

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Departamento de Bioquímica

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Bioquímica

**DIAGNÓSTICO NEONATAL DA TOXOPLASMOSE, DA DOENÇA DE
CHAGAS, DA CITOMEGALOVIROSE E DA RUBÉOLA CONGÊNITAS
EM AMOSTRAS DE SANGUE IMPREGNADO EM PAPEL-FILTRO**

Eurico Camargo Neto

Orientador: Prof. Dr. Roberto Giugliani

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-
Bioquímica, como requisito parcial à obtenção do grau de
Doutor em Bioquímica

Porto Alegre, Agosto/2004

Ficha Catalográfica

Camargo Neto, Eurico Silveira

Diagnóstico neonatal da toxoplasmose, da doença de Chagas, da citomegalovirose e da rubéola congênitas em amostras de sangue impregnado em papel-filtro / Eurico Silveira Camargo Neto. – Porto Alegre : UFRGS, 2004. 104 p.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Biociências. Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Bioquímica.

Orientador: Roberto Giugliani

1. Triagem. 2. Toxoplasmose. 3. Chagas. 4. Citomegalovirose. 5. Rubéola.

CDU 578.1

SUMÁRIO

Dedicatória.....	iii
Agradecimentos.....	iv
Resumo.....	v
Abstract.....	vii
Índice de Figuras.....	ix
Lista de abreviaturas.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. A resposta imunológica.....	5
1.2. Estrutura e função das imunoglobulinas.....	5
1.2.1. Imunoglobulina G (IgG).....	7
1.2.2. Imunoglobulina M (IgM).....	9
1.2.3. Toxoplasmose congênita.....	10
1.2.4. Doença de Chagas congênita.....	13
1.2.5. Citomegalovirose congênita.....	16
1.2.6. Rubéola congênita.....	18
1.3. Justificativa.....	20
1.4. Objetivos.....	21
2. Material e Métodos.....	22
2.1. Amostras.....	23
2.2. Equipamentos.....	26
2.3. Testes em papel-filtro.....	26
2.3.1. Ensaios para IgM anti- <i>Toxoplasma gondii</i>	26
2.3.1a. Enzimaimunoensaio indireto para IgM anti- <i>Toxoplasma gondii</i>	26
2.3.1b. Imunoensaio enzimático-fluorimétrico (FEIA) por captura de IgM anti- <i>Toxoplasma gondii</i>	28
2.3.2. Ensaio imunoenzimático para IgG anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	30
2.3.3. Ensaio imunoenzimático (ELISA) por captura de IgM anti-CMV.....	31
2.3.4. Ensaio imunoenzimático (ELISA) por captura de IgM antivírus da rubéola.....	32
2.4. Testes sorológicos confirmatórios.....	34
2.4.1. Exames clínicos.....	35
2.4.2. Testes supeitos na triagem.....	35

3. Resultados	37
3.1. Toxoplasmose congênita.....	38
3.2. Doença de chagas congênita.....	40
3.3. Citomegalovirose congênita.....	41
3.4. Rubéola congênita.....	42
4. Discussão	44
4.1. Aspectos técnicos.....	45
4.2. Toxoplasmose congênita.....	47
4.3. Doença de Chagas congênita.....	52
4.4. Citomegalovirose congênita.....	54
4.5. Rubéola congênita.....	56
4.6. Considerações gerais.....	57
5. Conclusões	64
6. Referências bibliográficas	67
7. Anexos	84
7.1. Anexo I: Resultados laboratoriais confirmatórios para toxoplasmose congênita e sintomas.....	85
7.2. Anexo II: Resultados laboratoriais confirmatórios para doença de Chagas congênita e sintomas.....	90
7.3. Anexo III: Resultados laboratoriais confirmatórios para citomegalovirose congênita e sintomas.....	91
7.4. Anexo IV: Resultados laboratoriais confirmatórios para rubéola congênita e sintomas.....	92
7.5. Anexo V. High prevalence of congenital toxoplasmosis in Brazil estimated from a three-years prospective neonatal screening. Neto EC, Anele E, Rubin R, Brites A, Schulte J, Becker D and Tuuminen T. Int J Epidemiol 2000;29(5):941-7.....	93
7.5. Anexo VI. Newborn screening for congenital infectious diseases. Neto EC, Rubin R, Schulte J, Giugliani R. Emerg Infect Dis 2004;10(6):1069-73.....	100

DEDICATÓRIA

“Epigrama nº 1

(Cecília Meireles)

Pousa sobre esses espetáculos infatigáveis

uma sonora ou silenciosa canção:

flor do espírito, desinteressada e efêmera,

Por ela, os homens te conhecerão:

por ela, os tempos versáteis saberão

que o mundo ficou mais belo, ainda que inutilmente,

quando por ele andou teu coração.”

Para Dalva, minha mãe.

Para Fernando e Luíza, meus filhos.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Roberto Giugliani, meu amigo, por ter aceito a orientação desta tese.

Ao Departamento de Bioquímica, especialmente aos professores Diogo de Souza e Carlos Alberto Gonçalves, pelo incentivo para a realização deste doutorado.

Aos meus sócios João Carlos Leite e Francisco Paulo Valim, que incentivaram este trabalho e se ocuparam de algumas das minhas atividades no laboratório.

Ao meu amigo Maurício Viecili, pelo inestimável auxílio na marcação das placas com o *Toxoplasma gondii*.

Às bioquímicas do Laboratório Nobel RIE: Daniela Becker, sem a qual não teriam começado os primeiros testes para toxoplasmose em papel-filtro, Elaine Anele, que ajudou a dar continuidade ao trabalho, e Rosélia Rubin, Jaqueline Schulte e Liliana Weber, pela ajuda com a realização dos testes e preparação dos padrões em papel-filtro.

Ao corpo de técnicos do Laboratório Nobel RIE, pela dedicação nas funções que envolveram os testes laboratoriais.

A Marcus Vinícius Leal e a Rogério e Luciano Leite, pelo auxílio com as figuras e montagem dos anexos.

A Adriana Brites, bióloga do Centro de Triagem Neonatal, vital na localização das famílias e pediatras das crianças infectadas.

À bibliotecária Miriam Sant'Helena, pela orientação na elaboração da ficha catalográfica

À professora Magdolna Maria Vozári-Hampe, que me ensinou a trabalhar em laboratório.

