergente entre os reagentes do Raman/FTIR e o ECLIA se deve ao fato de que as marcas são diferentes. O valor das amostras se deu pelo cálculo da soma dos reagentes e a vidraria (R\$ 600 / € 138,38) divididos pelo número de amostras analisadas (400). A tabela 22 demonstra o custo obtido com cada técnica. Os dados clínicos e econômicos foram coletados simultaneamente e as estimativas de custo-efetividade foram obtidas a partir de dados combinados com a epidemiologia e custo.

**Tabela 22** - Custo das amostras por cada técnica

<b>Materiais</b>	<b>FTIR</b>	<b>Raman</b>	<b>ECLIA</b>
<b>Reagentes</b>	R\$ 490 (€ 113,01)	R\$ 490 (€ 113,01)	R\$ 1.200 (€ 276,75)
<b>Vidraria (tubos de ensaio)</b>	R\$ 110 (€ 25,37)	R\$ 110 (€ 25,37)	R\$ 110 (€ 25,37)
<b>Total</b>	R\$ 600 (€ 138,38)	R\$ 600 (€ 138,38)	R\$ 1.310 (€ 302,12)
<b>Preço por amostra - sem impostos (+15,5%)</b>	R\$ 1,5 (€ 0,35)	R\$ 1,5 (€ 0,35)	R\$ 3,27 (€ 0,75)
<b>Preço por amostra - com impostos (+15,5%)</b>	R\$ 1,73 (€ 0,40)	R\$ 1,73 (€ 0,40)	R\$ 3,76 (€ 0,87)

A análise de custo-efetividade pode ser definida como um método de pesquisa para avaliar e quantificar os custos e as consequências clínicas da utilização de uma tecnologia ou programa de saúde, de forma a estimar critérios de eficiência econômica sobre o uso alternativo dos recursos para atingir um determinado objetivo. Esta metodologia assume que os recursos disponíveis para gastar em saúde são limitados, quer na perspectiva da sociedade, da organização ou do doente (Muennig, 2002), ou seja, preocupa-se em encontrar a alternativa do programa que maximiza os benefícios ou minimiza os custos.

A relação custo-efetividade (Tabela 23) gera resultados sobre tecnologias que possuem maiores custos e menos eficiência, maiores custos e maior eficiência, menores custos e menos eficiência e menores custos e maiores eficiências. O Raman obteve melhor custo efetividade em relação ao

espectrofotômetro FTIR, tanto na detecção de IgG, quanto de IgM. A efetividade (RICE) de uma técnica se dá pelo custo dividido pelo número de amostras positivas.

**Tabela 23** - Custo efetividade de IgG e IgM pelas técnicas testadas

Método	Custos (R\$)			Efetividade (detecção de IgG)	RICE IgG(R\$) (total ÷ efetividade)	Efetividade e (detecção de IgM)	RICE IgM(R\$) (total ÷ efetividade)
	Aparelho	Reagentes + Vidraria	Total				
<b>ECLIA</b>	300.000,00 (€ 71.041,22)	1.310,00 (€ 310,21)	301.310 (€ 71.351,43)	384	784,66	3	100.4
<b>Raman</b>	210.000,00 (€ 49.728,85)	600,00 (€ 142,08)	210.600 (€ 49.870,93)	251	839,04	2	105.3
<b>FTIR</b>	140.505,00 (€33.272,15)	600,00 (€ 142,08)	141.105 (€ 33.414,23)	164	860,39	1	141.10

Os custos do ECLIA foram calculados, assim como na espectroscopia Raman e FTIR, a partir dos valores de insumos (materiais de laboratório e reagentes). Outros custos não foram mensurados, já que foram realizados pelo pesquisador. No ECLIA ainda existem os custos de funcionários, impostos municipais, estaduais e federais, lucro e outros gastos fixos (água, eletricidade, telefone, treino de pessoal e custos administrativos) e que não foram utilizados neste estudo. A comparação econômica das técnicas utilizou apenas as despesas fixas para houvesse uniformidade de dados.

---

## Capítulo 5 – Conclusões

---



O desenvolvimento de técnicas que permitem a identificação de analitos de interesse em amostras biológicas, incluindo o sangue, é um desafio científico que pode auxiliar na detecção de doenças importantes. Os recursos tecnológicos empregados na melhoria do diagnóstico ou rastreamento de pacientes acometidos por alguma moléstia devem estar associados as propriedades dos instrumentos de avaliação, ou seja, as características dos testes devem contribuir para que a equipe de saúde tenha mais subsídios para o tratamento (Goulart & Chiari, 2007). O sucesso destes recursos tecnológicos se deve a escolha correta do melhor método (conduta terapêutica, recursos financeiros empregados, riscos e aceite do método), permitindo que a qualidade de vida do paciente seja preservada. Os diagnósticos errados trazem consequências como perda financeira e humana (Souf, 2016). Os métodos estatísticos para diagnóstico são de grande importância na escolha do melhor tratamento para pacientes, uma vez que permitem ter uma ideia precisa da confiabilidade da técnica em questão. Os testes diagnósticos geram processos probabilísticos que classificam os pacientes em grupos específicos para que sejam gerados o tratamento e o prognóstico (Soares et al., 2017). Por isso a necessidade de avaliar e reconhecer se uma evidência estatística apoia, realmente, uma conclusão apresentada. A avaliação da exatidão de qualquer teste diagnóstico dependente da comparação dos resultados a partir dele obtidos com o verdadeiro estado de cada indivíduo. Assim, para determinar o verdadeiro diagnóstico é preciso que exista um teste, ou conjunto de testes, que atestem uma grande certeza sobre o mesmo. Ao teste que, em determinado momento, tem a maior exatidão na determinação de um diagnóstico dá-se o nome de padrão-ouro, sendo o ECLIA este padrão de referência da determinação da toxoplasmose, foi selecionado para comparação com as técnicas em estudo (Pinho, 2006; Soares et al., 2017).

Em países desenvolvidos, a avaliação tecnológica em saúde funciona em consonância com as diretrizes traçadas para o paciente. No Brasil, a criação de novas tecnologias se baseia em critérios econômicos, explicando a falta de investimentos no setor e a baixa efetividade, eficiência e qualidade dos serviços de saúde no país (Krauss-Silva, 2004). Os crescentes gastos com os serviços de saúde não se refletem, necessariamente, em benefícios que melhorem o atendimento, gestão e tecnologias empregadas. Os gestores em saúde, particularmente no Brasil, têm dificuldades em adotar novas tecnologias, pois as mesmas não estão em consonância com a realidade de algumas localidades. Além disso, falta corpo técnico com habilidades específicas para implementar políticas de avaliação de tecnologias. As avaliações das tecnologias em saúde (ATS) são processos que consideram aspectos de segurança, custo, eficácia, reprodutibilidade, equidade, éticos e culturais, além de uma perspectiva holística de análise, envolvendo a epidemiologia, estatística, física, química, biologia, economia, engenharia e medicina.

As análises das amostras coletadas, de acordo com as análises estatísticas descritas neste trabalho, mostraram que a espectrofotometria Raman pode ser usada como forma alternativa na detecção de imunoglobulinas em plasma sanguíneo. A técnica possui vantagens, tais como: aparelho simples para uso, ocupando menos espaços nos laboratórios, micro amostras sem a necessidade de preparo, já que os espectros do plasma forneceram bons resultados para previsão dos parâmetros estudados, rápido diagnóstico e método não destrutivo para constituintes sanguíneos, tornando-se uma metodologia inovadora para quantificação de variáveis bioquímicas, atendendo as especificações técnicas e podendo ser aplicado como método de rotina. Além disso, as técnicas de espectroscopia Raman são baseadas em tecnologias ópticas, oferecendo vantagens custo-efetivas quando comparada com outras técnicas, como: ressonância magnética, tomografia ou ultrassonografia. As técnicas e aplicações do Raman possuem potencial para diagnósticos médicos por alcançar alta precisão de diagnóstico como confirmado por outros trabalhos descritos nesta tese. Os fluidos medidos pelo Raman forneceram informações morfológicas e químicas, permitindo a identificação de grupos que possuíam ou não as imunoglobulinas de interesse. Com relação a toxoplasmose, o encontro das imunoglobulinas IgG-IgM torna-se muito difícil, uma vez que o IgM tem duração curta (fase aguda), enquanto o IgG possui duração prolongada. A grande quantidade de IgG nos exames se deve ao contato da população com o agente, apresentando quadros subclínicos e/ou memória sorológica, sendo a clínica apenas sugestiva. Analisar os resultados de IgG e IgM de toxoplasmose pode ser uma árdua tarefa, já que o resultado positivo e negativo destas imunoglobulinas não exclui a possibilidade de resultados contrários, pois a doença pode estar em estágio precoce de infecção aguda. Portanto, a realização de amostras paralelas e o histórico do paciente devem ser levados em consideração. A comparação entre os métodos mostrou uma diferença na sensibilidade e especificidade que pode estar relacionada aos antígenos utilizados e os recursos tecnológicos próprios disponíveis. O ECLIA utiliza reagentes antígenos biotinilados e micropartículas de estreptavidina, enquanto que no espectrofotômetro e Raman foi utilizado anticorpos monoespecíficos anti-IgG e anti-IgM.

A espectroscopia FTIR demonstrou ser uma técnica menos precisa, pois houve variação de espectros que pode ter sido ocasionado pela presença de eritrócitos nas amostras sanguíneas (Baker et al., 2015) produzindo falsos positivos/negativos, não possuindo sensibilidade/especificidade igual ou superior ao Raman e ao padrão-ouro. As análises no espectrofotômetro FTIR permitiram concluir que essa técnica tem um tempo mais curto dos espectros possivelmente devido ao princípio da transformada de Fourier, graças a combinação com detectores multicanal, como mencionado em Krafft (2009).

A utilização do Raman demonstrou facilidade na preparação da amostra, bem como o custo, o tamanho e a versatilidade do equipamento necessário para as análises. Outras técnicas para o preparo das amostras precisam de extração ou calcinação, ou ainda podem demandar equipamentos muito caros. Esta técnica tem sido estudada para mostrar suas potencialidades no diagnóstico de analitos de interesse, como: patógenos, componentes sanguíneos, lesões teciduais, alterações a nível celular e molecular. Pesquisas já demonstram a possibilidade de caracterização de soro sanguíneo pelo infravermelho (Gunasekaran & Uthra, 2008).

Com relação ao espectrofotômetro FTIR, acredita-se que a preparação de uma coleção única das frequências encontradas nos estudos espectroscópicos possa levar a melhorias significativas, tanto na quantidade e qualidade da pesquisa quanto em seus resultados. Esta técnica fornece informações exclusivas sobre as mudanças estruturais das moléculas desencadeadas por reações biológicas ocasionadas pelas mudanças que ocorrem durante o ciclo celular normal. A observação dos espectros produzidos pelo espectrofotômetro FTIR pode gerar dificuldades em detectar substâncias que possuem componentes semelhantes, como é o caso do sangue e suas inúmeras substâncias. Contudo, deve ser considerada a sobreposição de espectros entre alguns componentes (Leite, 2008). A literatura apresenta uma base de dados de espectroscopia FTIR que contém os espectros dos componentes que podem ser identificados pela espectroscopia infravermelho, como triglicerídeos e proteínas. O espectrofotômetro FTIR em conjunto com uma análise estatística multivariada tem potencial considerável na identificação de doenças e de disfunções de tecidos, células e biofluidos (Ellis & Goodacre, 2006).

As análises estatísticas conferiram ao Raman um maior potencial devido ao alto conteúdo de informação nos espectros que possibilitará a aplicação mais eficiente em diagnósticos médicos. Mesmo que seja difícil atribuir mudanças espectrais a mudanças ou eventos bioquímicos específicos, essas mudanças refletem o estado bioquímico e a abordagem estatística fornecerá correlações necessárias. A espectroscopia Raman pode ser incorporada como uma ferramenta de controle de qualidade ou de diagnóstico rápido. A natureza não destrutiva da ferramenta espectroscópica seria fundamental, uma vez que tais recursos são extremamente valiosos e sua qualidade é crítica para sua função. Apesar do bom desempenho do Raman, vale destacar que esta técnica não deve substituir, totalmente, as técnicas padrão-ouro, sendo importante o estabelecimento de técnicas complementares para que os métodos pouco invasivos sejam implementados em larga escala, dando aos profissionais de saúde uma grande variedade de métodos de diagnósticos. O Raman é um aparelho versátil e não-destrutivo, gerando informações moleculares sobre as amostras, sendo aplicado em pesquisa e no ambiente clínico.

As técnicas aqui testadas passaram por avaliações econômicas, já que as mesmas devem apresentar eficácia e bom custo-efetividade. É notório que há uma crescente preocupação com os custos no que se refere, tanto aos medicamentos, quanto aos mecanismos de análise. O Raman se apresentou como um aparelho de maior valor econômico, mas superou o espectrofotômetro FTIR na relação custo-efetividade, ou seja, realiza seu papel de forma mais eficiente com custo menor. O presente trabalho faz referência em estudos semelhantes que atestam a eficácia do Raman como método alternativo para identificar analitos de interesse, assim como transformações bioquímicas presentes em amostras biológicas, possuindo considerável semelhança na definição dos picos de áreas específicas dos espectros. Os resultados aqui apresentados enfatizam a importância dos testes sorológicos para o diagnóstico da toxoplasmose em pacientes, principalmente em grávidas. As novas tecnologias médicas e os novos testes de diagnóstico devem ser cuidadosamente avaliados antes da sua introdução na prática diária.

Esta tese evidencia como os novos métodos diagnósticos podem reduzir a quantidade de falso-positivos ou falso-negativos, além de atuar no rastreamento epidemiológico de doenças importantes. As discussões sobre os procedimentos aprimorados podem evitar mais casos de toxoplasmose, principalmente a congênita, por evitar sequelas irreversíveis às crianças. As análises dos métodos se concentram no fato de que um diagnóstico melhor requer avanços tecnológicos e mudança nos serviços médicos, trazendo inovações que possam melhorar a vida das pessoas.

As técnicas que utilizam a espectroscopia são boas ferramentas analíticas e podem ser usadas com sucesso em diagnósticos clínicos de acordo com estudos *in vivo* e *in vitro* para diferentes doenças, devendo ser adotadas tanto em laboratórios clínicos, quanto em laboratórios biomédicos.

A vigilância epidemiológica é necessária para prevenir riscos de infecção e epidemias. Os testes de diagnósticos devem ter precisão para que a gestão em saúde possa traçar medidas de controle da doença.

### **5.1 Propostas de trabalho futuro**

A pesquisa deve ser ampliada, devendo-se testar as diferentes cepas do parasita e verificar conformidade ou possíveis diferenças com as cepas encontradas nesta tese. Outro fator de ampliação da pesquisa deve ser a junção de outras ciências, como por exemplo, a bioinformática, para que o diagnóstico seja medido por softwares apropriados e acoplados aos aparelhos. Pretende-se, a partir desta tese, contribuir para a elaboração de avaliações de métodos de diagnóstico, já que a disponibilidade de estudos primários sobre novas tecnologias é escassa. Avanços no desenvolvimento metodológico-

computacional podem melhorar as análises de soro e sangue para que a acurácia do exame de detecção de analitos de interesse alcance sempre resultados que melhorem a vida dos pacientes. O novo método pode contribuir para medir a prevalência da toxoplasmose e auxiliar os gestores públicos no mapeamento desta doença, seja na infecção adquirida ou na infecção congênita.

Os resultados desta tese abrem novas perspectivas para o diagnóstico da toxoplasmose, propondo uma alternativa para o profissional da área médica diagnosticar o paciente e de implantação de programa de rastreamento de toxoplasmose congênita em âmbito nacional.

A perspectiva é de que o paciente possa realizar seu exame de forma rápida, menos invasiva e, principalmente, com interpretação clínica precisa.

---

## Referencias

---

- Acha, P. N., & Szyfres, B. (1987). *Zoonoses and communicable diseases common to man and animals: Volume I. Bacterioses and mycoses. Pan American Health Organization* (Vol. I).  
<https://doi.org/10.1590/S1135-57272005000300012>
- Ajzenberg, D., Bañuls, A. L., Tibayrenc, M., & Dardé, M. L. (2002). Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. *International Journal for Parasitology*, *32*(1), 27–38. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00301-0](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00301-0)
- Ajzenberg, D., Dumètre, A., & Dardé, M. L. (2005). Multiplex PCR for typing strains of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Clinical Microbiology*, *43*(4), 1940–1943.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.43.4.1940-1943.2005>
- Al-Hussainy, N. H., Al-saedi, A. M., Al-lehaibi, J. H., Al-lehaibi, Y. A., Al-Sehli, Y. M., & Affi, M. A. (2015). Serological evidences link toxoplasmosis with schizophrenia and major depression disorder. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, *3*(3), 148–153.  
<https://doi.org/10.1016/j.jmau.2015.03.006>
- Alexander, J., & Hunter, C. A. (1998). Immunoregulation during toxoplasmosis. *Chemical Immunology*, *70*, 81–102.
- Aliberti, J. (2005). Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. *Nature Reviews. Immunology*, *5*(2), 162–170. <https://doi.org/10.1038/nri1547>
- Alvarado-Esquivel, C., & Estrada-Martínez, S. (2011). *Toxoplasma gondii* infection and abdominal hernia: Evidence of a new association. *Parasites and Vectors*, *4*(1). Retrieved from <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed13&NEWS=N&AN=51485649>
- Alvarado-Esquivel, C., Liesenfeld, O., Estrada-Martínez, S., & Félix-Huerta, J. (2011). *Toxoplasma gondii* infection in workers occupationally exposed to unwashed raw fruits and vegetables: a case control seroprevalence study. *Parasite & Vectors*, *6*(4), 265–9.  
<https://doi.org/10.1093/occmed/kqr032>
- Alvarado-Esquivel, C., Sánchez-Anguiano, L. F., Hernández-Tinoco, J., Ramos-Nevarez, A., Estrada-Martínez, S., Cerrillo-Soto, S. M., ... Beristain-Garcia, I. (2018). Association between *Toxoplasma gondii* infection and history of blood transfusion: a case-control seroprevalence study. *Journal of International Medical Research*, *46*(4), 1626–1633.  
<https://doi.org/10.1177/0300060518757928>
- Alvarado-Esquivel, C., Torres-Berumen, J. L., Estrada-Martínez, S., Liesenfeld, O., & Mercado-Suarez, M. F. (2011). *Toxoplasma gondii* infection and liver disease: A case-control study in a Northern Mexican population. *Parasites and Vectors*, *4*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-75>
- Amato-Neto, V. (1995). *Toxoplasmose* (4ª edição). São Paulo: Sarvier.
- Amendoeira, M. R., Spalding, S. M., Ribeiro, L. C., Silveira, C., Garcia, A. P., & Camillo-Coura, L. (2003). Prospective study of pregnant and babies with risk of congenital toxoplasmosis in municipal district of Rio Grande do Sul. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, *36*(4), 483–491. <https://doi.org/S0037-86822003000400009> [pii]
- Andrade, G. M., Carvalho, A. L., Carvalho, I. R., Mello, B. F., Tibúrcio, F. R., & Castro, F. C. (2001). Toxoplasmose na gestante e no recém-nascido estudo de 86 pares de mãe-filho atendidos no período de 1996-99 no Ambulatório de Infectologia Pediátrica do Hospital das Clínicas -

- Universidade Federal de Minas Gerais. *Revista Médica de Minas Gerais*, 1, 202–207. Retrieved from <http://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/bbo-36240>
- Angelo, M. H. (2003). Legal dispositions and preventive strategies in congenital toxoplasmosis in Portugal. *Legal Dispositions and Preventive Strategies in Congenital Toxoplasmosis in Portugal*, 10 Suppl 1, 25–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12802963>
- Aspöck, H., & Pollak, A. (1992). Prevention of prenatal toxoplasmosis by serological screening of pregnant women in Austria. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases, Supplement*. Retrieved from <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed2&NEWS=N&AN=1993048970>
- Aubert, D., Maine, G. T., Villena, I., Hunt, J. C., Howard, L., Sheu, M., ... Pinon, J. M. (2000). Recombinant antigens to detect *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G and immunoglobulin M in human sera by enzyme immunoassay. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(3), 1144–1150.
- Avelino-Silva, V. L., & Kallás, E. G. (2014). Toxoplasmose em pacientes imunocomprometidos e com AIDS. In *Toxoplasmose & Toxoplasma gondii* (1ª edição, pp. 163–170). Rio de Janeiro: FIOCRUZ.
- Bahia-Oliveira, L. M. G., Abreu, A. M. W., Azevedo-Silva, J., & Oréface, F. (2001). Toxoplasmosis in southeastern Brazil in an alarming situation of highly endemic acquired and congenital infection. *International Journal of Parasitology*, 31, 133–137.
- Baker, M. J., Gazi, E., Brown, M. D., Shanks, J. H., Gardner, P., & Clarke, N. W. (2008). FTIR-based spectroscopic analysis in the identification of clinically aggressive prostate cancer. *British Journal of Cancer*, 99(11), 1859–1866. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604753>
- Baker, M. J., Trevisan, J., Bassan, P., Bhargava, R., & Butler, H. J. (2015). Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. *Nature Protocols*, 9(8), 1771–1791. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.110>.Using
- Baranov, A. N., Vlasova, I. M., & Saletsky, A. M. (2004). Investigation of ischemia damaging action on blood serum by Raman spectroscopy method. *Laser Physics Letters*, 1(11), 555–559. <https://doi.org/10.1002/lapl.200410124>
- Barbosa, H. S., Munoz, R. M. de, & Moura, M. de A. (2014). O ciclo evolutivo. In 1ª edição (Ed.), *Toxoplasmose & Toxoplasma gondii* (1ª edição, pp. 33–45). Rio de Janeiro: FIOCRUZ.
- Barbosa, I. R., de Carvalho Xavier Holanda, C. M., & de Andrade-Neto, V. F. (2009). Toxoplasmosis screening and risk factors amongst pregnant females in Natal, northeastern Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103(4), 377–382. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.11.025>
- Başar, G., Parlatan, U., Şeninal, Ş., Günel, T., Benian, A., & Kaleliolu, I. (2012). Investigation of preeclampsia using Raman spectroscopy. *Spectroscopy (New York)*, 27(4), 239–252. <https://doi.org/10.1155/2012/376793>
- Bastien, P. (2002). Molecular diagnosis of toxoplasmosis. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96, 205–215. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-227-8\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-227-8_3)
- Batz, M. B., Hoffmann, S., & Morris Jr, J. G. (2011). Ranking the risks: The 10 pathogen-food combinations with the greatest burden on public health. University of Florida.



- Bazar, G., Eles, V., Kovacs, Z., Romvari, R., & Szabo, A. (2016). Multicomponent blood lipid analysis by means of near infrared spectroscopy, in geese. *Talanta*, *155*, 202–211. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.04.039>
- Beazley, D. M., & Egerman, R. S. (1998). Toxoplasmosis. *Seminars in Perinatology*, *22*(4), 332–338.
- Beck, S. T., Konopka, C. K., Silva, A. K., & Diehl, F. P. (2010). Importância do Rastreamento Sorológico da Toxoplasmose Gestantes Atendidas em ambulatório De Pré-Natal De Alto Risco. *Revista Saúde*, *36*(1), 29–36.
- Benevides, J. M., Overman, S. A., & Thomas Jr, G. J. (1986). Raman Spectroscopy of proteins.
- Benezzedine-Boussaidi, L., Cazorla, G., & Melin, A. M. (2009). Validation for quantification of immunoglobulins by Fourier transform infrared spectrometry. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2009.007>
- Berdoy, M., Webster, J. P., & Macdonald, D. W. (2000). Fatal attraction in rats infected with *Toxoplasma gondii*. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, *267*(1452), 1591–1594. <https://doi.org/10.1098/rspb.2000.1182>
- Berger, A. J., Koo, T.-W., Itzkan, I., Horowitz, G., & Feld, M. S. (1999). Multicomponent blood analysis by near-infrared Raman spectroscopy. *Applied Optics*, *38*(13), 2916. <https://doi.org/10.1364/AO.38.002916>
- Bergholt, M. S., & Hassing, S. (2009). Quantification of C-Reactive protein in human blood plasma using near-infrared Raman spectroscopy. *The Analyst*. <https://doi.org/10.1039/b903089a>
- Bergholt, M. S., Zheng, W., Ho, K. Y., Teh, M., Yeoh, K. G., Yan So, J. B., ... Huang, Z. (2014). Fiberoptic confocal raman spectroscopy for real-time in vivo diagnosis of dysplasia in Barrett's esophagus. *Gastroenterology*, *146*(1), 27–32. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.11.002>
- Beverly, J. K. A. (1973). A New Look at Infectious Diseases. *British Medical Journal*, *2*(5864), 475–478.
- Bichara, C. C., Andrade, G. M. Q. de, & Lago, E. G. (2014). Toxoplasmose congênita. In *Toxoplasmose & Toxoplasma gondii* (1ª edição, pp. 137–155). Rio de Janeiro: FIOCRUZ.
- Bilal, M., Saleem, M., Amanat, S. T., Shakoor, H. A., Rashid, R., Mahmood, A., & Ahmed, M. (2015). Optical diagnosis of malaria infection in human plasma using Raman spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*, *20*(1), 017002. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.20.1.017002>
- Bilal, M., Saleem, M., Bilal, M., Ijaz, T., Khan, S., Ullah, R., ... Ahmed, M. Raman spectroscopy-based screening of IgM positive and negative sera for dengue virus infection, *26 Laser Physics* § (2016). <https://doi.org/10.1088/1054-660X/26/11/115602>
- Birech, Z., Mwangi, P. W., Bukachi, F., & Mandela, K. M. (2017). Application of Raman spectroscopy in type 2 diabetes screening in blood using leucine and isoleucine amino-acids as biomarkers and in comparative anti-diabetic drugs efficacy studies. *PLoS ONE*, *12*(9), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185130>
- Bitar, R. A. (2009). *Espectroscopia micro-raman aplicada para o diagnóstico do melanoma cutâneo. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Programa de Pós-graduação em Cirurgia Plástica.*
- Bobic, B., Klun, I., Vujanic, M., Nikolic, A., Ivovic, V., Zivkovic, T., & Djurkovic-Djakovic, O. (2009). Comparative evaluation of three commercial *Toxoplasma*-specific IgG antibody avidity tests and significance in different clinical settings. *Journal of Medical Microbiology*, *58*(Pt 3), 358–364.

- <https://doi.org/10.1099/jmm.0.006668-0>
- Bodanese, B. (2008). *Espectroscopia Raman Dispersiva no Diagnóstico de Carcinomas Basocelulares*. Universidade Vale do Paraíba - dissertação de mestrado.
- Bohne, W., Gross, U., Ferguson, D. J., & Heesemann, J. (1995). Cloning and characterization of a bradyzoite-specifically expressed gene (hsp30/bag1) of *Toxoplasma gondii*, related to genes encoding small heat-shock proteins of plants. *Molecular Microbiology*. Retrieved from [http://search.proquest.com/docview/77565831?accountid=14701%5Cnhttp://sfx.scholarsportal.info/ottawa?url\\_ver=Z39.88-2004&rft\\_val\\_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:journal&genre=article&sid=ProQ:ProQ%3Amedlineshell&attle=Cloning+and+characterization+of+a+bradyzoit](http://search.proquest.com/docview/77565831?accountid=14701%5Cnhttp://sfx.scholarsportal.info/ottawa?url_ver=Z39.88-2004&rft_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:journal&genre=article&sid=ProQ:ProQ%3Amedlineshell&attle=Cloning+and+characterization+of+a+bradyzoit)
- Bonametti, A. M., Passos, J. N., da Silva, E. M., & Bortoliero, A. L. (1997). Surto de toxoplasmose aguda transmitida através da ingestão de carne crua de gado ovino. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, *30*(1), 21–25. <https://doi.org/10.1590/S0037-86821997000100005>
- Bonifacio, A., Finaurini, S., Krafft, C., Parapini, S., Taramelli, D., & Sergio, V. (2008). Spatial distribution of heme species in erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum* by use of resonance Raman imaging and multivariate analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *392*(7–8), 1277–1282. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2414-0>
- Bonnier, F., Rubin, S., Ventéo, L., Krishna, C. M., Pluot, M., Baehrel, B., ... Sockalingum, G. D. (2006). In-vitro analysis of normal and aneurismal human ascending aortic tissues using FT-IR microspectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1758*(7), 968–973. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.05.018>
- Boothroyd, J. C. (2009). *Toxoplasma gondii*: 25 years and 25 major advances for the field. *International Journal for Parasitology*. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.02.003>
- Borges, A. S., Fonseca, A. M., & Ferreira, M. . (1997). Anticorpos anti *T. gondii* nos doadores de sangue do Hemocentro Regional de Uberlândia, MG, Brazil. *Journal of Infectious Diseases*.
- Boskey, A., & Mendelsohn, R. (2005). Infrared analysis of bone in health and disease. *Journal of Biomedical Optics*. <https://doi.org/10.1117/1.1922927>
- Bouratbine, A., Siala, E., Chahed, M. K., Aoun, K., & Ben Ismail, R. (2001). Profil séro-épidémiologique de la toxoplasmose au nord de la tunisie. *Parasite Journal*, *8*(1), 61–66.
- Bowie, W. R., King, A. S., Werker, D. H., Isaac-Renton, J. L., Bell, A., Eng, S. B., & Marion, S. A. (1997). Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water for the BC *Toxoplasma* Investigation Team. *Lancet*, *350*, 173–77. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)11105-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)11105-3)
- Boyer, K. M., Holfels, E., Roizen, N., Swisher, C., Mack, D., Remington, J., ... McLeod, R. (2005). Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in mothers of infants with congenital toxoplasmosis: Implications for prenatal management and screening. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *192*(2), 564–571. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2004.07.031>
- Boyle, J. P., Rajasekar, B., Saeij, J. P. J., Ajioka, J. W., Berriman, M., Paulsen, I., ... Boothroyd, J. C. (2006). Just one cross appears capable of dramatically altering the population biology of a eukaryotic pathogen like *Toxoplasma gondii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(27), 10514–10519. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510319103>
- Braga, A. C., & Carneiro, P. (2016). Development and Validation of a Logistic Regression Model to

- Estimate the Risk of WMSDs in Portuguese Home Care Nurses. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-42085-1\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-42085-1_8)
- Brazhe, N. A., Thomsen, K., Lønstrup, M., Brazhe, A. R., Nikelshparg, E. I., Maksimov, G. V., ... Sosnovtseva, O. (2018). Monitoring of blood oxygenation in brain by resonance Raman spectroscopy. *Journal of Biophotonics*.
- Budínová, G., Salva, J., & Volka, K. (1997). Application of molecular spectroscopy in the mid-infrared region to the determination of glucose and cholesterol in whole blood and in blood serum. *Applied Spectroscopy*. <https://doi.org/10.1366/0003702971941034>
- Buffolano, W. (2003). Failure to implement a preventive strategy against congenital toxoplasmosis in Italy. *Arch Pediatr*, 10, 21–22.
- Butler, H. J., Ashton, L., Bird, B., Cinque, G., Curtis, K., Dorney, J., ... Martin, F. L. (2016). Using Raman spectroscopy to characterize biological materials. *Nature Protocols*, 11, 664–687. Retrieved from <http://www.nature.com/nprot/journal/v11/n4/abs/nprot.2016.036.html>
- Buzby, J. C., & Roberts, T. (1997). ERS updates U.S. foodborne disease costs for seven pathogens. *FoodReview*, 19(3), 20–25.
- Cademartori, B. G. (2007). *Toxoplasmose: Perfil sorológico em gestantes atendidas em Postos de Saúde do Município de Pelotas-RS*. Universidade Federal de Pelotas - Programa de Pós-Graduação em Parasitologia. Universidade Federal de Pelotas.
- Camargo, M. E., Moura, M. E., & Leser, P. G. (1989). Toxoplasmosis serology: an efficient hemagglutination procedure to detect IgG and IgM antibodies. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 31(4), 279–285.
- 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. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 58(1), 83–88. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2006.12.010>
- Cañete, P. G. (2010). Marilena Canales R ., Felipe Navia G ., Marisa Torres H ., Mónica Concha C ., Ana M Guzmán D ., Carlos Pérez C . y Patricia García C . Artículo Original Correspondencia a : Artículo Original, 27(6), 499–504.
- Cantos, G. a., Prando, M. D., Siqueira, M. V., & Teixeira, R. M. (2000). Toxoplasmose: ocorrência de anticorpos antitoxoplasma gondii e diagnóstico. *Revista Da Associação Médica Brasileira*, 46, 335–341. <https://doi.org/10.1590/S0104-42302000000400033>
- Carneiro, A. C. A. V. (2011). *Caracterização molecular de isolados de Toxoplasma gondii obtidos de crianças com toxoplasmose congênita no Estado de Minas Gerais*. Universidade Federal de Minas Gerais.
- Carruthers, V. B., & Suzuki, Y. (2007). Effects of Toxoplasma gondii infection on the brain. *Schizophrenia Bulletin*. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbm008>
- Carvalho, C. M. C. N., & Farhat, C. K. (1999). Toxoplasmose adquirida. *Jornal de Pediatria*, 75(Supl 1), S63.
- Carvalho, C. S. (2012). *Avaliação de doenças reumáticas por espectroscopia óptica*. UNIVASP.
- Carvalho, C. S., Raniero, L., Santo, A. M. E., Pinheiro, M., Andrade, L. E. . ., Cardoso, M. A. G., ... Martin, A. A. (2004). Comparação de soro entre portadores de artrite reumatóide e doadores saudáveis por espectroscopia óptica. São José dos Campos: XIII Encontro Latino Americano de

- Iniciação Científica e IX Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba.
- Castilho-Pellosso, M. P., Morais Falavigna, D. L., De Araújo, S. M., & Falavigna-Guilherme, A. L. (2005). Monitoramento de gestantes com toxoplasmose em serviços públicos de saúde. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, *38*(6), 532–533. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822005000600018>
- Cavalcante, A. C. R., Ferreira, A. M., Melo, M. N., Fux, B., Brandão, G. P., & Vitor, R. W. A. (2007). Virulence and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolated from goats in Ceará, Brazil. *Small Ruminant Research*. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.12.023>
- Chaber, R., Łach, K., Szmuc, K., Michalak, E., Raciborska, A., Mazur, D., ... Cebulski, J. (2017). Application of infrared spectroscopy in the identification of Ewing sarcoma: A preliminary report. *Infrared Physics and Technology*, *83*, 200–205. <https://doi.org/10.1016/j.infrared.2017.05.006>
- Chan, J. W., Lieu, D., Huser, T., & Li, R. (2009). Label-free separation of human embryonic stem cells (hESCs) and their cardiac derivatives using Raman spectroscopy. *Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/ac801665m.Label-free>
- Chandramukhi, A. (2004). Diagnosis of neurotoxoplasmosis by antibody detection in cerebrospinal (CSF) fluid using Latex Agglutination Test and ELISA. *Journal of Communicable Diseases*.
- Chaudhry, S. A., Gad, N., & Koren, G. (2014). Toxoplasmosis and pregnancy. *Canadian Family Physician*, *60*(4), 334–336. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0705.1991.01040233-2.x>
- Chen, F., Flaherty, B. R., Cohen, C. E., Peterson, D. S., & Zhao, Y. (2016). Direct detection of malaria infected red blood cells by surface enhanced Raman spectroscopy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, *12*(6), 1445–1451. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.03.001>
- Chesne, S., Rondeau, P., Armenta, S., & Bourdon, E. (2006). Effects of oxidative modifications induced by the glycation of bovine serum albumin on its structure and on cultured adipose cells. *Biochimie*, *88*(10), 1467–1477. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.05.011>
- Choo-Smith, L.-P., Edwards, H. G. M., Endtz, H. P., Kros, J. M., Heule, F., Barr, H., ... Puppels, G. J. (2002). Medical applications of Raman spectroscopy: From proof of principle to clinical implementation. *Biopolymers*, *67*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1002/bip.10064>
- Coccaro, E. F., Lee, R., Groer, M. W., Can, A., Coussons-Read, M., & Postolache, T. T. (2016). *Toxoplasma gondii* infection: Relationship with aggression in psychiatric subjects. *Journal of Clinical Psychiatry*, *77*(3), 334–341. <https://doi.org/10.4088/JCP.14m09621>
- Coêlho, R. A. L., Kobayashi, M., & Jr, L. B. C. (2003). Brief communication prevalence of igg antibodies specific to *Toxoplasma gondii* among blood donors in Recife , Northeast Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, *45*(4), 229–231. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652003000400011>
- Colagar, A. H., Chaichi, M. J., & Khadjvand, T. (2011). Fourier transform infrared microspectroscopy as a diagnostic tool for distinguishing between normal and malignant human gastric tissue. *Journal of Biosciences*, *36*(4), 669–677. <https://doi.org/10.1007/s12038-011-9090-5>
- Collier, S. A., Stockman, L. J., Hicks, L. A., Garrison, L. E., Zhou, F. J., Beach, J., ... Diseases, R. (2015). Direct healthcare costs of selected diseases primarily or partially transmitted by water. *HHS Public Access*, *14*(11), 2003–2013. <https://doi.org/10.1017/S0950268811002858.Direct>