RESUMO

A triagem neonatal para doenças metabólicas é um procedimento de rotina nos países desenvolvidos, ainda que nem todos pesquisem as mesmas doenças, e está em crescente expansão nos países em desenvolvimento. Nos Estados Unidos, Canadá e em alguns países europeus, a triagem neonatal para os vírus HIV1 e HIV-2 também é um procedimento de rotina. A triagem para toxoplasmose congênita é realizada no Estado de Massachussets (USA), Dinamarca, Finlândia e Brasil. Embora programas de triagem pré-natal para toxoplasmose congênita estejam estabelecidos na França, Áustria e nos países nórdicos, a triagem neonatal para infecções congênitas não é, ainda, um procedimento rotineiro em nenhum país. Em consequência, não há no mercado produtos desenvolvidos para esta finalidade.

Os objetivos deste trabalho foram:

1) desenvolver ou adaptar kits para a pesquisa em soro de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*, anti-*Trypanosoma cruzi*, anticitomegalovírus (CMV) e antivírus da rubéola, procedendo os ensaios em amostras de sangue total impregnado em papel-filtro; e,

2) estimar a prevalência destas doenças em nosso meio. Foram realizados testes para toxoplasmose congênita em 364.130 neonatos, diagnosticando-se a doença em 195 pacientes (1/1.867). Adicionalmente, 15.873 neonatos foram avaliados para a presença de doença de Chagas, citomegalovirose e rubéola congênitas. Os resultados foram, respectivamente, 20 neonatos e 20 mães com presença de anticorpos de classe IgG anti-*Trypanosoma cruzi* e uma mãe e seu

neonato com IgM (1/756); 16 neonatos diagnosticados com citomegalovirose (1/992); e 11 neonatos com diagnóstico de rubéola congênita (1/1.443). Os resultados indicaram que a triagem neonatal das infecções congênitas apresentam menor custo do que a triagem de doenças metabólicas, e que os métodos empregados foram eficientes na identificação das doenças congênitas triadas.

ABSTRACT

Newborn screening for metabolic diseases is a routine procedure in developed countries, although the programs not always search the same diseases, and are becoming increasingly available in developing countries as well. In the United States, Canada and in some European countries, newborn screening for HIV-1 and HIV-2 is already a routine procedure. Screening for congenital toxoplasmosis is performed in the State of Massachusetts (USA), Denmark, Finland and Brazil. Although pre-natal screening programs for congenital toxoplasmosis are established in France, Austria and in the Scandinavian countries, newborn screening for infectious diseases is not yet a routine procedure in any country so far. As a consequence, products for this purpose are not available in the market.

The aims of this study were:

1) to develop or to adapt kits for the research of serum antibodies against *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, citomegalovirus (CMV) and rubella virus, performing the assays in whole blood impregnated in filter paper,

2) and to estimate the prevalence of these diseases in our population. For these purposes, 364,130 newborns were tested for congenital toxoplasmosis and 195 patients were diagnosed (1/1,867). In addition, 15,873 newborns were evaluated for congenital Chagas disease, citomegalovirus, and rubella. The results were, respectively, 20 mothers and 20 newborns with IgG antibodies anti-*Trypanosoma cruzi* and in one pair mother/newborn specific IgM was also detected (1/756), 16 newborns diagnosed for congenital CMV (1/992), and 10 newborns

with congenital rubella (1/1,443). The results show that newborn screening of congenital infectious diseases presented a lower cost than neonatal screening for metabolic diseases, and that the methods used were efficient to identify the diseases screened.

SUMÁRIO DAS FIGURAS

Figura 1. A resposta imunológica.....	7
Figura 2. Estrutura básica da IgG.....	8
Figura 3. Estrutura pentamérica da IgM.....	10
Figura 4. Modelo da requisição de exames do CTN (frente).....	24
Figura 5. Modelo da requisição de exames do CTN (verso).....	25
Figura 6. Princípio do método EIA para pesquisa de anticorpos anti- <i>T. gondii</i> e anti- <i>T. cruzi</i>	28
Figura 7. Princípio do método FEIA para pesquisa de anticorpos anti- <i>T. gondii</i>	29
Figura 8. Princípio do método ELISA para pesquisa de anticorpos anticitomegalovírus e antivírus da rubéola.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA:	Tampão fosfato-salina com 1% de albumina bovina
CDC:	Centers for Disease Control and Prevention
CTN:	Centro de Triagem Neonatal
CMV:	Citomegalovírus
DO:	Densidade óptica
EIA:	Enzimaimunoensaio
ELISA:	Ensaio imunoenzimático (Enzyme linked immunosorbent assay)
Fab:	Fragmento de ligação do anticorpo
Fc:	Fração cristalizável
FEIA:	Imunoensaio enzimático-fluorimétrico
IFI:	Imunofluorescência indireta
IgA:	Imunoglobulina A
IgG:	Imunoglobulina G
IgM:	Imunoglobulina M
MEIA:	Enzimaimunoensaio em micropartículas
nm:	Nanômetros
PBS:	Tampão fosfato-salina
PKU:	Fenilcetonúria
R\$:	Reais
<i>T. cruzi:</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>T. gondii:</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
US\$:	Dólares americanos

1. INTRODUÇÃO

A triagem neonatal para doenças genéticas teve início em 1961 com Robert Guthrie, em Buffalo, NY, USA, que desenvolveu um teste para a identificação de neonatos com fenilcetonúria (PKU) utilizando gotas de sangue obtidas do calcâneo e aplicadas sobre papel-filtro (Guthrie, 1992). Guthrie acoplou a amostra especialmente obtida com um teste de inibição bacteriológica por ele desenvolvido para a quantificação de fenilalanina, em um meio de cultura contendo uma cepa de *Bacillus subtilis* (Guthrie e Suzi, 1963). Esta combinação de um teste de baixo custo com um fácil sistema de transporte de amostras, tornou possível a aplicação de um programa de larga escala para a detecção neonatal da PKU (Koch, 1995). Mais tarde, a partir do desenvolvimento de programas-pilotos para a prevenção do hipotireoidismo congênito (HC) em Quebec e Pittsburgh em 1974 (Dussault *et al.*, 1975), a triagem neonatal para PKU e HC tornou-se rotina em todos os países desenvolvidos e em alguns países em desenvolvimento da Europa Oriental, América do Sul, Ásia e África.