- Conde de Felipe, M. M., Molina, J. M., Rodríguez-Ponce, E., Ruiz, A., & González, J. F. (2007). IGM and IGG Response to 29–35-kDa *Toxoplasma gondii* Protein Fractions in Experimentally Infected Goats. *Journal of Parasitology*, *93*(3), 701–703. <https://doi.org/10.1645/GE-993R.1>
- Cook, A. J., Gilbert, R. E., Buffolano, W., Zufferey, J., Petersen, E., Jenum, P. A., ... Dunn, D. T. (2000). Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, *321*(7254), 142–147. <https://doi.org/10.1136/bmj.321.7254.142>
- Cook, T. B., Brenner, L. A., Cloninger, R. C., Langenberg, P., Igbide, A., Giegling, I., ... Postolache, T. T. (2015). “Latent” infection with *Toxoplasma gondii*: Association with trait aggression and impulsivity in healthy adults. *Journal of Psychiatric Research*, *60*, 87–94.
- Cortina-Borja, M., Tan, H. K., Wallon, M., Paul, M., Prusa, A., Buffolano, W., ... Gilbert, R. E. (2010). Prenatal treatment for serious neurological sequelae of congenital toxoplasmosis: An observational prospective cohort study. *PLoS Medicine*, *7*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000351>
- Cristina, N., Dardé, M. L., Boudin, C., Tavernier, G., Pestre-Alexandre, M., & Ambroise-Thomas, P. (1995). A DNA fingerprinting method for individual characterization of *Toxoplasma gondii* strains: combination with isoenzymatic characters for determination of linkage groups. *Parasitology Research*, *81*(1), 32–37. <https://doi.org/10.1007/BF00932414>
- Cristo, A. K. (2005). Diagnóstico molecular da toxoplasmose : revisão. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, *41*(4), 229–235.
- Crow, P., Stone, N., Kendall, C. A., Uff, J. S., Farmer, J. A. M., Barr, H., & Wright, M. P. J. (2003). The use of Raman spectroscopy to identify and grade prostatic adenocarcinoma in vitro. *British Journal of Cancer*, *89*(1), 106–108. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601059>
- Da Silva, E. N., Galvão, T. F., Pereira, M. G., & Silva, M. T. (2014). Economic evaluation of health technologies: Checklist for critical analysis of published articles . *Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health*, *35*(3), 219–227. Retrieved from <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84902213874&partnerID=40&md5=6b768a155a786bce6bf8662d3e40fa7e>
- Daffos, F., Forestier, F., Capella-Pavlovsky, M., Thulliez, P., Aufrant, C., Valenti, D., & Cox, W. L. (1988). Prenatal Management of 746 Pregnancies at Risk for Congenital Toxoplasmosis. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJM198802043180502>
- Dard, C., Fricker-Hidalgo, H., Brenier-Pinchart, M. P., & Pelloux, H. (2016). Relevance of and New Developments in Serology for Toxoplasmosis. *Trends in Parasitology*, *32*(6), 492–506. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.04.001>
- Dardé, M. L. (1996). Biodiversity in *Toxoplasma gondii*. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, *219*, 27–41.
- Déléris, G., & Petibois, C. (2003). Applications of FT-IR spectrometry to plasma contents analysis and monitoring. *Vibrational Spectroscopy*, *32*(1), 129–136. [https://doi.org/10.1016/S0924-2031\(03\)00053-5](https://doi.org/10.1016/S0924-2031(03)00053-5)
- Demar, M., Aizenberg, D., Maubon, D., Djossou, F., Panchoe, D., Punwasi, W., ... Carme, B. (2007). Fatal Outbreak of Human Toxoplasmosis along the Maroni River: Epidemiological, Clinical, and Parasitological Aspects. *Clinical Infectious Diseases*, *45*(7), e88–e95. <https://doi.org/10.1086/521246>
- Denbigh, J. L., Perez-Guaita, D., Vernooij, R. R., Tobin, M. J., Bambery, K. R., Xu, Y., ... Wood, B. R.

- (2017). Probing the action of a novel anti-leukaemic drug therapy at the single cell level using modern vibrational spectroscopy techniques. *Scientific Reports*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02069-5>
- Denkers, E. Y., & Marshall, A. J. (1998). Toxoplasma gondii Triggers Granulocyte-Dependent Cytokine-Mediated Lethal Shock in D-Galactosamine-Sensitized Mice. *Infection and Immunity*, 66(4), 1325–1333.
- Depciuch, J., Sowa-Kucma, M., Nowak, G., Dudek, D., Siwek, M., Stycze??, K., & Parli??ska-Wojtan, M. (2016). Phospholipid-protein balance in affective disorders: Analysis of human blood serum using Raman and FTIR spectroscopy. A pilot study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 131, 287–296. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.08.037>
- Dercksen, D. P., Brinkhof, J. M. A., Dekker-Nooren, T., Maanen, K. Van, Bode, C. F., Baird, G., & Kamp, E. M. (2000). A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Veterinary Microbiology*, 75(2), 167–175. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00217-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00217-0)
- Derouin, F., & Pelloux, H. (2008). Prevention of toxoplasmosis in transplant patients. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(12), 1089–1101. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02091.x>
- Deshpande, P. S., Kotresha, D., Noordin, R., Yunus, M. H., Saadatnia, G., Golkar, M., ... Ghaffarifar, F. (2013). IgG avidity western blot using toxoplasma gondii rgra-7 cloned from nucleotides 39-711 for serodiagnosis of acute toxoplasmosis. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 55(2), 79–83. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652013000200003>
- Desmonts, G., & Couvreur, J. (1974). Congenital toxoplasmosis. A prospective study of 378 pregnancies. *The New England Journal of Medicine*, 290, 1110–1116.
- Dias, R. A. F. R. C. F., Lopes-Mori, F. M. R., Mitsuka-Breganó, R., Dias, R. A. F. R. C. F., Tokano, D. V., Reiche, E. M. V., ... Navarro, I. T. (2011). Fatores associados à infecção por Toxoplasma gondii em gestantes atendidas nas Unidades Básicas de Saúde do Município de Rolândia, Paraná, Brasil. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 53(4), 185–191. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652011000400002>
- Dickerson, F., Stallings, C., Origoni, A., Katsafanas, E., Schweinfurth, L., Savage, C., ... Yolken, R. (2014). Antibodies to Toxoplasma gondii and Cognitive Functioning in Schizophrenia, Bipolar Disorder, and Nonpsychiatric Controls. *The Journal of Nervous and Mental Disease*, 202(8), 589–93. <https://doi.org/10.1097/NMD.0000000000000166>
- Dina, N. E., Colniță, A., Leopold, N., & Haisch, C. (2017). Rapid Single-cell Detection and Identification of Bacteria by Using Surface-enhanced Raman Spectroscopy. *Procedia Technology*, 27, 203–207. <https://doi.org/10.1016/j.protcy.2017.04.086>
- Downes, A. (2011). Raman spectroscopy and CARS microscopy of stem cells and their derivatives. *Journal of Raman Spectroscopy*, 42, 1864–1870.
- Driskell, J. D., Uhlenkamp, J. M., Lipert, R. J., & Porter, M. D. (2007). Surface-enhanced Raman scattering immunoassays using a rotated capture substrate. *Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/ac0701031>
- Duarte, J., Pacheco, M. T. T., Villaverde, A. B., Machado, R. Z., Zangaro, R. a, & Silveira, L. (2013). Near-infrared Raman spectroscopy to detect anti-Toxoplasma gondii antibody in blood sera of domestic cats: quantitative analysis based on partial least-squares multivariate statistics. *Journal*

- of Biomedical Optics*, 15(4), 047002. <https://doi.org/10.1117/1.3463006>
- Dubey, J. P. (1980). Persistence of encysted *Toxoplasma gondii* in caprine livers and public health significance of toxoplasmosis in goats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*.
- Dubey, J. P. (1986). Toxoplasmosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 189(2), 166–170.
- Dubey, J. P. (1994). Toxoplasmosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 205(11), 1593–1598.
- Dubey, J. P. (1996). *Toxoplasma Gondii*. In *Medical Microbiology*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21413265>
- Dubey, J. P. (1998). Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, 28(7), 1019–1024. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(98\)00023-X](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00023-X)
- Dubey, J. P. (2009a). History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, 39(8), 877–882. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.01.005>
- Dubey, J. P. (2009b). Toxoplasmosis in sheep-The last 20 years. *Veterinary Parasitology*, 163(1–2), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.02.026>
- Dubey, J. P. (2010). *Toxoplasmosis of Animals and Humans* (Second edi). <https://doi.org/10.1201/9781420092370>
- Dubey, J. P., & Beattie, C. P. (1988). *Toxoplasmosis of animals and man*. CRC Press (Vol. 100). Boca Raton. <https://doi.org/https://doi.org/10.1017/S0031182000078914>
- Dubey, J. P., & Foreyt, W. J. (2000). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Rocky Mountain bighorn sheep (*Ovis canadensis*). *The Journal of Parasitology*, 86(3), 622–3. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2000\)086\[0622:SOTGIR\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2000)086[0622:SOTGIR]2.0.CO;2)
- Dubey, J. P., & Frenkel, J. K. (1998). Toxoplasmosis of rats: A review, with considerations of their value as an animal model and their possible role in epidemiology. *Veterinary Parasitology*. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(97\)00227-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(97)00227-6)
- Dubey, J. P., Lago, E. G., Gennari, S. M., Su, C., & Jones, J. L. (2012). Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil : high prevalence , high burden of disease , and epidemiology †. *Parasitol*. <https://doi.org/10.1017/S0031182012000765>
- Dubey, J. P., Lindsay, D. S., & Speer, C. A. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clinical Microbiology Reviews*, 11, 267–299.
- Dubey, J. P., Lunney, J. K., Shen, S. K., Kwok, O. C. H., Ashford, D. A., & Thulliez, P. (1996). Infectivity of Low Numbers of *Toxoplasma gondii* Oocysts to Pigs. *The Journal of Parasitology*. <https://doi.org/10.2307/3284082>
- Dubey, J. P., Miller, N. L., & Frenkel, J. K. (1970). The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. *The Journal of Experimental Medicine*, 132(4), 636–662. <https://doi.org/10.1084/jem.132.4.636>
- Dubey, J. P., Murrel, K. D., & Fayer, R. (1984). Persistence of encysted *T. gondii* in tissues of pigs fed oocysts. *American Journal of Veterinary Research*, 45, 1941–1943.
- Dubey, J. P., Thulliez, P., & Powell, E. C. (1995). *Toxoplasma gondii* in Iowa sows: comparison of antibody titers to isolation of *T. gondii* by bioassays in mice and cats. *The Journal of Parasitology*. <https://doi.org/10.2307/3284004>

- Dubey, J. P., Velmurugan, G. V., Alvarado-Esquivel, C., Alvarado-Esquivel, D., Rodríguez-Peña, S., Martínez-García, S., ... Su, C. (2009). Isolation of *Toxoplasma gondii* from animals in Durango, Mexico. *The Journal of Parasitology*, *95*(2), 319–22. <https://doi.org/10.1645/GE-1874.1>
- Duffy, A. R. (2013). Relationship Between Dysphoric Moods, Risk-Taking Behaviors, and *Toxoplasma gondii* Antibody Titers in Female Veterans. *Relationship Between Dysphoric Moods, Risk-Taking Behaviors & Toxoplasma Gondii Antibody Titers in Female Veterans*, (January), 93 p-93 p 1p. Retrieved from <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=ip&db=c8h&AN=109863248&site=ehost-live>
- Duffy, K. T., Wharton, P. J., Johnson, J. D., New, L., & Holliman, R. E. (1989). Assessment of immunoglobulin-M immunosorbent agglutination assay (ISAGA) for detecting toxoplasma specific IgM. *Journal of Clinical Pathology*, *42*(12), 1291–1295. <https://doi.org/10.1136/jcp.42.12.1291>
- Dunn, D., Wallon, M., Peyron, F., Petersen, E., Peckham, C., & Gibert, R. (1999). Mother to child transmission of toxoplasmosis risk estimates for clinical counselling. *Lancet*, *29*(353), 1829–1833.
- Dupont, C. D., Christian, D. A., Selleck, E. M., Pepper, M., Leney-Greene, M., Harms Pritchard, G., ... Hunter, C. A. (2014). Parasite Fate and Involvement of Infected Cells in the Induction of CD4+ and CD8+ T Cell Responses to *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathogens*, *10*(4), e1004047. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004047>
- Dzierszynski, F., Mortuaire, M., Cesbron-Delauw, M. F., & Tomavo, S. (2000). Targeted disruption of the glycosylphosphatidylinositol-anchored surface antigen SAG3 gene in *Toxoplasma gondii* decreases host cell adhesion and drastically reduces virulence in mice. *Molecular Microbiology*, *37*(3), 574–582. <https://doi.org/mmi2014> [pii]
- Ebrahimzadeh, A., Shahraki, M. K., & Mohammadi, A. (2018). Serological and molecular diagnosis of *Toxoplasma gondii* in patients with schizophrenia. *Journal of Parasitic Diseases*, *42*(2), 177–181. <https://doi.org/10.1007/s12639-018-0979-x>
- EFSA, & ECDC. (2018). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5500>
- Ellis, D. I., & Goodacre, R. (2006). Metabolic fingerprinting in disease diagnosis: biomedical applications of infrared and Raman spectroscopy. *The Analyst*, *131*(i), 875–885. <https://doi.org/10.1039/b602376m>
- Ember, K. J. I., Hoeve, M. A., McAughtrie, S. L., Bergholt, M. S., Dwyer, B. J., Stevens, M. M., ... Campbell, C. J. (2017). Raman spectroscopy and regenerative medicine: a review. *Npj Regenerative Medicine*, *2*(1), 12. <https://doi.org/10.1038/s41536-017-0014-3>
- 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*(1), 66. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-5-66>
- Erukhimovitch, V., Talyshinsky, M., Souprun, Y., & Huleihel, M. (2006). FTIR spectroscopy examination of leukemia patients plasma. *Vibrational Spectroscopy*. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2005.06.004>
- Espinosa-Mansilla, A., Muñoz De La Peña, A., Cañada-Cañada, F., & González Gómez, D. (2005). Determinations of fluoroquinolones and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in urine by extractive spectrophotometry and photoinduced spectrofluorimetry using multivariate calibration. *Analytical*



- Biochemistry*, 347(2), 275–286. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.09.032>
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2018). Annual epidemiological report for 2015. Stockholm. Retrieved from [http://ecdc.europa.eu/en/publications/surveillance\\_reports/annual\\_epidemiological\\_report/Pages/epi\\_index.aspx#sthash.oeOLX1mU.dpuf](http://ecdc.europa.eu/en/publications/surveillance_reports/annual_epidemiological_report/Pages/epi_index.aspx#sthash.oeOLX1mU.dpuf)
- Evans, C. L., Potma, E. O., Puoris'haag, M., Côté, D., Lin, C. P., & Xie, X. S. (2005). Chemical imaging of tissue in vivo with video-rate coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(46), 16807–16812. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508282102>
- Fallahi, S., Rostami, A., Birjandi, M., Zebardast, N., Kheirandish, F., & Spotin, A. (2017). Parkinson's disease and *Toxoplasma gondii* infection: Sero-molecular assess the possible link among patients. *Acta Tropica*, 173(November 2016), 97–101. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.06.002>
- Feng, S., Chen, R., Lin, J., Pan, J., Chen, G., Li, Y., ... Zeng Haishan, H. (2010). Nasopharyngeal cancer detection based on blood plasma surface-enhanced Raman spectroscopy and multivariate analysis. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(11), 2414–2419. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.03.033>
- Feng, S., Wang, W., Tai, I. T., Chen, G., Chen, R., & Zeng, H. (2015). Label-free surface-enhanced Raman spectroscopy for detection of colorectal cancer and precursor lesions using blood plasma. *Biomedical Optics Express*, 6(9), 3494. <https://doi.org/10.1364/BOE.6.003494>
- Ferguson, D. J. P. (2009). *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(2), 133–148. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000200003>
- Ferreira, A. de M., Vitor, R. W. A., Gazzinelli, R. T., & Melo, M. N. (2006). Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. *Infection, Genetics and Evolution*. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2004.12.004>
- Ferreira, A. de M., & Vitor, R. W. de A. (2014). Aspectos Taxonômicos e evolutivos. In *Toxoplasmose & Toxoplasma gondii* (1ª edição, pp. 21–31). Rio de Janeiro.
- Ferreira, A. M., Vitor, R. W., Carneiro, A. C. A. V., Brandão, G. P., & Melo, M. . (2004). Genetic variability of Brazilian *Toxoplasma gondii* strains detected by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR) and simple sequence repeat anchored-PCR (SSR-PCR). *Infection, Genetics and Evolution*, 4(02), 131–142.
- Ferreira, A. W., & Moraes, S. do L. (2013). *Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e autoimunes: correlações clínico-laboratoriais* (3rd ed.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Flannery, J. (2014). *Applications of Raman Spectroscopy*. University of Waterloo.
- Flegr, J. (2013). Influence of latent *Toxoplasma* infection on human personality, physiology and morphology: pros and cons of the *Toxoplasma*-human model in studying the manipulation hypothesis. *The Journal of Experimental Biology*, 216, 127–33. <https://doi.org/10.1242/jeb.073635>
- Fond, G., Capdevielle, D., Macgregor, A., Attal, J., Larue, A., Brittner, M., ... Boulenger, J.-P. (2013). [*Toxoplasma gondii*: a potential role in the genesis of psychiatric disorders]. *L'Encéphale*, 39(1), 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.encep.2012.06.014>

- Frenkel, J. K. (1971). Toxoplasmosis: mechanisms of infection, laboratory diagnosis and management. In *Current Topics in Pathology* (Vol. 50, pp. 29–75).
- Frenkel, J. K., Dubey, J. P., & Miller, N. L. (1970). Toxoplasma gondii in Cats: Fecal Stages Identified as Coccidian Oocysts. *Science*, *167*(3919), 893–896. <https://doi.org/10.1126/science.167.3919.893>
- Frenkel, J. K., Hassanein, K. M., Hassanein, R. S., Brown, E., Thulliez, P., & Quintero- Nunez, R. (1995). Transmission of Toxoplasma gondii in Panama City, Panama: A five-year prospective cohort study of children, cats, rodents, birds, and soil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1995.53.458>
- Freyre, A., Bonino, J., Falcon, J., Castells, D., Correa, O., & Casaretto, A. (1999). The incidence and economic significance of ovine toxoplasmosis in Uruguay. *Veterinary Parasitology*. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(98\)00215-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(98)00215-5)
- FUNASA - Fundação Nacional de Saúde. (2002). Surto de Toxoplasmose no Município de Santa Isabel do Ivaí - Paraná. *Boletim Epidemiológico - FUNASA*.
- Gajjar, K., Heppenstall, L. D., Pang, W., Ashton, K. M., Trevisan, J., Patel, I. I., ... Martin, F. L. (2013). Diagnostic segregation of human brain tumours using Fourier-transform infrared and/or Raman spectroscopy coupled with discriminant analysis. *Analytical Methods*, *5*(1), 89–102. <https://doi.org/10.1039/c2ay25544h>
- Galván-Ramírez, M. de la L., & Mondragón-Flores, R. (2017). *Toxoplasmosis humana. ECORFAN* (Primera Ed). Guadalajara.
- Garcia Bahia-Oliveira, L. M. G., J., J. L., Azevedo-Silva, J., Alves, C. C. F., Oréfice, F., & Addiss, D. G. (2003). Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in North Rio de Janeiro State, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, *9*(1), 55–62. <https://doi.org/10.3201/eid0901.020160>
- Gargaté, M. J., Ferreira, I., Vilares, A., Martins, S., Cardoso, C., Silva, S., ... Gomes, J. P. (2016). Toxoplasma gondii seroprevalence in the Portuguese population: comparison of three cross-sectional studies spanning three decades. *BMJ Open*, *6*(10), e011648. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2016-011648>
- Garweg, J. G. (2005). Determinants of immunodiagnostic success in human ocular toxoplasmosis. *Parasite Immunology*, *27*(3), 61–68. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2005.00747.x>
- Germano, P. M. L. (1985). Serological survey of toxoplasmosis in dogs with the Indirect Immunofluorescence test in Campinas city. *Revista Da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Da USP*, *22*(1), 53–58.
- Gharavi, M. J., Oormazdi, H., & Roointan, E. S. (2008). A comparative study on sensitivity and specificity of conventional and unconventional IgG and IgM assays for diagnosis of toxoplasmosis. *Iranian Journal of Public Health*, *37*(4), 42–45.
- Ghimire, H., Venkataramani, M., Bian, Z., Liu, Y., & Perera, A. G. U. (2017). ATR-FTIR spectral discrimination between normal and tumorous mouse models of lymphoma and melanoma from serum samples. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17027-4>
- Giannoulis, C., Zournatzi, B., Giomisi, A., Diza, E., & Tzafettas, I. (2008). Toxoplasmosis during pregnancy : a case report and review of the literature. *Hippokratia*, *12*(3), 139–143.
- Gilbert, R., & Gras, L. (2003). European Multicentre Study on Congenital Toxoplasmosis. Effect of timing and type of treatment on the risk of mother to child transmission of Toxoplasma gondii.

- International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 110(2), 112–120.  
[https://doi.org/10.1016/S1470-0328\(02\)02325-X](https://doi.org/10.1016/S1470-0328(02)02325-X)
- Glasner, P. D., Silveira, C., Kruszon-Moran, D., Martins, M. C., Burnier Junior, M., Silveira, S., ... Belfort, R. J. (1992). An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. *Am J Ophthalmol*, 114(2), 136–144. Retrieved from [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1642287](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1642287)
- Goulart, B. N. G. de, & Chiari, B. M. (2007). Testes de rastreamento x testes de diagnóstico: atualidades no contexto da atuação fonoaudiológica. *Pró-Fono Revista de Atualização Científica*, 19(2), 223–232. <https://doi.org/10.1590/S0104-56872007000200011>
- Granato, C. F. H., & Paulini Júnior, I. J. (2014). Diagnóstico laboratorial da toxoplasmose. In *Toxoplasmose & Toxoplasma gondii* (1ª edição, pp. 127–135). Rio de Janeiro: FIOCRUZ.
- Graumann, K., Schaumburg, F., Reubold, T., Hippe, D., Eschenburg, S., & Lüder, C. (2015). Toxoplasma gondii inhibits cytochrome c-induced caspase activation in its host cell by interference with holo-apoptosome assembly. *Microbial Cell*, 2(5), 150–162.  
<https://doi.org/10.15698/mic2015.05.201>
- Gross, U., Bohne, W., Lüder, C. G. K., Lugert, R., Seeber, F., Dittrich, C., ... Ferguson, D. J. P. (1996). Regulation of developmental differentiation in the protozoan parasite Toxoplasma gondii. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1996.tb05033.x>
- Guerina, N. G., Hsu, H.-W., Meissner, H. C., Maguire, J. H., Lynfield, R., Stechenberg, B., ... Grady, G. F. (1994). Neonatal Serologic Screening and Early Treatment for Congenital Toxoplasma gondii Infection. *The New England Journal of Medicine*, 330, 1858–1863. Retrieved from <https://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJM199406303302604>
- Gunasekaran, S., & Uthra, D. (2008). FTIR and UV-Visible spectral study on normal blood samples. *Asian Journal of Chemistry*, 20(7), 5695–5703.
- Guo, Z. G., & Johnson, A. M. (1995). Genetic characterization of Toxoplasma gondii strains by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. *Parasitology*, 111(2), 127–132.
- Guo, Z. G., & Johnson, A. M. (1996). DNA polymorphisms associated with murine virulence of Toxoplasma gondii identified by RAPD-PCR. *Current Topics in Microbiology and Immunology*.
- Hadda, V., Handa, R., Aggarwal, P., Lakshmy, R., Kumar, U., & Pandey, R. (2007). Disease activity and lipids in rheumatoid arthritis: a prospective study. *Indian Journal of Rheumatology*, 2(4), 137–140. [https://doi.org/10.1016/S0973-3698\(10\)60057-X](https://doi.org/10.1016/S0973-3698(10)60057-X)
- Haka, A. S., Shafer-Peltier, K. E., Fitzmaurice, M., Crowe, J., Dasari, R. R., & Feld, M. S. (2005). Diagnosing breast cancer by using Raman spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(35), 12371–6.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0501390102>
- Haka, A. S., Volynskaya, Z., Gardecki, J. A., Nazemi, J., Lyons, J., Hicks, D., ... Feld, M. S. (2006). In vivo margin assessment during partial mastectomy breast surgery using Raman spectroscopy. *Cancer Research*, 66(6), 3317–3322. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2815>
- Halaris, A., & Yolken, R. R. (2018). Possible involvement of infectious agents in treatment resistant bipolar depression. *Neurology, Psychiatry and Brain Research*, 29, 10.  
<https://doi.org/10.1016/j.npbr.2018.01.072>

- Hamidinejat, H., Ghorbanpoor, M., Hosseini, H., Alavi, S. M., Nabavi, L., Jalali, M. H. R., ... Mohammadaligol, S. (2010). Toxoplasma gondii infection in first-episode and inpatient individuals with schizophrenia. *International Journal of Infectious Diseases*, *14*(11), e978–e981. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2010.05.018>
- Hands, J. R., Clemens, G., Stables, R., Ashton, K., Brodbelt, A., Davis, C., ... Baker, M. J. (2016). Brain tumour differentiation: rapid stratified serum diagnostics via attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy. *Journal of Neuro-Oncology*, *127*(3), 463–472. <https://doi.org/10.1007/s11060-016-2060-x>
- Hang, K. U. N. Z., Lu, X. I. L., An, B. A. M., Ang, C. H. Y., Hang, C. H. A. O. Z., Lu, M. E. I. L., ... Hen, C. H. C. (2018). Label-free and stable serum analysis based on Ag-NPs / P-Si surface-enhanced Raman scattering for noninvasive lung cancer detection, *9*(9), 167–173.
- Hanlon, E. B., Manoharan, R., Koo, T.-W., Shafer, K. E., Motz, J. T., Fitzmaurice, M., ... Feld, M. S. (2000). Prospects for in vivo Raman spectroscopy. *Physics in Medicine and Biology*, *45*(2).
- Harris, A. T., Lungari, A., Needham, C. J., Smith, S. L., Lones, M. A., Fisher, S. E., ... High, A. S. (2009). Potential for Raman spectroscopy to provide cancer screening using a peripheral blood sample. *Head & Neck Oncology*, *1*, 34. <https://doi.org/10.1186/1758-3284-1-34>
- Hartley, W. J., & Munday, B. L. (1974). Felidae in the Dissemination of Toxoplasmosis To Man and Other Animals. *Australian Veterinary Journal*. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1974.tb02368.x>
- Hassi, A., Müller, W. A., & Aspöck, H. (1991). An identical epitope in Pneumocystis carinii and Toxoplasma causing serological cross-reactions. *Parasitology Research*, *77*(4), 351–352.
- Hegab, S. M., & Al-Mutawa, S. A. (2003). Immunopathogenesis of toxoplasmosis. *Clinical and Experimental Medicine*, *3*(2), 84–105. <https://doi.org/10.1007/s10238-003-0011-2>
- Heise, H. M., Marbach, R., Koschinsky, T., & Gries, F. A. (1994). Multicomponent Assay for Blood Substrates in Human Plasma by Mid-Infrared Spectroscopy and its Evaluation for Clinical Analysis. *Applied Spectroscopy*, *48*(1), 85–95.
- Hill, D., & Dubey, J. P. (2002). Toxoplasma gondii: transmission, diagnosis and prevention. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *8*, 634–640. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2002.00485.x>
- Ho-Yen, D. O., Joss, a W., Balfour, a H., Smyth, E. T., Baird, D., & Chatterton, J. M. (1992). Use of the polymerase chain reaction to detect Toxoplasma gondii in human blood samples. *Journal of Clinical Pathology*, *45*(10), 910–913. <https://doi.org/10.1136/jcp.45.10.910>
- Holland, G. N. (2003). Ocular Toxoplasmosis: A Global Reassessment. Part I: Epidemiology and Course of Disease. *American Journal of Ophthalmology Case Reports*, *136*(6), 973–988. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2003.09.040>.
- Hosmer, D. W., & Lemeshow, S. (2000). Applied Logistic Regression. *Wiley Series in Probability and Statistics*. <https://doi.org/10.2307/2074954>
- House, P. K., Vyas, A., & Sapolsky, R. (2011). Predator cat odors activate sexual arousal pathways in brains of toxoplasma gondii infected rats. *PLoS ONE*, *6*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023277>
- Howe, D. K., & Sibley, L. D. (1995). Toxoplasma gondii Comprises of Parasite Three Clonal Lineages :

- Correlation with Human Disease Genotype. *The Journal of Infectious Diseases*.
- Hu, S., Morris, I. K., Singh, J. P., Smith, K. M., & Spiro, T. G. (1993). Complete assignment of cytochrome c resonance Raman spectra via enzymic reconstitution with isotopically labeled hemes. *Journal of the American Chemical Society*. <https://doi.org/10.1021/ja00079a028>
- Hussain, M. A., Stitt, V., Szabo, E. A., & Nelan, B. (2017). Toxoplasma gondii in the Food Supply. <https://doi.org/10.3390/pathogens6020021>
- Hutchison, W. M. (1965). Experimental Transmission of Toxoplasma gondii. *Nature*, *206*(4987), 961–962. <https://doi.org/10.1038/206961a0>
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2017). IBGE. Retrieved November 21, 2018, from <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/18915-conta-satelite-de-saude-release>
- Iqbal, J., & Khalid, N. (2007). Detection of acute Toxoplasma gondii infection in early pregnancy by IgG avidity and PCR analysis. *Journal of Medical Microbiology*, *56*(11), 1495–1499. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47260-0>
- Jamieson, L. E., Jaworska, A., Jiang, J., Baranska, M., Harrison, D. J., & Campbell, C. J. (2015). Simultaneous intracellular redox potential and pH measurements in live cells using SERS nanosensors. *The Analyst*. <https://doi.org/10.1039/C4AN02365J>
- Janku, J. (1923). Pathogenesis and pathologic anatomy of the “congenital coloboma” of the macula lutea in an eye of normal size, with microscopic detection of parasites in the retina. *Cesk Parasitology*, *62*(39), 1021–102.
- Jeffers, V., Tampaki, Z., Kim, K., & Sullivan, W. J. (2018). A latent ability to persist: differentiation in Toxoplasma gondii. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *75*(13), 1–19. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2808-x>
- Jermyn, M., Mok, K., Mercier, J., Desroches, J., Pichette, J., Saint-arnaud, K., ... Leblond, F. (2015). Intraoperative brain cancer detection with Raman spectroscopy in humans Intraoperative brain cancer detection with Raman spectroscopy in humans. *Science Translational Medicine*, (FEBRUARY), 274. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa2384>
- Jiang, J., Auchincloss, C., Fisher, K., & Campbell, C. J. (2014). Quantitative measurement of redox potential in hypoxic cells using SERS nanosensors. *Nanoscale*. <https://doi.org/10.1039/C4NR01263A>
- Johnson, A. M. (1997). Speculation on possible life cycles for the clonal lineages in the genus Toxoplasma. *Parasitology Today*. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(97\)01129-0](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(97)01129-0)
- Joiner, K. A., & Dubremetz, J. F. (1993). Toxoplasma gondii: A protozoan for the nineties. *Infection and Immunity*, *61*(4), 1169–1172.
- Jones, J. L., & Dubey, J. P. (2014). Epidemiologia da toxoplasmose. In *Toxoplasmose & Toxoplasma gondii* (1ª edição, pp. 117–126). Rio de Janeiro: FIOCRUZ.
- Jones, J. L., & Holland, G. N. (2010). Short report: Annual burden of ocular toxoplasmosis in the United States. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *82*(3), 464–465. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0664>
- Jones, J. L., 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*(3), 405–410. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2007.77.3.405> [pii]

- Jones, J. L., Kruszon-moran, D., Wilson, M., Mcquillan, G., Navin, T., & Mcauley, J. B. (2001). Toxoplasma gondii Infection in the United States : Seroprevalence and Risk Factors. *American Journal of Epidemiology*, 154(4), 357–365.
- Jones, J. L., Lopez, A. M., Wilson, M., Schulkin, J., & Gibbs, R. (2001). Congenital Toxoplasmosis: A Review. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 56(5), 296–305.
- Kaderbhai, N. N., Broadhurst, D. I., Ellis, D. I., Goodacre, R., & Kell, D. B. (2003). Functional genomics via metabolic footprinting: Monitoring metabolite secretion by Escherichia coli tryptophan metabolism mutants using FT-IR and direct injection electrospray mass spectrometry. *Comparative and Functional Genomics*, 4(4), 376–391. <https://doi.org/10.1002/cfg.302>
- Kanagathara, N., Thirunavukkarasu, M., Jeyanthi, E. C., & Shenbagarajan, P. (2011). FTIR and UV-Visible spectral study on normal blood samples. *International Journal of Pharmacy and Biological Science*, 1(2), 74–81. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Ftir+and+uv-visible+spectral+study+on+normal+blood+samples#2>
- Kannan, G., & Pletnikov, M. V. (2012). Toxoplasma gondii and cognitive deficits in schizophrenia: An animal model perspective. *Schizophrenia Bulletin*, 38(6), 1155–1161. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbs079>
- Kapperud, G., Jenum, P. A., Stray-Pedersen, B., Melby, K. K., Eskild, A., & Eng, J. (1996). Risk Factors for Toxoplasma gondii Infection in Pregnancy. *American Journal of Epidemiology*, 144(4), 405–412.
- Keller, M. D., Vargis, E., de Matos Granja, N., Wilson, R. H., Mycek, M.-A., Kelley, M. C., & Mahadevan-Jansen, A. (2011). Development of a spatially offset Raman spectroscopy probe for breast tumor surgical margin evaluation. *Journal of Biomedical Optics*, 16(7), 077006. <https://doi.org/10.1117/1.3600708>
- Khan, S., Ullah, R., Saleem, M., Bilal, M., Rashid, R., Khan, I., ... Nawaz, M. (2016). Raman spectroscopic analysis of dengue virus infection in human blood sera. *Optik - International Journal for Light and Electron Optics*, 127(4), 2086–2088. <https://doi.org/10.1016/j.ijleo.2015.11.060>
- Khanmohammadi, M., Ghasemi, K., Garmarudi, A. B., & Ramin, M. (2015). Diagnostic prediction of renal failure from blood serum analysis by FTIR spectrometry and chemometrics. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.10.082>
- Kochanowsky, J. A., & Koshy, A. A. (2018). Quick guide - Toxoplasma gondii. *Current Biology Magazine*, 28(14), R770–R771. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.05.035>
- Kodym, P., Malý, M., Beran, O., Jilich, D., Rozsypal, H., MacHala, L., & Holub, M. (2015). Incidence, immunological and clinical characteristics of reactivation of latent Toxoplasma gondii infection in HIV-infected patients. *Epidemiology and Infection*, 143(3), 600–607. <https://doi.org/10.1017/S0950268814001253>
- Kompalic-Cristo, A., Constança, B., & Fernandes, O. (2005). Diagnóstico molecular da toxoplasmose: revisão. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 41(4), 229–235. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442005000400003>
- Kong, K., Kendall, C., Stone, N., & Notingher, I. (2015). Raman spectroscopy for medical diagnostics – From in-vitro biofluid assays to in-vivo cancer detection. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 89, 121–134. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.03.009>