Com o tempo, foram desenvolvidos kits comerciais para as principais doenças que fazem parte dos programas de triagem neonatal, ou foram adaptados kits comerciais desenvolvidos para a análise de amostras séricas para uso em amostras de sangue em papel-filtro (Neto, 1991; Neto e Schulte, 1998). Até 2001, cerca de 180 diferentes metabólitos foram identificados em papel-filtro (Mei *et al.*, 2001).

Desde a sua origem, a triagem neonatal foi direcionada à prevenção do retardo mental devido a causas metabólicas, quantificando ou identificando

substâncias que podem apresentar seus níveis no sangue aumentados ou diminuídos de acordo com a patologia estudada.

Conforme o “Centers for Disease Control and Prevention (CDC)” de Atlanta, USA, “a triagem neonatal para doenças metabólicas hereditárias e tratáveis é um tema de responsabilidade do sistema de saúde pública (CDC, 2001). E complementa: “a triagem efetiva de neonatos usando sangue seco em papel-filtro obtido logo após o nascimento, combinada com procedimentos de diagnóstico confirmatórios e tratamento adequado auxilia na prevenção do retardo mental e da morte prematura”.

A primeira referência à triagem neonatal em massa para uma doença infecciosa data de 1994 (Guerina *et al.*), com a descrição dos resultados de um programa de 12 anos no Estado de Massachussets, para a identificação precoce da toxoplasmose congênita. O método de triagem utilizado foi um teste ELISA para anticorpos de classe IgM anti-*Toxoplasma gondii* (Weiblen *et al.*, 1993). Os autores relatam os testes realizados em 635.000 neonatos, 52 dos quais infectados por transmissão placentária e tratados. Guerina e colaboradores acompanharam clinicamente 39 pacientes, até seis anos de vida, e concluíram que a triagem neonatal sistemática para toxoplasmose pode identificar infecções congênitas assintomáticas e que o tratamento precoce pode reduzir as severas seqüelas produzidas pela doença ao longo do tempo. Em 1996, durante o “Third Meeting of The International Society for Newborn Screening”, o tema “doenças infecciosas” ganhou espaço para a apresentação de alguns trabalhos isolados, com ênfase na experiência com triagem para HIV (Schedlbauer e Pass, 1996;

Canosa, 1996; Eaton *et al.*, 1996), abordagens sobre a inclusão de doenças infecciosas como citomegalovírus (CMV), hepatites B e C, herpes simplex (Grady, 1996), e um extenso debate sobre a melhor estratégia para a prevenção da toxoplasmose congênita: a triagem pré-natal (Black *et al.*, 1996) ou a triagem neonatal (Neto, 1996; Eaton *et al.*, 1996).

A triagem pré-natal para toxoplasmose é obrigatória na França (Jeannel *et al.*, 1988) e na Áustria (Aspöck *et al.*, 1992) e alguns projetos-pilotos foram realizados na Finlândia (Lappalainen *et al.*, 1992), Noruega (Stray-Pedersen *et al.*, 1979), Suécia (Ahlfors *et al.*, 1989) e Alemanha (Krausse *et al.*, 1993), baseados na pesquisa de IgG anti-*Toxoplasma gondii* em gestantes soronegativas, em amostras de sangue obtidas mensalmente.

Os testes de triagem neonatal oferecidos hoje no Brasil, pela rede pública, são: fenilcetonúria, hipotireoidismo congênito e anemia falciforme e outras hemoglobinopatias.

Além destes exames, o Centro de Triagem Neonatal (CTN) de Porto Alegre, oferece testes para aminoacidopatias, fibrose cística, galactosemia, deficiência de biotinidase, deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase, deficiência da desidrogenase de acilcarnitinas de cadeia média (MCAD), toxoplasmose congênita, doença de Chagas congênita, citomegalovirose congênita, rubéola congênita, sífilis congênita e SIDA congênita.

1.1. A RESPOSTA IMUNOLÓGICA

O sistema imune é constituído de quatro principais componentes aptos a interagir e proteger os indivíduos contra micróbios e outros organismos capazes de produzir doenças. São eles: o sistema imune humoral (produtor de anticorpos, imunoglobulinas), o sistema imune celular, o sistema do complemento e o sistema fagocitário (Barret *et al.*, 1997). Neste trabalho, apenas a resposta humoral será considerada.

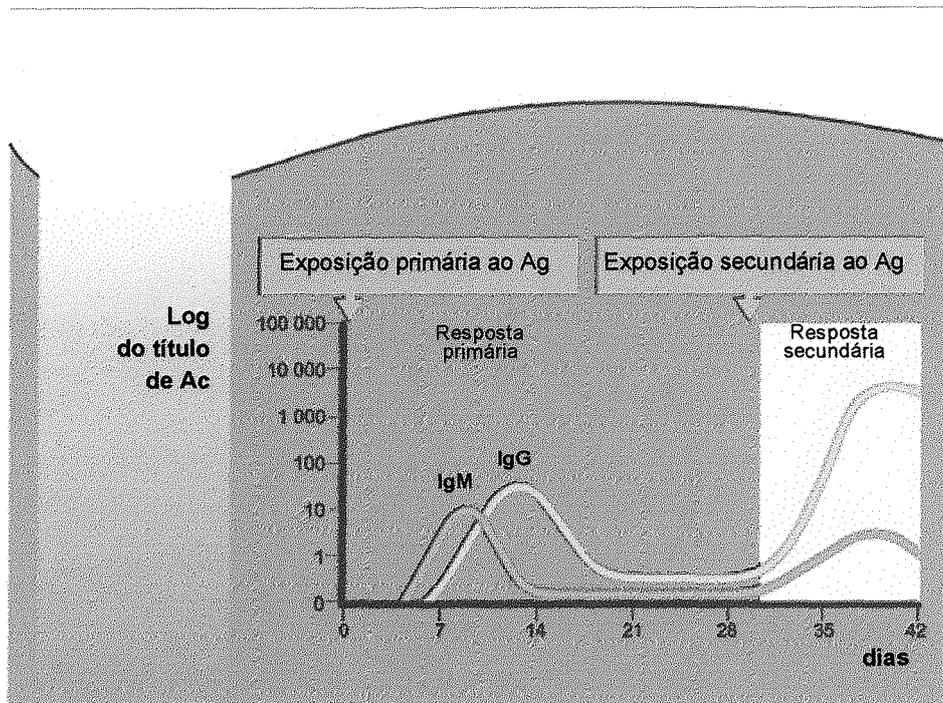
1.2. ESTRUTURA E FUNÇÃO DAS IMUNOGLOBULINAS

As imunoglobulinas são moléculas de múltiplas cadeias de glicoproteínas compostas de 80% a 95% de polipeptídios e 5% a 18% de carboidratos. As propriedades biológicas dos anticorpos são determinadas pelas suas estruturas polipeptídicas e a função dos carboidratos ainda não está bem esclarecida. Na sua forma monomérica, as moléculas de imunoglobulinas são compostas por duas idênticas cadeias pesadas e duas idênticas cadeias leves. Pontes dissulfeto entre resíduos de cisteína são essenciais para a estabilidade da estrutura tridimensional das imunoglobulinas. As ligações intracadeias separam as cadeias em domínios de tamanhos relativamente constantes, cada uma contendo aproximadamente 100 resíduos de aminoácidos. Uma grande variabilidade na seqüência de aminoácidos ocorre na porção N-terminal. Estes domínios, chamados de “regiões variáveis” das cadeias pesadas e das cadeias leves contribuem para a especificidade antigênica das imunoglobulinas. Os domínios C-terminais são designados como “regiões constantes” e são responsáveis pelas propriedades biológicas secundárias das imunoglobulinas, como o transporte

transmembrana, a liberação de histamina dos mastócitos e pela fixação do complemento.

Três fragmentos de tamanhos similares são produzidos: um fragmento cristalizável (Fc) consistindo de frações C-terminais de cadeias pesadas e dois fragmentos de ligação do anticorpo (Fab) constituídos de porções N-terminais de cadeias pesadas e de cadeias leves. Os dois fragmentos Fab de um anticorpo são idênticos e suas regiões variáveis os fazem unicamente capazes de reconhecer e ligar-se a um determinante antigênico específico. Na região variável de todas as cadeias de todas as imunoglobulinas há uma região hipervariável, que juntamente com sua conformação tridimensional, é responsável pela interação com o antígeno (especificidade). As imunoglobulinas representam um ampla variedade de proteínas com similaridades estruturais, mas exibem especificidades antigênicas e funções biológicas diversas. Diferenças na seqüência de aminoácidos produzem diferenças estruturais nas moléculas de imunoglobulinas e, em conseqüência, em suas propriedades biológicas (Barret *et al.*, 1997). As imunoglobulinas são classificadas em cinco classes: A, G, M, D e E. Neste trabalho, serão discutidas, essencialmente, as imunoglobulinas das classes G e M. A IgM é o principal componente da resposta imunológica primária, seguida da produção de IgG, o principal anticorpo presente na resposta imunológica secundária. Na Figura 1, a resposta imunológica clássica de produção de imunoglobulinas diante de uma infecção primária e de uma reinfecção.

Figura 1. A resposta imunológica.

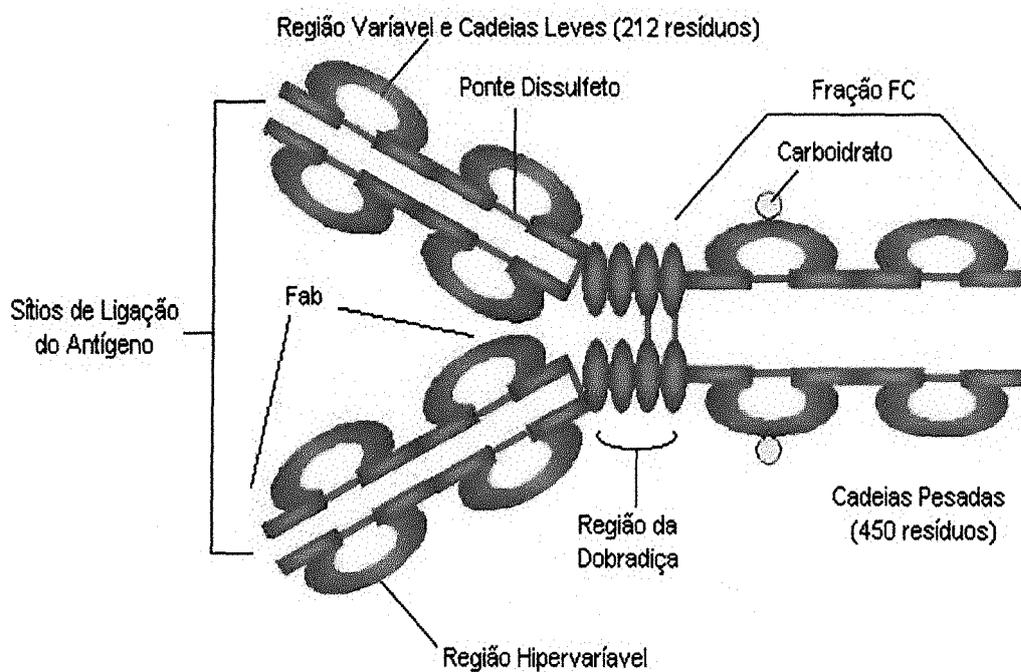


1.2.1. IMUNOGLOBULINA G (IgG)

As imunoglobulinas de classe G são as mais abundantes das imunoglobulinas séricas e respondem por 70% a 80% do total de imunoglobulinas circulantes, e a meia-vida de cada molécula é de cerca de quatro semanas. A IgG materna atravessa a barreira placentária e constitui-se na principal imunoglobulina sérica dos recém-nascidos até a produção endógena das mesmas tornarem-se prevalentes entre quatro a seis semanas de vida, após exposição a um antígeno. Quando da exposição inicial a um antígeno, a produção de imunoglobulina M (IgM) precede a produção de anticorpos de classe IgG. Uma subsequente exposição ao mesmo antígeno induz a uma rápida e prolongada resposta imune, na qual a maioria dos anticorpos produzidos são de classe IgG. Esta resposta, e a

longa meia-vida da IgG, torna esta molécula capaz de garantir uma prolongada imunidade (Barret *et al.*, 1997). O peso molecular de uma IgG é de, aproximadamente, 150.000 daltons (Feldkamp e Carey, 1996).

Figura 2. Estrutura básica da IgG.