- Konishi, E. (1987). A pregnant woman with a high level of naturally occurring immunoglobulin M antibodies to *Toxoplasma gondii*. *Am J Obstet Gynecol*. Retrieved from [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3674154](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3674154)
- Koski, H. V. (1990). Evaluation of ELISA for the detection of *Toxoplasma* antibodies in swine sera. *Acta Vet Scand*.
- Kotanen, C. N., Martinez, L., Alvarez, R., & Simecek, J. W. (2016). Surface enhanced Raman scattering spectroscopy for detection and identification of microbial pathogens isolated from human serum. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 8, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2016.03.002>
- Kotula, A. W., Dubey, J. P., Sharar, A. K., Andrews, C. D., Shen, S. K., & Lindsay, D. S. (1991). Effect of Freezing on Infectivity of *Toxoplasma Gondii* Tissue Cysts in Pork. *Journal of Food Protection*, 54(9), 687–690. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-54.9.687>
- Krafft, C., Steiner, G., Beleites, C., & Salzer, R. (2009). Disease recognition by infrared and Raman spectroscopy. *Journal of Biophotonics*, 2(1–2), 13–28. <https://doi.org/10.1002/jbio.200810024>
- Krauss-Silva, L. (2004). Avaliação tecnológica em saúde: questões metodológicas e operacionais. *Cadernos de Saúde Pública*, 20, S199–S207. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2004000800015>
- Krone, W., & Nägele, H. (1988). Effects of antihypertensives on plasma lipids and lipoprotein metabolism. *American Heart Journal*, 116(6–Part 2), 1729–1734. [https://doi.org/10.1016/0002-8703\(88\)90222-0](https://doi.org/10.1016/0002-8703(88)90222-0)
- Latr, P., Pineda, M., Harnett, M., & Harnett, W. (2017). Apicomplexan autophagy and modulation of autophagy in parasite-infected host cells. *Biomedical Journal*, 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2017.01.001>
- Lebech, M., Andersen, O., Christensen, N. C., Hertel, J., Nielsen, H. E., Peitersen, B., ... Nørgaard-Pedersen, B Petersen, E. (1999). Feasibility of neonatal screening for toxoplasma infection in the absence of prenatal treatment. Danish Congenital Toxoplasmosis Study Group. *Lancet*, 353, 1834–1837.
- Lechowicz, L., Chrapek, M., Gaweda, J., Urbaniak, M., & Konieczna, I. (2016). Use of Fourier-transform infrared spectroscopy in the diagnosis of rheumatoid arthritis: a pilot study. *Molecular Biology Reports*, 43(12), 1321–1326. <https://doi.org/10.1007/s11033-016-4079-7>
- Lehmann, T., Marcet, P. L., Graham, D. H., Dahl, E. R., & Dubey, J. P. (2006). Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(30), 11423–11428. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601438103>
- Leite, J. G. (2008). Aplicação das Técnicas de Espectroscopia FTIR e de Micro Espectroscopia Confocal Raman à Preservação do Patrimônio, (020805011), 76.
- Lester, D. (2010). Brain parasites and suicide. *Psychological Reports*, 107(2), 2941. <https://doi.org/10.2466/12.13.PR0.107.5.424>
- Levaditi, C. (1928). Au sujet de certaines protozooses héréditaires humaines à localisations oculaires et nerveuses. *C R Soc Biol (Paris)*, 98, 297–299.
- Levi, G. C. (2014). Quadro clínico em pacientes imunocompetentes. In *Toxoplasmose & Toxoplasma gondii* (1ª edição, pp. 157–162). Rio de Janeiro: FIOCRUZ.

- Levy, M., Zylber-Katz, E., & Rosenkranz, B. (1995). Clinical pharmacokinetics of dipyrone and its metabolites. *Clinical Pharmacokinetics*, *28*(3), 216–234.
- Lewis, P. D., Lewis, K. E., Ghosal, R., Bayliss, S., Lloyd, A. J., Wills, J., ... Mur, L. A. (2010). Evaluation of FTIR spectroscopy as a diagnostic tool for lung cancer using sputuum. *BMC Cancer*, *10*, 640.
- Li, S., Li, L., Zeng, Q., Zhang, Y., Guo, Z., Liu, Z., ... Liu, S. (2015). Characterization and noninvasive diagnosis of bladder cancer with serum surface enhanced Raman spectroscopy and genetic algorithms. *Scientific Reports*, *5*, 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep09582>
- Lima, A., & Bakker, J. (2011). Espectroscopia no infravermelho próximo para a monitorização da perfusão tecidual. *Rev Bras Ter Intensiva*, *23*(3), 341–351. <https://doi.org/10.1590/S0103-507X2011000300013>
- Lima, C. A., Goulart, V. P., Côrrea, L., Pereira, T. M., & Zezell, D. M. (2015). ATR-FTIR spectroscopy for the assessment of biochemical changes in skin due to cutaneous squamous cell carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(4), 6621–6630. <https://doi.org/10.3390/ijms16046621>
- Lin, K., Cheng, D. L. P., & Huang, Z. (2012). Optical diagnosis of laryngeal cancer using high wavenumber Raman spectroscopy. *Biosensors and Bioelectronics*, *35*(1), 213–217. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.02.050>
- Lindgren, M., Torniainen-Holm, M., Härkänen, T., Dickerson, F., Yolken, R. H., & Suvisaari, J. (2018). The association between toxoplasma and the psychosis continuum in a general population setting. *Schizophrenia Research*, *193*, 329–335. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2017.06.052>
- Ling, V. J., Lester, D., Mortensen, P. B., Langenberg, P. W., & Postolache, T. T. (2012). Toxoplasma gondii Seropositivity and Suicide rates in Women. *The Journal of Nervous and Mental Disease*, *199*(7), 440–444. <https://doi.org/10.1097/NMD.0b013e318221416e.Toxoplasma>
- Lito, D., Francisco, T., Salva, I., Tavares, M. das N., Oliveira, R., & Neto, M. T. (2013). Análise das serologias para Infecções do grupo TORCH e do rastreio para Streptococcus do grupo B na população de grávidas de uma maternidade. *Acta Medica Portuguesa*, *26*(5), 549–554.
- Liu, H., Su, Q., Sheng, D., Zheng, W., & Wang, X. (2017). Comparison of red blood cells from gastric cancer patients and healthy persons using FTIR spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*, *1130*, 33–37. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.10.019>
- Liu, Q., Wang, Z. D., Huang, S. Y., & Zhu, X. Q. (2015). Diagnosis of toxoplasmosis and typing of Toxoplasma gondii. *Parasites and Vectors*, *8*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0902-6>
- Ljungström, I., Gille, E., Nokes, J., Linder, E., & Forsgren, M. (1995). Seroepidemiology of Toxoplasma gondii among pregnant women in different parts of Sweden - Springer. *European Journal of Epidemiology*, *11*(2), 149–156.
- Lobo, M. L., Patrocínio, G., Sevivas, T., De Sousa, B., & Matos, O. (2017). Portugal and Angola: Similarities and differences in Toxoplasma gondii seroprevalence and risk factors in pregnant women. *Epidemiology and Infection*, *145*(1), 30–40. <https://doi.org/10.1017/S0950268816001904>
- Lopes, A. P., Dubey, J. P., Moutinho, O., Gargate, M. J., Vilares, A., Rodrigues, M., & Cardoso, L. (2012). Seroepidemiology of Toxoplasma gondii infection in women from the North of Portugal in their childbearing years. *Epidemiol Infect*, *140*(5), 872–877. <https://doi.org/10.1017/S0950268811001658>



- Lopes, C. S., Ramos, E. P., Barros, H. L. S., Silva, M. F., Silva, T. L., & Souza e Silva, V. R. (2016). Novas abordagens no diagnóstico da Toxoplasmose. Retrieved October 15, 2017, from <http://sbi.org.br/novas-abordagens-no-diagnostico-da-toxoplasmose/>
- Lopes, F. M. R., Mitsuka-Breganó, R., Gonçalves, D. D., Freire, R. L., Karigyo, C. J. T., Wedy, G. F., ... Navarro, I. T. (2009). Factors associated with seropositivity for anti-Toxoplasma gondii antibodies in pregnant women of Londrina, Paraná, Brazil. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *104*(2), 378–382. <https://doi.org/S0074-02762009000200036> [pii]
- Lucas, S. R. R., Hagiwara, M. K., Reche Jr, A., & Germano, P. M. L. (1998). Ocorrência de anticorpos anti-toxoplasma em gatos infectados naturalmente pelo vírus da imunodeficiência dos felinos. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, *35*(1), 41–45.
- Luiza, T., Gontijo, M., & Avelar, J. B. (2008). Toxoplasma gondii: *37*(3), 191–207.
- Luzon, M., Alonso, A., & Quintanilla Gozalo, A. (1997). Etiologia y biología - Toxoplasmosis. *Revista Ovis*, 11–17.
- Lyng, F. M., Faolain, E. O., Conroy, J., Meade, A. D., Knief, P., Duffy, B., ... Byrne, H. J. (2007). Vibrational spectroscopy for cervical cancer pathology, from biochemical analysis to diagnostic tool. *Experimental & Molecular Pathology*.
- Machado, A. S., Andrade, G. M. Q., Januário, J. N., Fernandes, M. D., Carneiro, A. C. a V, Carneiro, M., ... Vitor, R. W. a. (2010). IgG and IgM western blot assay for diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *105*(September), 757–61. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762010000600005>
- Machado, P. R. L., Carvalho, L., Araújo, M. I. A. S., & Carvalho, E. M. (2004). Mecanismos de resposta imune às infecções. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, *79*(6), 647–664. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962004000600002>
- Mackanos, M. A., & Contag, C. H. (2009). FTIR microspectroscopy for improved prostate cancer diagnosis. *Cell Press*, *27*(12), 661–663.
- Maes, M., Mihaylova, I., Kubera, M., Leunis, J. C., & Geffard, M. (2011). IgM-mediated autoimmune responses directed against multiple neoepitopes in depression: New pathways that underpin the inflammatory and neuroprogressive pathophysiology. *Journal of Affective Disorders*, *135*(1–3), 414–418. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2011.08.023>
- Magi, B., & Migliorini, L. (2011). Western blotting for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. *The New Microbiologica*, *34*(1), 93–5. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2694-7>
- Mandai, O. N., Maria, F., & Lopes, R. (2007). Prevalência de anticorpos igG e igM anti-Toxoplasma gondii em gestantes atendidas nas unidades básicas de saúde do município de Londrina – Paraná , no período de 2003 e 2004. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, *39*(4), 247–249.
- Maquelin, K., Choo-Smith, L. P., van Vreeswijk, T., Endtz, H. P., Smith, B., Bennett, R., ... Puppels, G. J. (2000). Raman spectroscopic method for identification of clinically relevant microorganisms growing on solid culture medium. *Anal.Chem.*, *72*, 12–19. <https://doi.org/10.1021/ac991011h>
- Markovitz, A. A., Simanek, A. M., Yolken, R. H., Galea, S., Koenen, K. C., Chen, S., & Aiello, A. E. (2015). Toxoplasma gondii and anxiety disorders in a community-based sample. *Brain, Behavior, and Immunity*, *43*, 192–7. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.08.001>
- Marro, M., Nieva, C., Sanz-Pamplona, R., & Sierra, A. (2014). Molecular monitoring of epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cells by means of Raman spectroscopy. *Biochimica et*

- Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1843(9), 1785–1795.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.04.012>
- Martin, F. L., Kelly, J. G., Llabjani, V., Martin-Hirsch, P. L., Patel, I. I., Trevisan, J., ... Walsh, M. J. (2010). Distinguishing cell types or populations based on the computational analysis of their infrared spectra. *Nature Protocols*, 5(11), 1748–1760. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.133>
- Martin, V., Arcavi, M., Santillan, G., Amendoeira, M. R., De Souza Neves, E., Griemberg, G., ... Angel, S. O. (1998). Detection of human Toxoplasma-specific immunoglobulins A, M, and G with a recombinant Toxoplasma gondii rop2 protein. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 5(5), 627–31. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=95632&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Mayne, S. T., Cartmel, B., Scarmo, S., Jahns, L., Ermakov, I. V., & Gellermann, W. (2013). Resonance Raman spectroscopic evaluation of skin carotenoids as a biomarker of carotenoid status for human studies. *Archives of Biochemistry and Biophysics*.  
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.06.007>
- McDonald, S. A., Devleeschauwer, B., Speybroeck, N., Hens, N., Praet, N., Torgerson, P. R., ... Döpfer, D. (2015). Data-driven methods for imputing national-level incidence in global burden of disease studies. *Bulletin of the World Health Organization*, 93(4), 228–236.  
<https://doi.org/10.2471/BLT.14.139972>
- McLeod, R., Kieffer, F., Sautter, M., Hosten, T., & Pelloux, H. (2009). Why prevent, diagnose and treat congenital toxoplasmosis? *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 27(4), 339–351.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.10.017.A>
- Meireles, L. R. (2001). *Estudos das fontes de infecção da toxoplasmose humana em diferentes localidades do Estado de São Paulo*. Universidade de São Paulo.
- Meireles, L. R., Ekman, C. C. J., Andrade JR, H. F. de, & Luna, E. J. de A. (2015). Human Toxoplasmosis Outbreaks and the Agent Infecting Form. Findings From a Systematic Review. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 57(5), 369–376.  
<https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000500001>
- Melchers, F. (1972). Difference in Carbohydrate Composition and a Possible Conformational Difference between Intracellular and Extracellular Immunoglobulin M. *Biochemistry*.  
<https://doi.org/10.1021/bi00761a031>
- Mello, C., Marangoni, A., Poppi, R., & Noda, I. (2011). Fast determination of thyroid stimulating hormone in human blood serum without chemical preprocessing by using infrared spectroscopy and least squares support vector machines. *Analytica Chimica Acta*, 696(1–2), 47–52.  
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.04.015>
- Mercier, A., Devillard, S., Ngoubangoye, B., Bonnabau, H., Bañuls, A. L., Durand, P., ... Dardé, M. L. (2010). Additional haplogroups of Toxoplasma gondii out of Africa: Population structure and mouse-virulence of strains from Gabon. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(11).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000876>
- Meroni, V., & Genco, F. (2008). Toxoplasmosis in pregnancy: evaluation of diagnostic methods. *Parassitologia*, 50(1–2), 51–53.
- Miman, O., Aktan, E., Ozcan, O., Atambay, M., Karlidag, R., & Unal, S. (2010). Is there any role of Toxoplasma gondii in the etiology of obsessive – compulsive disorder? *Psychiatry Research*.

- <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2009.12.013>
- Miman, O., Kusbeci, O. Y., Aktepe, O. C., & Cetinkaya, Z. (2010). The probable relation between *Toxoplasma gondii* and Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*, *475*(3), 129–131. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.03.057>
- Minati, L., Kress, I. U., Visani, E., Medford, N., & Critchley, H. D. (2011). Intra- and extra-cranial effects of transient blood pressure changes on brain near-infrared spectroscopy (NIRS) measurements. *Journal of Neuroscience Methods*, *197*(2), 283–288. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2011.02.029>
- Ministério da Saúde. (2009a). *Avaliação de Tecnologias em Saúde: Ferramentas para a Gestão do SUS*. Ministério da Saúde. Brasília. Retrieved from [http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/avaliacao\\_tecnologias\\_saude\\_ferramentas\\_gestao.pdf](http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/avaliacao_tecnologias_saude_ferramentas_gestao.pdf)
- Ministério da Saúde. (2009b). *Estudos de avaliação econômica de tecnologias em saúde* (1ª edição). Brasília: Ministério da Saúde.
- Ministério da Saúde. (2015). *Ministério da saúde, Portugal. Diário da República*. Portugal. Retrieved from [http://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/DL\\_97-2015\\_SiNATS\\_20150601.pdf/e716dcf7-8043-4d3b-8f9c-ac3de91bfa35](http://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/DL_97-2015_SiNATS_20150601.pdf/e716dcf7-8043-4d3b-8f9c-ac3de91bfa35)
- Miot, H. A. (2011). Tamanho da amostra em estudos clínicos e experimentais. *Jornal Vasculiar Brasileiro*, *10*(4), 275–278. <https://doi.org/10.1590/S1677-54492011000400001>
- Mistek, E., & Lednev, I. K. (2015). Identification of species' blood by attenuated total reflection (ATR) Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *407*(24), 7435–7442. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8909-6>
- Mistro, G. Del, Cervo, S., Mansutti, E., Spizzo, R., Colombatti, A., Belmonte, P., ... Bonifacio, A. (2015). Surface-enhanced raman spectroscopy of urine for prostate cancer detection: A preliminary study. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *407*(12), 3271–3275. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8610-9>
- Mitsuka-Breganó, R., Lopes-mori, F. M. R., & Navarro, I. T. (2010). Toxoplasmose adquirida na gestação e congênita: vigilância em saúde, diagnóstico, tratamento e condutas. In *SciELO Books* (pp. 15–24).
- Momenpour, A., Lima, P. D. A., Chen, Y.-A., Tzeng, C.-R., Tsang, B. K., & Anis, H. (2018). Surface-enhanced Raman scattering for the detection of polycystic ovary syndrome. *Biomedical Optics Express*, *9*(2), 801. <https://doi.org/10.1364/BOE.9.000801>
- Montoya, J. D., & Liesenfeld, O. (2004). Toxoplasmosis. *The Lancet*, *363*(9425), 1965–1976.
- Montoya, J. G. (2002). Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. *The Journal of Infectious Diseases*, *185* Suppl(June), S73–S82. <https://doi.org/10.1086/338827>
- Mordechai, S., Sahu, R. K., Hammody, Z., Mark, S., Kantarovich, K., Guterman, H., ... Argov, S. (2004). Possible common biomarkers from FTIR microspectroscopy of cervical cancer and melanoma. *Journal of Microscopy*, *215*(1), 86–91. <https://doi.org/10.1111/j.0022-2720.2004.01356.x>
- Mortensen, P. B., Nørgaard-Pedersen, B., Waltoft, B. L., Sørensen, T. L., Hougaard, D., Torrey, E. F., & Yolken, R. H. (2007). *Toxoplasma gondii* as a Risk Factor for Early-Onset Schizophrenia: Analysis of Filter Paper Blood Samples Obtained at Birth. *Biological Psychiatry*, *61*(5), 688–693.