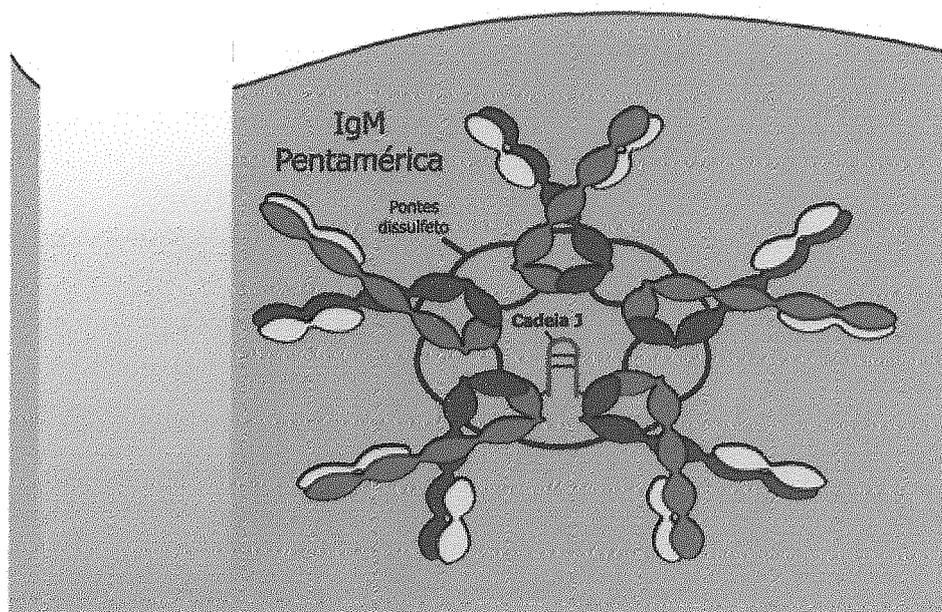


1.2.2. IMUNOGLOBULINA M (IgM)

As imunoglobulinas de classe M têm peso molecular de, aproximadamente, 900.000 daltons e são as maiores das imunoglobulinas poliméricas. Os cinco monômeros estruturais que compõem os anticorpos pentaméricos IgM são arranjados em uma distribuição radial, conectados por pontes dissulfeto intercadeias e uma cadeia de junção (cadeia J), de 15.000 daltons (Feldkamp e Carey, 1996).

As IgM constituem cerca de 10% do total das imunoglobulinas séricas e são os primeiros anticorpos produzidos durante o período fetal diante de uma infecção. Como o primeiro anticorpo a ser produzido após a exposição a um antígeno, as IgM são responsáveis pelo início da defesa humoral contra agentes infecciosos. A transferência passiva da IgM da mãe para o feto não acontece e, conseqüentemente, níveis elevados de IgM em recém-nascidos devem ser considerados um indicador de infecção congênita (Alford *et al.*, 1974). Cada molécula de IgM tem 10 sítios de combinação com o antígeno, tornando-a muito efetiva na opsonização e na aglutinação de bactérias. Estas propriedades levam a um aumento na remoção de antígenos pelo sistema reticuloendotelial. Aproximadamente 80% da concentração total de IgM está localizada no espaço intravascular. Na Figura 3, a representação de uma molécula de IgM.

Figura 3. Estrutura pentamérica da IgM.



1.2.3. TOXOPLASMOSE CONGÊNITA

Em geral, a infecção pelo *Toxoplasma gondii*, um parasita ubíquo, ocorre pela ingestão de cistos teciduais presentes na carne malcozida ou pela ingestão de oocistos presentes no solo ou na água e excretados, mais comumente, pelo gato (Wong *et al.*, 1993). Após a contaminação por humanos, evolui para a sua forma taquizoíta, responsável pela parasitemia aguda e posterior disseminação no organismo, e para a forma bradizoíta, que leva à infecção latente, com formação de cistos teciduais no sistema nervoso central e nos músculos esquelético e cardíaco (Gagne, 2001). A toxoplasmose também pode

ser transmitida de forma congênita, através da passagem transplacentária do parasita ao feto, em gestantes com infecção primária (Wong *et al.*, 1994), com prognóstico imprevisível, mas com seqüelas prevenidas ou reduzidas se o neonato for precocemente tratado (Foulon *et al.*, 1999; Villena *et al.*, 1998). Dependendo da idade gestacional em que o feto é atingido, a gestação pode resultar em aborto espontâneo, nascidos mortos, nascimento de prematuros ou crianças a termo infectadas. Alguns sintomas podem estar presentes no nascimento, especialmente retinocoreoidite e lesões no sistema nervoso, mas invariavelmente não há sinais clínicos presentes no período neonatal (Wallon *et al.*, 1999; Lebech *et al.*, 1999), podendo as seqüelas oftalmológicas e neurológicas manifestarem-se, de forma irreversível, tardiamente (Remington *et al.*, 2001).

Mulheres soronegativas têm elevado risco de infecção, geralmente assintomática e de diagnóstico clínico difícil (Zuber *et al.*, 1995). A triagem para toxoplasmose congênita durante o período pré-natal é obrigatória na França e na Áustria (Lebech *et al.*, 1999) e faz parte de projetos-pilotos em alguns países europeus (Neto *et al.*, 2000). Entretanto, não há consenso sobre a melhor forma de prevenção da toxoplasmose congênita. A triagem pré-natal implica em análise sérica mensal de gestantes soronegativas para toxoplasmose, com sensível aumento do custo, se comparada à triagem neonatal, e com a necessidade de métodos invasivos para a confirmação da infecção fetal. Deve-se avaliar, também, valores sócio-culturais que não garantem que todas as gestantes farão este acompanhamento, como demonstrado por Petry *et al.* (2000) que referem que apenas 35% de 91 gestantes soropositivas retornaram para um segundo exame

em um estudo realizado em um hospital público de Porto Alegre. Além disso, Wallon *et al.* (1999) relataram que, em cinco estudos, concluiu-se que a transmissão vertical é significativamente menor em mães que receberam tratamento, fato negado em outras quatro diferentes pesquisas citadas pelos autores. Concluem que não há evidências de que o possível tratamento da gestante possa ser mais importante do que os efeitos colaterais produzidos no feto pela toxicidade das drogas. Como afirmado por Eskild *et al.* (1996), a triagem pré-natal, após quase duas décadas de experiências, não contribuiu para uma melhor compreensão da história natural da doença ou da eficácia do tratamento antiparasitário em gestantes.