- <https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2006.05.024>
- Mostaço-Guidolin, L. B., & Bachmann, L. (2011). Application of FTIR Spectroscopy for Identification of Blood and Leukemia Biomarkers : A Review over the Past 15 Years Application of FTIR Spectroscopy for Identification of Blood and Leukemia Biomarkers : A Review over the Past 15 Years. *Journal Applied Spectroscopy Reviews*, 46(5), 37–41. <https://doi.org/10.1080/05704928.2011.565534>
- Motz, J. T., Gandhi, S. J., Scepanovic, O. R., Haka, A. S., Kramer, J. R., Dasari, R. R., & Feld, M. S. (2005). Real-time Raman system for in vivo disease diagnosis. *Journal of Biomedical Optics*, 10(3), 031113. <https://doi.org/10.1117/1.1920247>
- Movasaghi, Z., Rehman, S., & Rehman, I. U. (2007). Raman spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy ...*, 42(5), 493–541. <https://doi.org/10.1080/05704920701551530>
- Muennig, P. (2002). *Designing and Conducting Cost-effectiveness Analyses in Medicine and Health Care* (1st editio). San Francisco: Jossey-Bass.
- Naot, Y., Desmonts, G., & Remington, J. S. (1981). IgM enzyme-linked immunosorbent assay test for the diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection. *The Journal of Pediatrics*, 98(1), 32–36. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7452400>
- Nasir, I. A., Shehu, M. S., & Adekola, H. A. (2017). Anti-Toxoplasma gondii IgG avidity testing is necessary for diagnosis of acute toxoplasmosis. *Journal of Taibah University Medical Sciences*, 12(1), 87–88. <https://doi.org/10.1016/j.jtumed.2016.11.004>
- Neto, E. C. (2000). High prevalence of congenital toxoplasmosis in Brazil estimated in a 3-year prospective neonatal screening study. *International Journal of Epidemiology*. <https://doi.org/10.1093/ije/29.5.941>
- Neves, D. P. (2016). *Parasitologia humana* (13 th). Rio de Janeiro: Atheneu.
- Neves, D. P., Melo, A. L., Linardi, P. M., & Vitor, R. W. A. (2011). *Parasitologia Humana*. Atheneu. <https://doi.org/10.1086/521246>
- Nicolle, M. M. C., & Manceaux, L. (1909). Sur un protozoaire nouveau du gundi. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Séances de l'Academie Des Sciences*, 148, 369–372.
- Nogareda, F., LE Strat, Y., Villena, I., DE Valk, H., & Goulet, V. (2013). Incidence and prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in women in France, 1980-2020: model-based estimation. *Epidemiology and Infection*, 142(8), 1661–70. <https://doi.org/10.1017/S0950268813002756>
- Norsworthy, G. D. (2018). *The feline patient*. (G. D. Norsworthy, Ed.) (5th ed.).
- Notingher, I. (2007). Raman Spectroscopy Cell-based Biosensors. *Sensors*, 7(8), 1343–1358. <https://doi.org/10.3390/s7081343>
- Nunes, A. A., Martinez, E. Z., Ana, L. W., Pazin-filho, A., Coelho, E. B., & Mello, L. M. De. (2015). Testes diagnósticos no contexto da avaliação de tecnologias em saúde : tecnologias abordagens, métodos e interpretação. *Medicina (Ribeirao Preto)*, 48(1), 8–18. <https://doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v48i1p8-18>
- Nunes, G. S. (2005). Metodos imunoquimicos para análise de contaminantes ambientais: conceitos, estados da arte e perspectivas. *Quimica Nova*, 28(3), 462–471.
- Oliveira, M. G. D. E. (2016). Estudo de fatores de risco , sororreatividade e perfil clínico de pacientes HIV / Aids co-infectados com *Toxoplasma gondii* em Natal , Rio Grande do Norte .

- Oliver, K. V. (2015). *Infrared spectroscopy as a clinical diagnostic method for detection of disease states: developments and applications in kidney diseases and cancer diagnoses*. University College London.
- Ollesch, J., Heinze, M., Heise, H. M., Behrens, T., Brüning, T., & Gerwert, K. (2014). It's in your blood: Spectral biomarker candidates for urinary bladder cancer from automated FTIR spectroscopy. *Journal of Biophotonics*, 7(3–4), 210–221. <https://doi.org/10.1002/jbio.201300163>
- Onadeko, M. O., Joynson, D. H., & Payne, R. A. (1992). The prevalence of Toxoplasma infection among pregnant women in Ibadan, Nigeria. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(2), 143–145.
- Painter, P. C., & Koenig, J. L. (1975). Raman spectroscopic study of the structure of antibodies. *Biopolymers*, 14(3), 457–68. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bip.1975.360140303>
- Papadakis, J. A., Ganotakis, E. S., Jagroop, I. A., Mikhailidis, D. P., & Winder, A. F. (1999). Effect of hypertension and its treatment on lipid, lipoprotein(a), fibrinogen, and bilirubin levels in patients referred for dyslipidemia. *American Journal of Hypertension*. [https://doi.org/10.1016/S0895-7061\(99\)00049-7](https://doi.org/10.1016/S0895-7061(99)00049-7)
- Paranhos, R., Figueiredo Filho, D. B., Rocha, E. C. da, Silva Júnior, J. A. Da, Neves, J. A. B., & Santos, M. L. W. D. (2014). Desvendando os Mistérios do Coeficiente de Correlação de Pearson: o Retorno. *Leviathan (São Paulo)*, 18(8), 66. <https://doi.org/10.11606/issn.2237-4485.lev.2014.132346>
- Pardini, H. (2002). Toxoplasmose - Diagnóstico Laboratorial. *Instituto Hermes Pardini*. Retrieved from <http://www.hermespardini.com.br>
- Pedersen, M. G., Mortensen, P. B., Norgaard-Pedersen, B., & Postolache, T. T. (2012). Toxoplasma gondii infection and self-directed violence in mothers. *Archives of General Psychiatry*, 69(11), 1123–30. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2012.668>
- Pelloux, H., Guy, E., Angelici, M. C., Aspöck, H., Bessières, M. H., Blatz, R., ... Olsson, M. (1998). A second European collaborative study on polymerase chain reaction for Toxoplasma gondii, involving 15 teams. *FEMS Microbiology Letters*, 165(2), 231–237. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(98\)00281-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(98)00281-X)
- Pena, H. F. J., Gennari, S. M., Dubey, J. P., & Su, C. (2008). Population structure and mouse-virulence of Toxoplasma gondii in Brazil. *International Journal for Parasitology*. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.09.004>
- Pence, I., & Mahadevan-jansen, A. (2016). Clinical instrumentation and applications of Raman spectroscopy. *Chemical Society Reviews*, 45(7), 1958–1979. <https://doi.org/10.1039/c5cs00581g>.Clinical
- Pereira-Chioccola, V. L., Vidal, J. E., & Su, C. (2009). Toxoplasma gondii infection and cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients. *Future Microbiology*. <https://doi.org/10.2217/fmb.09.89>
- Pereira, E. (2009). Avaliação económica das tecnologias da saúde. *Salutis Scientia*, 1, 32–40. Retrieved from <http://www.salutisscientia.esscvp.eu/Site/download.aspx?artigoId=30318>
- Petersen, E. (2007). Toxoplasmosis. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 12(3), 214–223. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2007.01.011>
- Petibois, C., Cazorla, G., Cassaigne, A., & Déléris, G. (2001). Plasma protein contents determined by Fourier-transform infrared spectrometry. *Clinical Chemistry*, 47(4), 730–8. Retrieved from

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11274025>
- Peyron, F., McLeod, R., Ajzenberg, D., Contopoulos-Ioannidis, D., Kieffer, F., Mandelbrot, L., ... Montoya, J. G. (2017). Congenital Toxoplasmosis in France and the United States: One Parasite, Two Diverging Approaches. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *11*(2), 4–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005222>
- Pfaff, A. W., Abou-Bacar, A., Letscher-Bru, V., Villard, O., Senegas, A., Mousli, M., & Candolfi, E. (2007). Cellular and molecular physiopathology of congenital toxoplasmosis: the dual role of IFN-gamma. *Parasitology*, *134*(Pt 13), 1895–1902. <https://doi.org/10.1017/S0031182007000200>
- Pinho, E. M. do. (2006). *Estimação Bayesiana para Medidas de Desempenho de Testes Diagnósticos*. Universidade Federal de São Carlos Centro.
- Pinkerton, H., & Weinman, D. (1940). Toxoplasma infection in man. *Acta Pathol*, *30*, 374–392.
- Poon, K. W. C., Lyng, F. M., Knief, P., Howe, O., Meade, A. D., Curtin, J. F., ... Vaughan, J. (2012). Quantitative reagent-free detection of fibrinogen levels in human blood plasma using Raman spectroscopy. *The Analyst*. <https://doi.org/10.1039/c2an35042d>
- PORDATA. (2017). PORDATA. Retrieved November 21, 2018, from <https://www.pordata.pt/Portugal/Despesa+corrente+em+cuidados+de+saúde+em+percentagem+do+PIB-610>
- Powell, C. ., Brewer, M., & Lappin, M. R. . (2001). Detection of Toxoplasma gondii in the milk of experimentally infected lactating cats. *Veterinary Parasitology*, *102*(2), 29–33. <https://doi.org/10.1590/S1678-91992010000200016>
- Prusa, A.-R., Hayde, M., Pollak, A., Herkner, K. R., & Kasper, D. C. (2012). Evaluation of the Liaison Automated Testing System for Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis. *Clinical and Vaccine Immunology*, *19*(11), 1859–1863. <https://doi.org/10.1128/CVI.00489-12>
- Rahim, H. A., Ismail, R., Rahim, I. M. abd., & Ghazali, R. (2016). Near Infrared spectroscopy (NIRS) Applications in medical: non-invasive and invasive leukemia screening. *Jurnal Teknologi*, *2*, 157–163.
- Ramos, J. M. T. de A. (2006). *Estudo espectroscópico vibracional de complexos de Ni ( II ) com os aminoácidos serina , glicina e ácido Guanidoacético*. Universidade Federal Fluminense.
- Regina, P., Araújo, B., & Ferreira, A. W. (2008). Avidity of IgG antibodies against excreted / secreted antigens of Toxoplasma gondii : immunological marker for acute recent toxoplasmosis Avidéz de anticorpos IgG anti-antígeno de secreção e excreção de Toxoplasma gondii : marcador imunológico de toxoplas, *41*(2), 142–147.
- Remington, J. S., & Klein, J. O. (2011). *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn*. *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn*. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-6400-8.00018-3>
- Remington, J. S., Klein, J. O., & Baker, C. J. (2011). *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*. *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn*. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-6400-8.00010-9>
- Remington, J. S., Klein, J. O., Wilson, C. B., & Baker, C. J. (2006). *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*. *Infectious Diseases of the Fetus and the Newborn Infant* (6th ed.).
- Rey, L. C., & Ramalho, I. L. C. (1999). Seroprevalence of toxoplasmosis in fortaleza, ceará, Brazil. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, *41*(3), 171–174. <https://doi.org/10.1590/S0036-46651999000300007>

- Ricciardi, I. D., Sabroza, P. C., Sandoval, E. D., & Mayrink, W. (1978). Seroepidemiological study in the prevalence of human toxoplasmosis in Brazil. *Revista Microbiologica*, 181–187.
- Riemann, H. P., Meyer, M. E., Theis, J. H., Kelso, G., & Behymer, D. E. (1975). Toxoplasmosis in an infant fed unpasteurized goat milk. *The Journal of Pediatrics*. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(75\)80825-0](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(75)80825-0)
- Rigas, B., Morgello, S., Goldman, I. S., & Wong, P. T. (1990). Human colorectal cancers display abnormal Fourier-transform infrared spectra. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(20), 8140–4. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.20.8140>
- Riley, C. B., McClure, J. T., Low-Ying, S., & Shaw, R. A. (2007). Use of fourier-transform infrared spectroscopy for the diagnosis of failure of transfer of passive immunity and measurement of immunoglobulin concentration in horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21(4), 828–834. [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2007\)21\[828:UOFISF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2007)21[828:UOFISF]2.0.CO;2)
- Rilling, V., Dietz, K., Krczal, D., Knotek, F., & Enders, G. (2003). Evaluation of a commercial IgG IgM Western blot assay for early postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 22(3), 174–180.
- Robert-Gangneux, F., & Dardé, M. L. (2012). Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(2), 264–296. <https://doi.org/10.1128/CMR.05013-11>
- Rohleder, D., Kiefer, W., & Petrich, W. (2004). Quantitative analysis of serum and serum ultrafiltrate by means of Raman spectroscopy. *The Analyst*, 129(10), 906. <https://doi.org/10.1039/b408927h>
- Rouquayrol, M. Z. (2013). *Epidemiologia e Saúde* (7ª). Rio de Janeiro: Medsi.
- Ryzhikova, E., Kazakov, O., Halamkova, L., Celmins, D., Malone, P., Molho, E., ... Lednev, I. K. (2015). Raman spectroscopy of blood serum for Alzheimer's disease diagnostics: Specificity relative to other types of dementia. *Journal of Biophotonics*. <https://doi.org/10.1002/jbio.201400060>
- Saade, J., Pacheco, M. T. T., Rodrigues, M. R., & Jr., L. S. (2008). Identification of hepatitis C in human blood serum by near-infrared Raman spectroscopy. *Spectroscopy*, 22(5), 387–395. <https://doi.org/10.1155/2008/419783>
- Saberi, R., Sharif, M., Sarvi, S., & Aghayan, S. A. (2018). Is *Toxoplasma gondii* playing a positive role in multiple sclerosis risk? A systematic review and meta-analysis. *Journal of Neuroimmunology*, 322(December 2017), 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2018.06.011>
- Sabin, A. B., & Feldman, H. A. (1948). Dyes as Microchemical Indicators of a New Immunity Phenomenon Affecting a Protozoon Parasite (*Toxoplasma*). *Science (New York, N.Y.)*, 108(2815), 660–3. <https://doi.org/10.1126/science.108.2815.660>
- Sáfadi, M. A. P., & Farhat, C. K. (1999). *Toxoplasmose* (2ª ed). São Paulo: Atheneu.
- Sahu, A., Dalal, K., Naglot, S., Aggarwal, P., & Krishna, C. M. (2013). Serum based diagnosis of asthma using Raman spectroscopy: An early phase pilot study. *PLoS ONE*, 8(11), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078921>
- Sahu, A., Dalal, K., Naglot, S., Aggarwal, P., & Krishna, C. M. (2018). Diagnóstico Baseado em Soro de Asma Usando Espectroscopia Raman: Um Estudo Piloto de Fase Inicial. *PLoS ONE*, 1–10.
- Sahu, A., Nandakumar, N., Sawant, S., & Krishna, C. M. (2015). Recurrence prediction in oral cancers: A serum Raman spectroscopy study. *Analyst*, 140(7), 2294–2301. <https://doi.org/10.1039/c4an01860e>