De acordo com Lebech *et al.* (1999), o risco de transmissão materno-fetal do *Toxoplasma gondii* é de 29%. No entanto, este percentual é mascarado por um acentuado aumento de risco de 6% na 13^a semana de gestação para 40% na 26^a semana e para 72% na 36^a semana. Assim, a pesquisa da IgM se justifica por poder detectar as infecções contraídas no final da gestação, com menor risco de dano no feto e, conseqüentemente, com maior probabilidade de um bom prognóstico com a instituição do tratamento precoce, baseado na administração de pirimetamina, sulfadiazina e ácido folínico. Os mesmos autores concluem que a triagem neonatal baseada na pesquisa de anticorpos específicos de classe IgM pode detectar até 80% dos casos de toxoplasmose congênita.

A infecção pelo parasita é mais prevalente em algumas regiões da Europa, do Caribe e da América do Sul do que na Ásia, Estados Unidos e Austrália (Pinon *et al.*, 2001). A soroprevalência (identificação de anticorpos de

classe IgG anti-*Toxoplasma gondii*) na Europa varia de 20% na região norte a 60% na região sul. Em um estudo com 27.516 neonatos, uma prevalência de 1/2.117 foi estimada na Polônia (Paul *et al*, 2001). Nos Estados Unidos, estima-se que 85% das mulheres em idade gestacional são suscetíveis à infecção pelo *Toxoplasma gondii* (Jones *et al*, 2001). No Rio Grande do Sul, Estado com algumas regiões endêmicas, a alta prevalência de lesões oculares decorrentes da toxoplasmose tem sido amplamente discutida (Glasner *et al*, 1992; Melamed *et al*, 1992). Em estudo prévio, com 141.000 neonatos (Neto *et al*, 2000), uma prevalência de toxoplasmose congênita de 1 em cada 3.000 nascidos vivos foi estimada no Brasil. O único relato de triagem neonatal para toxoplasmose congênita é o de Guerina *et al* (1994), no Estado de Massachussets, USA.

1.2.4. DOENÇA DE CHAGAS CONGÊNITA

A doença de Chagas é uma infecção parasitária causada pelo *Trypanosoma cruzi* e transmitida pelo inseto *Triatoma infestans*, que se manifesta sob várias formas: aguda, indeterminada e crônica. A fase aguda, quando aparente, é caracterizada por miocardite (na maioria das vezes) só identificada pelo eletrocardiograma. Passada a fase aguda, o indivíduo permanece na forma indeterminada: infecção assintomática, que pode nunca se evidenciar clinicamente ou manifestar-se anos ou décadas depois da infecção inicial. As formas crônicas, com expressão clínica, podem ser:

- cardíaca: a mais importante forma de limitação no doente chagásico e a principal causa de morte. Pode ser assintomática, mas com alterações eletrocardiográficas (principalmente bloqueio completo de ramo direito), ou ainda

como síndrome de insuficiência cardíaca progressiva, insuficiência cardíaca fulminante, ou com arritmias graves e morte súbita;

- digestiva: alterações ao longo do trato digestivo, ocasionadas por lesões dos plexos nervosos (destruição neuronal simpática), com conseqüentes alterações da motilidade e morfologia, sendo o megaesôfago e o megacólon as manifestações mais comuns;

- forma mista: quando o paciente associa a forma cardíaca com a digestiva, podendo apresentar mais de um mega;

- formas nervosas e de outros megas: são aventadas, mas não parecem ser manifestações importantes da doença;

- forma congênita, cujos principais sinais clínicos, quando presentes, são a hepatomegalia, esplenomegalia, icterícia, equimoses e convulsões decorrentes da hipoglicemia. Não há relato de ocorrência de febre (Centro Nacional de Epidemiologia, 1999).

Embora questionável, Freillij *et al.* (1995) afirmam que a doença de Chagas é o maior problema de saúde pública da América Latina, afetando cerca de 20 milhões de pessoas dos Estados Unidos à Argentina, podendo a prevalência da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em gestantes variar de 2% a 51% em áreas urbanas e até 23% a 81% em áreas rurais. Os mesmos autores enfatizam que a grande migração de pessoas provenientes de zonas endêmicas para a cidade de Buenos Aires (área não-endêmica) justifica que 6% a 8% das

gestantes que têm filhos em hospitais públicos apresentam sorologia positiva para a doença de Chagas, e 3% a 4% dos recém-nascidos são infectados. Estima-se que 90 milhões de pessoas estão sob risco de infecção na América Latina (Wanderley *et al.*, 1995). A doença congênita é descrita em vários países, mas é na América Latina que a maior prevalência tem sido demonstrada, como no Chile (Schenone *et al.*, 2001), México (Guzman-Bracho *et al.*, 1998), Uruguai (com 3,4% de infectados em zonas endêmicas) (Mancebo *et al.*, 1999); na Província de Salta, na Argentina, onde um programa de controle da infecção perinatal foi recomendado por Zaidenberg (1999). Na mesma Província, ênfase especial é dada à detecção dos casos de transmissão congênita da doença de Chagas e aos benefícios econômicos decorrentes da sua prevenção. Entre 1964 e 1985, dados soroepidemiológicos revelaram uma redução de 22,7% para 11,1% de indivíduos infectados e 0,96% de universitários infectados em 1998, na mesma região. Uma soroprevalência de 37% foi demonstrada em índios da região de Chaco, em Salta, e, em cinco outras localidades, mais de 54% da população é infectada (Basombrio *et al.*, 1999). Na área de Guemes, também em Salta, a infecção atinge 12,3% das gestantes e 8,8% dos recém-nascidos (Contreras *et al.*, 1999), e 5,5% das gestantes e 6,7% dos neonatos na região de Tucumán (Blanco *et al.*, 2000). Altos níveis de transmissão materno-fetal da doença de Chagas também foram descritos em Belize, no Caribe, 7,1%; El Salvador, 8,2%; Guatemala, 5,1%, Honduras, 6,2% (Jaramillo *et al.*, 1997); Bolívia, 9,5% (Azogue, 1993) e 7,7% a 10,5% no Paraguai (Russomando *et al.*, 1998). A probabilidade de transmissão vertical do *Trypanosoma cruzi* na Argentina foi estimada entre 2,6% e 6,7% (Blanco *et al.*, 1999). Esta forma de transmissão não pode ser prevenida, mas a

detecção e o tratamento precoce podem alcançar índices de cura próximos de 100%. Todos os indivíduos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* podem ser tratados com sucesso pelo uso de nifurtimox ou de benzonidazol. (Blanco *et al.*, 2000; Contreras *et al.*, 1999; Schenone *et al.*, 2001). Estudos com 100 imigrantes latino-americanos na Alemanha, revelaram que 2% eram portadores de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi*, e os autores sugerem que testes sorológicos de rotina em indivíduos desta origem devem ser realizados a fim de diminuir o risco de transmissão tanto por transfusão de sangue quanto por transmissão materno-fetal (Frank *et al.*, 1997). No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, não há estimativa do total de casos existentes por se tratar de uma doença que, no início, é assintomática, embora alguns programas de controle tenham obtido bons resultados no combate à transmissão vetorial em vários Estados (Wanderley *et al.*, 1995). Um estudo realizado com trabalhadores da construção em Bambuí, Minas Gerais, demonstrou um índice de 11,9% de soropositivos (Dias, 1993).

Não há relato de triagem neonatal, massiva ou em zonas endêmicas, para doença de Chagas.

1.2.5. CITOMEGALOVIROSE CONGÊNITA

O CMV é um vírus DNA, membro da família dos herpes vírus, e é responsável pela infecção congênita mais comum nos países desenvolvidos. Tanto a infecção primária quanto a infecção recorrente pode resultar em infecção fetal. A prevalência de nascidos vivos infectados pelo CMV varia de 0,3% a 2,4%

e, pelo menos, 90% dos neonatos infectados não apresentam sinais clínicos da doença (Peckman *et al.*, 2001). A infecção congênita pelo CMV permanece sendo a principal causa de malformações congênitas em países desenvolvidos e pode provocar uma série de sintomas: prematuridade (paciente assintomático, mas infectado), encefalite, perda de audição, distúrbios hematológicos e morte. A infecção perinatal costuma apresentar sintomas menos severos, desde crianças assintomáticas até infecção aguda com hepatite, febre e pneumonite (Trincado *et al.*, 2001). Recém-nascidos infectados pelo CMV como resultado da infecção primária têm maior risco do que neonatos com reativação da infecção. Retinocoreoidite ocorre em 10% a 15% dos neonatos sintomáticos que, na maioria dos casos, apresentam significativo retardo mental. Microcefalia ocorre no nascimento em cerca de 50% dos infectados, mas quase sempre não persiste e não implica, necessariamente, em futura deficiência neurológica. Surdez tardia é imprevisível, e todas as crianças identificadas com citomegalovirose congênita devem ter um acompanhamento audiológico. A mortalidade entre as crianças sintomáticas é de cerca de 30% (Jones *et al.*, 1995). Há quase uma década (Harris *et al.*, 1984) já se questionava a vacinação contra a citomegalovirose congênita e recomendava-se a triagem dos recém-nascidos, a fim de identificar crianças com alto risco de desenvolver surdez e tornar possível a reabilitação precoce.

A alta prevalência de CMV na população em geral, a impossibilidade de prognosticar a transmissão materno-fetal e a natureza assintomática da doença em mulheres sadias representam um desafio e requerem um esforço conjunto para a prevenção e o tratamento (Damato *et al.*, 2002). Um tratamento com

sucesso, usando ganciclovir e imunoglobulina anticitomegalovírus foi descrito no Japão (Weng *et al.*, 2003).

Não há relato, na literatura, de triagem neonatal massiva para citomegalovirose congênita.

1.2.6. RUBÉOLA CONGÊNITA

A rubéola foi reconhecida como entidade clínica em 1815, descrita como “um exantema confundível com escarlatina”. Foi considerada benigna e com poucas complicações, até ser relacionada a crianças que apresentaram catarata e defeitos cardíacos congênitos durante um surto epidêmico na Austrália (Gregg, 1941).

A Síndrome da Rubéola Congênita (SRC) geralmente é grave e pode acometer 40 a 60% dos recém-nascidos cujas mães foram infectadas durante os dois primeiros meses de gestação; 30 a 35%, no 3º mês de gestação; 10%, quando a infecção na gestação se dá durante o 4º mês, sendo mais raro o acometimento após a 20ª semana. Os principais sintomas da infecção intrauterina são: aborto espontâneo, malformação congênita de grandes órgãos e sistemas oculares (microoftalmia, retinopatia, glaucoma e catarata), cardíaco (persistência de ducto arterial, defeitos do tabique interauricular e interventricular, estenose da artéria pulmonar), deficiência auditiva e alterações neurológicas (meningoencefalite, retardo mental), púrpura, esplenomegalia e osteopatia radiolúcida. É possível a ocorrência de formas leves, com surdez parcial ou pequenas deficiências cardíacas, que só serão diagnosticadas muitos anos após o

nascimento. Embora a doença não disponha de tratamento específico, a detecção precoce de deficiência auditiva representa uma significativa melhora para o desenvolvimento da linguagem. A infecção é tanto mais grave quanto mais precoce for a contaminação do feto. (Secretaria de Estado da Saúde do Paraná, 2002). No Brasil, os dados sobre a doença são muito pobres. Em 1986, foi realizado inquérito sorológico em cinco capitais brasileiras, em mulheres na faixa etária de 10 a 21 anos. Encontrou-se, em 5.600 amostras, uma prevalência de anticorpos para rubéola de 70,9%, o que significa que havia um contingente significativo de mulheres em idade fértil expostas ao risco de contrair a rubéola no curso da gestação (Secretaria de Estado da Saúde do Paraná, 2002).