- Saleem, M., Bilal, M., Anwar, S., Rehman, A., & Ahmed, M. (2013). Optical diagnosis of dengue virus infection in human blood serum using Raman spectroscopy. *Laser Physics Letters*, *10*(3), 035602. <https://doi.org/10.1088/1612-2011/10/3/035602>
- Sankari, G., Krishnamoorthy, E., Jayakumaran, S., Gunasekaran, S., Vishnu Priya, V., Subramaniam, S., ... Mohan, S. K. (2010). Analysis of serum immunoglobulins using Fourier transform infrared spectral measurements. *Biology and Medicine*, *2*(3), 42–48.
- Santos, J. A., Martins, N. N., Clode, N., & Martins, F. N. (2017). Rastreios na gravidez : o panorama nacional. *Acta Obstétrica e Ginecológica Portuguesa*, *11*(3), 174–180. Retrieved from <http://www.scielo.mec.pt/pdf/aogp/v11n3/v11n3a04.pdf>
- Santos, M. C. D. (2018). *Detecção e tipagem de arbovírus (dengue, zika e chikungunya) por infravermelho em conjunto com técnicas de análise multivariada*. UFRN.
- Sathuluri, R. R., Yoshikawa, H., Shimizu, E., Saito, M., & Tamiya, E. (2011). Gold nanoparticle-based surface-enhanced Raman scattering for noninvasive molecular probing of embryonic stem cell differentiation. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022802> [pii]
- Sato, K., Seimiya, M., Kodera, Y., Kitamura, A., & Nomura, F. (2010). Application of Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy for simple and easy determination of chylomicron-triglyceride and very low density lipoprotein-triglyceride. *Clinica Chimica Acta*. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2009.11.026>
- Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M., Roy, S. L., ... Griffi, P. M. (2011). Foodborne Illness Acquired in the United States – Major Pathogens, *17*(1), 7–15. <https://doi.org/10.3201/eid1701.P11101>
- Schroeder, H. W. J., & Cavacini, L. (2010). Structure and Function of Immunoglobulins (author manuscript). *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *125*, 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046>.Structure
- Schulz, G., Weiss, M., Bauersfeld, U., Teller, J., Haensse, D., Bucher, H., & Baenziger, O. (2002). Liver tissue oxygenation as measured by near-infrared spectroscopy in the critically ill child in correlation with central venous oxygen saturation. *Intensive Care Medicine*, *28*(2), 184–189. <https://doi.org/10.1007/s00134-001-1182-5>
- Sensini, A. (2006). Toxoplasma gondii infection in pregnancy: Opportunities and pitfalls of serological diagnosis. *Clinical Microbiology and Infection*, *12*(6), 504–512. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01444.x>
- Seven, A., Güzel, S., Aslan, M., & Hamuryudan, V. (2008). Lipid , protein , DNA oxidation and antioxidant status in rheumatoid arthritis. *Clinical Biochemistry*, *41*(7–8), 538–543. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2008.01.029>
- Shen, Y. C., Davies, A. G., Linfield, E. H., Elsey, T. S., Taday, P. F., & Arnone, D. D. (2003). The use of Fourier-transform infrared spectroscopy for the quantitative determination of glucose concentration in whole blood. *Physics in Medicine & Biology*, *48*(13), 2023–2032.
- Shi, C., Cao, X., Chen, X., Sun, Z., Xiang, Z., Zhao, H., ... Han, X. (2015). Intracellular surface-enhanced Raman scattering probes based on TAT peptide-conjugated Au nanostars for distinguishing the differentiation of lung resident mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.04.010>
- Short, M. A., Lam, S., McWilliams, A. M., Ionescu, D. N., & Zeng, H. (2011). Using laser raman



- spectroscopy to reduce false positives of autofluorescence bronchoscopies: A pilot study. *Journal of Thoracic Oncology*, 6(7), 1206–1214. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3182178ef7>
- Sibley, L. D., & Ajioka, J. W. (2008). Population structure of *Toxoplasma gondii*: clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps. *Annual Review of Microbiology*, 62, 329–351. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162925>
- Sikirzhytski, V., Sikirzhytskaya, A., & Lednev, I. K. (2012). Multidimensional Raman spectroscopic signature of sweat and its potential application to forensic body fluid identification. *Analytica Chimica Acta*, 718, 78–83. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.12.059>
- Sikirzhytski, V., Virkler, K., & Lednev, I. K. (2010). Discriminant analysis of Raman spectra for body fluid identification for forensic purposes. *Sensors*, 10(4), 2869–2884. <https://doi.org/10.3390/s100402869>
- Silva, A. V. Da, Cunha, E. L. P., Meireles, L. R., Gottschalk, S., Mota, R. A., & Langoni, H. (2003). Toxoplasmose em ovinos e caprinos: estudo soropidemiológico em duas regiões do Estado de Pernambuco, Brasil. *Ciência Rural*, 33(1), 115–119. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782003000100018>
- Silveira, C. A. M. (1997). *Estudo da toxoplasmose ocular na região de Erechim - RS*. Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).
- Silveira, C. A. M. (2002). *Toxoplasmose - Dúvidas e Controvérsias* (1st ed.). Erechim: Edifapes.
- Silveira, L. H. (2009). *Caracterização biológica e genotípica de isolados de Toxoplasma gondii obtidos de galinhas de criação livre do Pantanal do Mato Grosso do Sul*. Universidade de São Paulo.
- Silveira, L., Martin, A. A., Za, R. A., Pacheco, M. T. T., Chavantes, M. C., & Pasqualucci, C. A. (2018). Raman spectroscopy study of atherosclerosis in human carotid artery. *Journal of Biomedical Optics*, 10(June 2005), 1–7. <https://doi.org/10.1117/1.1908129>
- Silverton, E. W., Navia, M. A., & Davies, D. R. (1977). Three-dimensional structure of an intact human immunoglobulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(11), 5140–4. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.11.5140>
- Simões, L., Favaron, P. O., Anunciação, A. R. de A., & Miglino, M. A. (2015). Toxoplasma gondii e gestação: Características da toxoplasmose, sinais clínicos, diagnóstico e a importância da doença na saúde pública - Revisão. *Revista Científica de Medicina Veterinária*, pp. 1–17.
- Singh, B. (1997). Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. *International Journal for Parasitology*. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(97\)00111-2](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(97)00111-2)
- Siqueira, L. F. S., & Lima, K. M. G. (2016). A decade (2004 - 2014) of FTIR prostate cancer spectroscopy studies: An overview of recent advancements. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 82, 208–221. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.05.028>
- Skinner, L. J., Timperley, A. C., Wightman, D., Chatterton, J. M. W., & Ho-Yen, D. O. (1990). Simultaneous diagnosis of toxoplasmosis in goats and goatowner's family. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.3109/00365549009027060>
- Smith, B. C. (1998). *Infrared Spectral Interpretation: A Systematic Approach* (p. 265). Boca Raton. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Soares, A. N., Brandão, E. C., Cunha, G. F. da, Scherrer, L. R., Precivale, M., Strassmann, P. G., & Assis, S. R. L. (2017). Manual de Leitura Crítica de Artigos Científicos. In *SBOC - Sociedade Brasileira de Oncologia* (pp. 83–90).

- Soete, M., Fortier, B., Camus, D., & Dubremetz, J. F. (1993). *Toxoplasma gondii*: kinetics of bradyzoite-tachyzoite interconversion in vitro. *Experimental Parasitology*.  
<https://doi.org/10.1006/expr.1993.1031>
- Souf, S. (2016). Recent advances in diagnostic testing for viral infections. *Bioscience Horizons: The International Journal of Student Research*, 9(November), 11.  
<https://doi.org/10.1093/biohorizons/hzw010/2622464>
- Sousa, O. E., Saenz, R. E., & Frenkel, J. K. (1988). Toxoplasmosis in Panama: a 10-Year Study.pdf. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 38(2), 315–322.
- Souza-júnior, V. G. De, Figueiró-filho, E. A., Borges, D. D. C., Oliveira, V. M. De, & Coelho, L. R. (2010). Artigo Original / Original Article Toxoplasmose e gestação : resultados perinatais e associação do teste de avides de IgG com infecção congênita em gestantes com IgM anti-Toxoplasma gondii reagente. *Scientia*, 20, 45–50.
- Souza, G. F. de, Carvalho, D., Pedrosa, W., Franck, J., Piarroux, R., Jacqueline, F., ... Piarroux, R. (2012). Analytical validation of anti-toxoplasma IgG immunoassays. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16(6), 574–576. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.07.014>
- Souza, J. Y. de. (2017). *Validação da técnica de Avides de IgG em amostras de sangue de recém-nascidos coletadas em papel filtro: valor prognóstico para indicação de infecção ativa pelo Toxoplasma gondii*. Goiânia.
- Souza, F. de B., Pacheco, M. T. T., Vila Verde, A. B., Silveira, L., Marcos, R. L., & Lopes-Martins, R. A. B. (2003). Avaliação do ácido láctico intramuscular através da espectroscopia Raman: Novas perspectivas em medicina do esporte. *Revista Brasileira de Medicina Do Esporte*, 9(6), 388–402.  
<https://doi.org/10.1590/S1517-86922003000600004>
- Souza, W. J., Coutinho, S. G., Lopes, C. W., dos Santos, C. S., Neves, N. M., & Cruz, A. M. (1987). Epidemiological aspects of toxoplasmosis in schoolchildren residing in localities with urban or rural characteristics within the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*.  
<https://doi.org/10.1590/S0074-02761987000400005>
- Spiro, T. G. (1974). Resonance Raman spectroscopy. New structure probe for biological chromophores. *Accounts of Chemical Research*. <https://doi.org/10.1021/ar50082a004>
- Splendore, A. (1908). Uri nuovo protozoa parassita dei conigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'una malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo. Nota preliminare. *Revista da Sociedade Cientifica de São Paulo*, v.3, p.109-112, 1908. *Revista Da Sociedade Científica de São Paulo*, 3, 109–112.
- Srisayam, M., Weerapreeyakul, N., Barusrux, S., Tanthanuch, W., & Thumanu, K. (2014). Application of FTIR microspectroscopy for characterization of biomolecular changes in human melanoma cells treated by sesamol and kojic acid. *Journal of Dermatological Science*, 73(3), 241–250.  
<https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2013.11.002>
- Steiner, G., & Urowitz, M. B. (2009). Lipid profiles in patients with rheumatoid arthritis: mechanisms and the impact of treatment. *Semin Arthritis Rheum*, 38(5), 372–381.  
<https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2008.01.015>
- Stillwaggon, E., Carrier, C. S., Sautter, M., & McLeod, R. (2011). Maternal serologic screening to prevent congenital toxoplasmosis: A decision-analytic economic model. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001333>
- Su, C., Shwab, E. K., Zhou, P., Zhu, X. Q., & Dubey, J. P. (2016). Moving towards an integrated

- approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*, *137*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1017/S0031182009991065>
- Suvisaari, J., Torniainen-holm, M., Lindgren, M., Härkänen, T., & Yolken, R. H. (2017). Journal of Affective Disorders *Toxoplasma gondii* infection and common mental disorders in the Finnish general population. *Journal of Affective Disorders*, *223*(July), 20–25. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2017.07.020>
- Talari, A. C., Movasaghi, Z., Rehman, S., & U, R. I. (2015). Raman spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, *50*, 46–111.
- Tan, Y., Konorov, S. O., Schulze, H. G., Piret, J. M., Blades, M. W., & Turner, R. F. B. (2012). Comparative study using Raman microspectroscopy reveals spectral signatures of human induced pluripotent. *Analyst*, *137*(19), 4509–4515. <https://doi.org/10.1039/C2AN35507H>
- Tanyuksel, M., Guney, C., Araz, E., Saracli, M. A., & Doganci, L. (2004). Performance of the immunoglobulin G avidity and enzyme immunoassay IgG/IgM screening tests for differentiation of the clinical spectrum of toxoplasmosis. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, *42*(3), 211–5.
- Tatarkovič, M., Synytsya, A., Šovičková, L., Bunganič, B., Miškovičová, M., Petruželka, L., & Setnička, V. (2015). The minimizing of fluorescence background in Raman optical activity and Raman spectra of human blood plasma. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *407*(5), 1335–1342. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8358-7>
- Taylor, D. W., Evans, C. B., Aley, S. B., Barta, J. R., & Danforth, H. D. (1990). Identification of an apically-located antigen that is conserved in sporozoan parasites. *Eukaryotic Microbiology*, *37*(6), 540–545.
- Taylor, R. S. (2004). Inclusion of cost effectiveness in licensing requirements of new drugs: the fourth hurdle. *Bmj*, *329*(7472), 972–975. <https://doi.org/10.1136/bmj.329.7472.972>
- Tefera, T., Tysnes, K., Utaaker, K., & Robertson, L. J. (2018). Parasite contamination of berries: Risk, occurrence, and approaches for mitigation. *Food and Waterborne Parasitology*, (2017), #pagerange#. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2018.04.002>
- Tenter, A. M., Heckeroth, A. R., & Weiss, L. M. (2000). *Toxoplasma gondii*: From animals to humans. *International Journal for Parasitology*, *30*(12–13), 1217–1258. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00124-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00124-7)
- Thalhammer, O. (1962). Congenital Toxoplasmosis. *Lancet*, 23–24.
- Theophilou, G., Lima, K. M. G., Briggs, M., Martin-Hirsch, P. L., Stringfellow, H. F., & Martin, F. L. (2015). A biospectroscopic analysis of human prostate tissue obtained from different time periods points to a trans-generational alteration in spectral phenotype. *Scientific Reports*, *5*(July), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep13465>
- Thirugnanam, S., Rout, N., & Gnanasekar, M. (2013). Possible role of *Toxoplasma gondii* in brain cancer through modulation of host microRNAs. *Infectious Agents and Cancer*, *8*(1), 8. <https://doi.org/10.1186/1750-9378-8-8>
- Tian, A.-L., Gu, Y.-L., Zhou, N., Cong, W., Li, G.-X., Elsheikha, H. M., & Zhu, X.-Q. (2017). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in arthritis patients in eastern China. *Infectious Diseases of Poverty*, *6*(1), 153. <https://doi.org/10.1186/s40249-017-0367-2>
- Titus, J., Ghimire, H., Viennois, E., Merlin, D., & Unil Perera, A. G. (2017). Protein secondary structure analysis of dried blood serum using infrared spectroscopy to identify markers for colitis screening.

- Journal of Biophotonics*, 11(3), 57. <https://doi.org/10.1002/jbio.201700057>
- Torrey, E. F., & Yolken, R. H. (2003). *Toxoplasma gondii* and schizophrenia. *Emerging Infectious Diseases*, 9(11), 1375–1380. <https://doi.org/10.3201/eid0911.030143>
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2017). *Microbiologia*.
- Truong, W. T. Y., Lewis, L. E. V., & Thordarson, P. (2016). Biomedical Applications of Molecular Spectroscopy.
- Tu, Q., & Chang, C. (2012). Diagnostic applications of Raman spectroscopy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 8(5), 545–558. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.09.013>
- Uckermann, O., Galli, R., Tamosaityte, S., Leipnitz, E., Geiger, K. D., Schackert, G., ... Kirsch, M. (2014). Label-free delineation of brain tumors by coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy in an orthotopic mouse model and human glioblastoma. *PLoS ONE*, 9(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107115>
- UFRGS -Universidade Federal do Rio Grande do Sul. (2018). Atlas Eletrônico de Histologia. Retrieved July 17, 2018, from <http://www.ufrgs.br/para-site/siteantigo/Imagensatlas/Protozoa/Toxoplasma.htm>
- Ushasree, U. V., & Ahmad, A. (2017). FTIR spectroscopic analysis on human hair. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, 6(5), 9327–9332. <https://doi.org/10.15680/IJRSET.2017.0605195>
- Vasconcelos-Santos, D. V., Azevedo, D. O. M., Campos, W. R., Oréfice, F., Queiroz-Andrade, G. M., Carellos, É. V. M., ... Caiaffa, W. T. (2009). Congenital toxoplasmosis in Southeastern Brazil: Results of early ophthalmologic examination of a large cohort of neonates. *Ophthalmology*, 116(11), 2199–2205.e1.
- Vaz, R. S. (2006). *Diagnóstico sorológico, isolamento e caracterização molecular de Toxoplasma gondii (Nicole & Manceaus, 1909) em mulheres gestantes atendidas pelo serviço público na cidade de Curitiba. Universidade Federal do Paraná. UFPR.*
- Venkatakrishna, K., Kurien, J., Pai, K. M., Valiathan, M., Kumar, N. N., Krishna, C. M., ... Kartha, V. B. (2001). Optical pathology of oral tissue: A raman spectroscopy diagnostic method. *Current Science*, 80(5), 665–669.
- Veronesi, R. (1991). *Doenças infecciosas e parasitárias. Guanabara Koogan* (8th ed.). Rio de Janeiro.
- Verrier, S., Zoladek, A., & Notingher, I. (2011). Raman Micro-Spectroscopy as a Non-invasive Cell Viability Test. In *Mammalian Cell Viability* (pp. 179–189). Humana Press.
- Vidotto, O. (1992). Toxoplasmose: epidemiologia e importância da doença na saúde animal. *Semina: Ciências Agrárias*, 13(1), 69. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.1992v13n1p69>
- Vieira, S. (2008). *Introdução à bioestatística* (4ª Edição). Elsevier. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Vilares, A., Ferreira, I., Martins, S., & Reis, T. (2015). Toxoplasmose: diagnóstico laboratorial de casos clínicos suspeitos de infecção entre 2009 e 2013. *Instituto Nacional de Saúde*. Lisboa, Portugal.
- Villard, O., Cimon, B., L'Ollivier, C., Fricker-Hidalgo, H., Godineau, N., Houze, S., ... Candolfi, E. (2016). Serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection: Recommendations from the French National Reference Center for Toxoplasmosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 84(1), 22–

33. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.09.009>
- Virkler, K., & Lednev, I. K. (2009). Analysis of body fluids for forensic purposes: From laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene. *Forensic Science International*, *188*(1–3), 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2009.02.013>
- Wallon, M., Peyron, F., Cornu, C., Vinault, S., Abrahamowicz, M., Bonithon Kopp, C., & Binquet, C. (2013). Congenital toxoplasma infection: Monthly prenatal screening decreases transmission rate and improves clinical outcome at age 3 years. *Clinical Infectious Diseases*, *56*(9), 1223–1231. <https://doi.org/10.1093/cid/cit032>
- Wang, H., Liu, Y., Li, M., Huang, H., Xu, H. M., Hong, R. J., & Shen, H. (2010). Multifunctional TiO<sub>2</sub>nanowires-modified nanoparticles bilayer film for 3D dye-sensitized solar cells. *Optoelectronics and Advanced Materials, Rapid Communications*, *4*(8), 1166–1169. <https://doi.org/10.1039/b000000x>
- Wang, J.-S., Shi, J.-S., Xu, Y.-Z., Duan, X.-Y., Zhang, L., Wang, J., ... Wu, J.-G. (2003). FT-IR spectroscopic analysis of normal and cancerous tissues of esophagus. *World J Gastroenterol*, *9*(9), 1897–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12970871>
- Wang, J., Lin, D., Lin, J., Yu, Y., Huang, Z., Chen, Y., ... Chen, R. (2014). Label-free detection of serum proteins using surface-enhanced Raman spectroscopy for colorectal cancer screening. *Journal of Biomedical Optics*. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.19.8.087003>
- Wang, T. D., Triadafilopoulos, G., Crawford, J. M., Dixon, L. R., Bhandari, T., Sahbaie, P., ... Contag, C. H. (2007). Detection of endogenous biomolecules in Barrett's esophagus by Fourier transform infrared spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(40), 15864–15869. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707567104>
- Wang, X., Shen, X., Sheng, D., Chen, X., & Liu, X. (2014). FTIR spectroscopic comparison of serum from lung cancer patients and healthy persons. *Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *122*, 193–197.
- Wang, Y., Hua, L., Liu, J., Qu, D., Chen, A., Jiao, Y., ... Hong, W. (2009). Preliminary study on the quick detection of acquired immune deficiency syndrome by saliva analysis using surface enhanced Raman spectroscopic technique. In *Proceedings of the 31st Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society: Engineering the Future of Biomedicine, EMBC 2009* (pp. 885–887). <https://doi.org/10.1109/IEMBS.2009.5333131>
- Webster, J. P. (2010). Review of “Toxoplasmosis of Animals and Humans (Second Edition)” by J.P. Dubey. *Parasites & Vectors*, *3*(1), 112. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-112>
- Weinstein, M. C., & Stason, W. B. (1977). Foundations of Cost-Effectiveness Analysis for Health and Medical Practices. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJM197703312961304>
- Wen, Z. Q. (2007). Raman spectroscopy of protein pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. <https://doi.org/10.1002/jps.20895>
- Weselucha-Birczyńska, A., Kozicki, M., Czepiel, J., & Birczyńska, M. (2013). Raman micro-spectroscopy tracing human lymphocyte. *The Royal Society of Chemistry*, *138*, 7157–7163. <https://doi.org/10.1039/c3an01493b>
- Westenskow, D., Smith, K., Coleman, D., Gregonis, D., & Van Wagenen, R. (2018). Clinical evaluation of a Raman scattering multiple gas analyzer for the operating room. *Anesthesiology*, *70*(2), 350–5. <https://doi.org/10.1167/8.5.1>

- Wilking, H., Thamm, M., Stark, K., Aebischer, T., & Seeber, F. (2016). Prevalence, incidence estimations, and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in Germany: a representative, cross-sectional, serological study. *Scientific Reports*, 6(November 2015), 22551. <https://doi.org/10.1038/srep22551>
- Wilson, C. B., Remington, J. S., Stagno, S., & Reynolds, D. W. (1980). Development of adverse sequelae in children born with subclinical congenital *Toxoplasma* infection. *Pediatrics*, 66(5), 767–774. <https://doi.org/10.1097/00006254-198108000-00013>
- Wolf, A., & Cowen, D. (1937). Granulomatous encephalomyelitis due to an encephalitozoon (encephalitozoic encephalomyelitis). A new protozoan disease of man. *Bull Neurol Inst NY*.
- Wong, S.-Y., & Remington, J. S. (1993). Biology of *Toxoplasma gondii*. *AIDS*, 7(3), 299–316.
- Wong, S. Y., & Remington, J. S. (1994). Toxoplasmosis in pregnancy. *Clin Infect Dis.*, 18(6), 853–861.
- Wyler, D. J. (1990). *Modern parasite biology cellular, immunological and molecular aspects*. W. H. Freeman and Company.
- Xiao, Y., Yin, J., Jiang, N., Xiang, M., Hao, L., Lu, H., ... Chen, Q. (2010). Seroepidemiology of human *Toxoplasma gondii* infection in China. *BMC Infectious Diseases*, 10(1), 4. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-4>
- Xie, H. N., Stevenson, R., Stone, N., Hernandez-Santana, A., Faulds, K., & Graham, D. (2012). Tracking bisphosphonates through a 20 mm thick porcine tissue by using surface-enhanced spatially offset raman spectroscopy. *Angewandte Chemie - International Edition*. <https://doi.org/10.1002/anie.201203728>
- Yadav, J., Rani, A., Singh, V., & Murari, B. M. (2015). Prospects and limitations of non-invasive blood glucose monitoring using near-infrared spectroscopy. *Biomedical Signal Processing and Control*, 18, 214–227. <https://doi.org/10.1016/j.bspc.2015.01.005>
- Yamada, H., Nishikawa, A., Yamamoto, T., Mizue, Y., Yamada, T., Morizane, M., ... Nishihira, J. (2011). Prospective study of congenital toxoplasmosis screening with use of IgG avidity and multiplex nested PCR methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(7), 2552–2556. <https://doi.org/10.1128/JCM.02092-10>
- Yan, B., Li, B., Wen, Z., Luo, X., Xue, L., & Li, L. (2015). Label-free blood serum detection by using surface-enhanced Raman spectroscopy and support vector machine for the preoperative diagnosis of parotid gland tumors. *BMC Cancer*, 15(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1653-7>
- Yazar, S., Arman, F., Yalçın, Ş., Demirtaş, F., Yaman, O., & Şahin, I. (2003). Investigation of probable relationship between *Toxoplasma gondii* and cryptogenic epilepsy. *Seizure*. [https://doi.org/10.1016/S1059-1311\(02\)00256-X](https://doi.org/10.1016/S1059-1311(02)00256-X)
- Zhang, L., Zhang, S., Sun, M., Wang, Z., Li, H., Li, Y., ... Lin, L. (2016). Blood species identification using Near-Infrared diffuse transmitted spectra and PLS-DA method. *Infrared Physics and Technology*, 76, 587–591. <https://doi.org/10.1016/j.infrared.2016.04.025>
- Zhou, P., Chen, Z., Li, H.-L., Zheng, H., He, S., Lin, R.-Q., & Zhu, X.-Q. (2011). *Toxoplasma gondii* infection in humans in China. *Parasites & Vectors*, 4(1), 165. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-165>
- Zita, T., Gergely, M., Emese, M., & Gabor L, K. (2014). Measurement of serum total cortisol using HPLC coupled ESI–TOF mass spectrometry. *Endocrine Abstracts*. Wrocław, Poland.
- Zou, Y., Huang, M., Wang, K., Song, B., Wang, Y., Chen, J., ... Huang, G. (2016). Urine surface-

enhanced Raman spectroscopy for non-invasive diabetic detection based on a portable Raman spectrometer. *Laser Physics Letters*, 13(6). <https://doi.org/10.1088/1612-2011/13/6/065604>

Zuber, P., & Jacquier, P. (1995). Epidemiology of toxoplasmosis: worldwide status. *Schweiz Med Wochenschr Suppl.*, 65, 19S–22S.

---

Anexo

---



Anexo 1 – Aprovação CEP

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO  
ONOFRE LOPES-HUOL/UFRN



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Detecção de Anticorpos IgG e IgM utilizando espectroscopia

**Pesquisador:** Carlos Henrique Bezerra de Oliveira

**Área Temática:** Equipamentos e dispositivos terapêuticos, novos ou não registrados no País;

**Versão:** 3

**CAAE:** 34801814.0.0000.5292

**Instituição Proponente:** INSTITUTO FEDERAL DE EDUCACAO, CIENCIA E TECNOLOGIA DO RIO

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.085.950

**Data da Relatoria:** 22/05/2015

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de uma emenda no projeto solicitando alterações de grupo de inclusão e exclusão do estudo sobre a prevalência sorológica de anticorpos presentes em grupo amostral da

população de Natal. Os testes serão realizados em um laboratório particular deste município, onde amostras sanguíneas serão coletadas e analisadas por espectrofotômetro.

**Objetivo da Pesquisa:**

**Primário**

Verificar a presença de anticorpos anti-toxoplasmose no sangue de usuários utilizando o espectrofotômetro;

**Objetivo Secundário:**

- Identificar anticorpos IgM e IgG no sangue de voluntários utilizando a técnica da espectrofotometria.
- Identificar a absorvância dos IgM e IgG no plasma sanguíneo.
- Comparar as análises do espectrofotômetro com o teste imunoenzimático (tradicional) para verificar a confiabilidade do diagnóstico, utilizando uma Análise Estatística Multivariada.

**HOSPITAL UNIVERSITÁRIO  
ONOFRE LOPES-HUOL/UFRN**



**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

Como toda pesquisa que envolve seres vivos, o trabalho necessitará de técnicas invasivas (introdução de agulhas) nos pacientes participantes. Estes procedimentos serão feitos por profissionais do laboratório participante e treinados para a função. Todos os materiais utilizados seguem norma técnica (seringas descartáveis e luvas utilizadas pelos profissionais). O material sanguíneo é isolado e colocado em recipientes adequados. O contato com o material sanguíneo requer cuidados. Durante a coleta deste material, todos os participantes utilizarão os EPI's apropriados para a tarefa.

**Benefícios:**

A população terá acesso ao procedimento, mesmo após o término do estudo, os resultados serão divulgados a comunidade e as instituições de saúde, além da divulgação nos meios específicos. Inovação no diagnóstico da toxoplasmose, utilizando um método inovador e menos invasivo.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de um estudo de relevância social e acadêmica, com estrutura bem delineada.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos foram devidamente apresentados.

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O CEP/HUOL TOMA CIÊNCIA E APROVA AS MODIFICAÇÕES.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Apresentar relatório parcial da pesquisa, semestralmente, a contar do início da mesma.

Apresentar relatório final da pesquisa até 30 dias após o término da mesma.

O CEP HUOL deverá ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo.

Quaisquer documentações encaminhadas ao CEP HUOL deverão conter junto uma Carta de Encaminhamento, em que conste o objetivo e justificativa do que esteja sendo apresentado.

Caso a pesquisa seja suspensa ou encerrada antes do previsto, o CEP HUOL deverá ser comunicado, estando os motivos expressos no relatório final a ser apresentado.

O TCLE deverá ser obtido em duas vias, uma ficará com o pesquisador e a outra com o sujeito de pesquisa.

Em conformidade com a Carta Circular nº. 003/2011CONEP/CNS, faz-se obrigatório a rubrica em todas as páginas do TCLE pelo sujeito de pesquisa ou seu responsável e pelo pesquisador.

Natal, 29 de maio de 2015

---

**Assinado por:**  
**HELIO ROBERTO HEKIS**  
**(Coordenador)**

---

## Apêndices

---

## Apêndice 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido – TCLE

*“O TCLE não é apenas um texto jurídico com a assinatura do sujeito da pesquisa afixada. É um instrumento que se usa para facilitar a comunicação entre pesquisador e sujeito da pesquisa no intuito de firmar parceria entre pessoas humanas autônomas”* (Martin, Caderno de Ética em Pesquisa, julho/02).

Essa comunicação somente será possível quando o pesquisador entender que a maioria dos participantes não está familiarizada com o universo linguístico do saber científico e/ou uma linguagem elaborada.

Portanto, ao se elaborar um TCLE, alguns cuidados devem ser observados, como utilizar na estrutura do texto uma linguagem compreensível para o nível de escolaridade do final do ensino fundamental. Também constitui um cuidado muito importante evitar, ao redigir o texto, frases e parágrafos muito longos (Franciscone, FC e Goldim, JR, 2003).

Um TCLE bem elaborado é um aspecto ético de grande mérito, visto que ele auxilia o participante a uma melhor consciência e tomada de decisão.

Outrossim, o TCLE bem elaborado cumpre os três aspectos legais exigidos para esse documento, a saber:

1. proteção e garantia dos direitos dos participantes da pesquisa;
2. possibilitar escolhas autônomas e
3. promover a ação responsável dos profissionais na execução das pesquisas.



## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

### *Esclarecimentos*

Este é um convite para você participar da pesquisa: **Comparação de métodos de Identificação de imunoglobulinas para diagnóstico de toxoplasmose**, que tem como pesquisador responsável Professora Dra. Mariana Henriques. Esta pesquisa pretende **verificar a presença de anticorpos anti-toxoplasmose no sangue de usuários utilizando o espectrofotômetro**.

O motivo que nos leva a fazer este estudo é **criar um método mais eficiente e rápido na detecção de anticorpos anti-toxoplasmose**. A presença destes anticorpos no sangue é importante para um diagnóstico futuro da toxoplasmose.

Caso você decida participar,  **você deverá realizar o exame para detecção dos anticorpos em seu sangue. O procedimento será realizado normalmente pelo laboratório DNA Center. Após a retirada do material sanguíneo, o mesmo será levado a um aparelho chamado espectrofotômetro e analisado. Após essa análise, seu material sanguíneo será devolvido ao laboratório para descarte.**

Durante a realização da retirada de material a previsão de riscos é mínima, ou seja, o risco que você corre é semelhante àquele sentido num exame físico ou psicológico de rotina.

Pode acontecer um desconforto, **uma pequena perfuração ocasionada pela seringa, que será minimizado com a utilização de algodão e curativos adesivos e você terá como benefício um exame com maior precisão e mais rápido.**

Em caso de algum problema que você possa ter relacionado com a pesquisa, você terá direito a assistência **gratuita que será prestada pelo laboratório, através de profissionais treinados para a ocasião.**

Durante todo o período da pesquisa você poderá tirar suas dúvidas ligando para a **Dra. Mariana Henriques no telefone 8855-0325 (celular) ou Carlos Henrique Bezerra de Oliveira no telefone 9912-3793 (celular)**. Poderá, também, solicitar esclarecimentos pessoalmente no endereço **Rua Dr. Nilo Bezerra Ramalho, 1692, Tirol (ao lado da Unicat)**. Se preferir, o contato pode ser por email, [carlos.bezerra@ifrn.edu.br](mailto:carlos.bezerra@ifrn.edu.br) ou [mcrh@uminho.pt](mailto:mcrh@uminho.pt)

Você tem o direito de se recusar a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem nenhum prejuízo para você.

Os dados que você irá nos fornecer serão confidenciais e serão divulgados apenas em congressos ou publicações científicas, não havendo divulgação de nenhum dado que possa lhe identificar.

Esses dados serão guardados pelo pesquisador responsável por essa pesquisa em local seguro e por um período de 5 anos.

Se você tiver algum gasto pela sua participação nessa pesquisa, ele será assumido pelo pesquisador e reembolsado para você.

Se você sofrer algum dano comprovadamente decorrente desta pesquisa, você será indenizado.

Qualquer dúvida sobre a ética dessa pesquisa você deverá ligar para o Comitê de Ética em Pesquisa do HUOL 3342 – 5003, endereço: Av. Nilo Peçanha, 620, Petrópolis, CEP 59.012-300 Nata/RN.

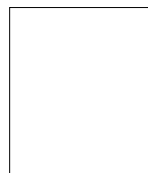
Este documento foi impresso em duas vias. Uma ficará com você e a outra com o pesquisador responsável, Dra. Mariana Henriques.

#### *Consentimento Livre e Esclarecido*

Após ter sido esclarecido sobre os objetivos, importância e o modo como os dados serão coletados nessa pesquisa, além de conhecer os riscos, desconfortos e benefícios que ela trará para mim e ter ficado ciente de todos os meus direitos, concordo em participar da pesquisa **Comparação de métodos de Identificação de imunoglobulinas para diagnóstico de toxoplasmose**, e autorizo a divulgação das informações por mim fornecidas em congressos e/ou publicações científicas desde que nenhum dado possa me identificar.

Natal, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

**Assinatura do participante da pesquisa**



Impressão  
datiloscópica do  
participante

*Declaração do pesquisador responsável*

Como pesquisador responsável pelo estudo *Detecção de Anticorpos IgG e IgM utilizando espectroscopia*, declaro que assumo a inteira responsabilidade de cumprir fielmente os procedimentos metodologicamente e direitos que foram esclarecidos e assegurados ao participante desse estudo, assim como manter sigilo e confidencialidade sobre a identidade do mesmo.

Declaro ainda estar ciente que na inobservância do compromisso ora assumido estarei infringindo as normas e diretrizes propostas pela Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde – CNS, que regulamenta as pesquisas envolvendo o ser humano.

Natal, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

#### **Assinatura do pesquisador responsável**

**Atenção:** quando o instrumento da pesquisa for questionários, formulário ou entrevistas, o TCLE deve assegurar ao participante o direito de se recusar a responder as perguntas que lhes cause constrangimento de qualquer natureza.



## Apêndice 2 – Termo de confidencialidade

**Título do Projeto:** Comparação de métodos de Identificação de imunoglobulinas para diagnóstico de toxoplasmose.

**Pesquisadores responsáveis:** Prof. Dra. Mariana Contente Rangel Henriques e Carlos Henrique Bezerra de Oliveira

**Instituição/Departamento:** Universidade do Minho, Portugal. Doutoramento em Engenharia biomédica

Os pesquisadores abaixo assinados assumem o compromisso de manter confidencialidade e sigilo sobre todas as informações técnicas e outras relacionadas ao projeto intitulado: “Comparação de métodos de Identificação de imunoglobulinas para diagnóstico de toxoplasmose”. Por este Termo de Confidencialidade compromete-se:

- a não utilizar as informações confidenciais a que tiver acesso, para gerar benefício próprio exclusivo e/ou unilateral, presente ou futuro, ou para uso de terceiros;
- a não efetuar nenhuma gravação ou cópia da documentação confidencial a que tiver acesso relacionada a tecnologia acima mencionada;
- a não apropriar-se para si ou para outrem de material confidencial e/ou sigiloso que venha a ser disponível através da tecnologia ora mencionada;
- a não repassar o conhecimento das informações confidenciais, responsabilizando-se por todas as pessoas que vierem a ter acesso às informações, por seu intermédio, e obrigando-se, assim, a ressarcir a ocorrência de qualquer dano e/ou prejuízo oriundo de uma eventual quebra de sigilo das informações fornecidas.

Concorda, igualmente, que essas informações serão utilizadas única e exclusivamente para execução do presente projeto.

---

Mariana Contente Rangel Henriques

---

Carlos Henrique Bezerra de Oliveira