Desde a implantação de programas de vacinação em 1969, a incidência de rubéola e da SRC caiu significativamente (CDC, 1999). Entretanto, surtos de rubéola continuam ocorrendo, apesar do amplo uso da vacina tríplice para sarampo, caxumba e rubéola. Durante a segunda metade da década de 90, estes surtos foram caracterizados pelo aumento do número de casos em adultos jovens de países que não têm ou que apenas recentemente instituíram programas nacionais de vacinação para rubéola (CDC, 2001). Cutts e Vynnycky (1999) revisaram a literatura para identificar estudos de prevalência de anticorpos antivírus da rubéola em países em desenvolvimento, conduzidos com amostras sem maiores vícios de seleção, previamente à vacinação em massa no país. A prevalência média de rubéola congênita por 100.000 nascidos vivos foi mais baixa no Leste do Mediterrâneo (77,4; variação: 0-212) e mais alta nas Américas (175; variação: 0-598). A média estimada do total de casos de rubéola congênita em países em desenvolvimento em 1996 foi de aproximadamente 110.000, variando

de 14.000 a 308.000. Os autores concluíram que a rubéola é um problema de saúde pública subidentificado em muitos países em desenvolvimento, e que há uma urgente necessidade de obtenção de dados para estimar a relação custo/benefício de um programa global de controle da rubéola. Endossando este pensamento, o acompanhamento de doze pacientes com rubéola congênita e com importante morbidade na Argentina, demonstrou, segundo os autores, que este é um problema ainda não resolvido naquele país (Altcheh *et al.*, 1999).

Não há relato, na literatura, de triagem neonatal massiva para rubéola congênita.

1.3. JUSTIFICATIVA

A toxoplasmose, a doença de Chagas, a citomegalovirose e a rubéola são doenças graves, limitantes, de grande impacto social, com alto custo de tratamento para pacientes diagnosticados tardiamente, o que ocorre na maioria dos casos, uma vez que são quase sempre assintomáticas no nascimento. Sua detecção e tratamento precoce permitem diminuir os custos sociais e o estresse familiar, além de um melhor prognóstico e uma melhor qualidade de vida dos indivíduos afetados. Em um país continental, com milhares de pessoas vivendo sem condições adequadas de higiene e com alimentação precária, é de se esperar um significativo percentual de mulheres em idade fértil sob risco de infecções capazes de lesar o feto.

As técnicas de detecção devem ser baratas, de boa sensibilidade e especificidade, fácil manuseio e passíveis de aplicação em larga escala, se

possível utilizando a mesma amostra de sangue seco em papel-filtro obtida para os testes de triagem neonatal já rotineiros no Brasil (fenilcetonúria, hipotireoidismo congênito e hemoglobinopatias).

Esses fatos tornam justificado e recomendável um estudo que estime a prevalência dessas patologias em recém-nascidos no nosso meio, baseado no desenvolvimento de técnicas apropriadas para a sua detecção em amostras de sangue em papel-filtro.

1.4. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

1. Desenvolver e/ou adaptar processos simples, automatizáveis, de baixo custo e aplicáveis em larga escala para a detecção de doenças infecciosas selecionadas em amostras de sangue seco impregnado em papel-filtro;
2. estimar a prevalência de 4 infecções congênitas (toxoplasmose, doença de Chagas, citomegalovirose e rubéola) em neonatos que realizam testes de triagem neonatal para doenças metabólicas;
3. comparar a relação de custo entre a triagem neonatal de doenças metabólicas atualmente em vigor no país, oferecido pelo Sistema Único de Saúde, com a triagem neonatal de infecções congênitas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. AMOSTRAS

Amostras de sangue de calcâneo foram impregnadas em papel-filtro Schleicher and Schuell 903 (Keene, NH, USA), entre o terceiro e o vigésimo dia de vida do neonato (média de dez dias). As amostras secaram à temperatura ambiente. As de fora de Porto Alegre, foram recebidas através da Empresa Brasileira de Correios e Telégrafos, provenientes de diversos locais do país.

Os testes para toxoplasmose foram realizados entre outubro de 1995 e abril de 2002. Os testes para doença de Chagas, citomegalovirose e rubéola foram realizados entre fevereiro de 2000 a abril de 2002.

As amostras foram encaminhadas por maternidades ou laboratórios privados de todo o país, conveniados com o CTN, e acompanhados de uma requisição padrão de exames com dados do neonato, indicando os exames a ser feitos. A requisição deve ser assinada pelo responsável pelo neonato, autorizando a realização dos exames, e contém a observação de que “resultados alterados podem exigir a obtenção de nova amostra para confirmação do diagnóstico”.

Modelo (frente e verso) da requisição de exames pode ser visto nas Figuras 4 e 5.

Figura 4. Modelo da requisição de exames do CTN (frente).

	<h3>REQUISIÇÃO DE EXAMES</h3> <p>Av. Ipiranga, 5000 - Cep 90610-000 Porto Alegre - RS - Fone/Fax: (51) 3339.5000 Home-Page: www.ctn.com.br - e-mail: ctn@ctn.com.br</p>	 <p><i>Toda bebê merece este cuidado</i></p>
<p>ASSINALE O TESTE DO PEZINHO CTN DESEJADO:</p> <p> <input type="checkbox"/> MASTER <input type="checkbox"/> PLUS <input type="checkbox"/> AMPLIADO <input type="checkbox"/> BÁSICO </p> <p>REALIZAR TAMBÉM OS SEGUINTE EXAMES OPCIONAIS:</p> <p> <input type="checkbox"/> SURDEZ CONGÊNITA NÃO SINDRÔMICA <input type="checkbox"/> ESPECTROMETRIA DE MASSA EM TANDEM (MS/MS) <input type="checkbox"/> MCAD <input type="checkbox"/> HIV 1 e 2 <input type="checkbox"/> _____ </p>		<p>REQUISITANTE</p> <p>CÓDIGO _____ CONTROLE _____</p> <p>CADASTRO _____</p>
<h4>DADOS DO RECÉM-NASCIDO</h4>		
<p>NOME DO BEBÊ _____</p>		
<p>PAI _____</p>		
<p>MÃE _____</p>		
<p>ENDEREÇO _____</p>		
<p>NÚMERO _____</p>	<p>APTO. _____</p>	<p>BLOCO _____</p>
<p>BAIRRO _____</p>		
<p>CIDADE _____</p>	<p>UF _____</p>	<p>CEP _____</p>
<p>FONE _____</p>		
<p>GÊMEOS <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO </p>	<p>PESO AO NASCER _____ GRAMAS</p>	<p>DATA NASC. ____/____/____</p>
<p>PREMATURO <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO </p>	<p>TEMPO DE GESTAÇÃO _____ SEMANAS</p>	<p>SEXO <input type="checkbox"/> M/1 <input type="checkbox"/> F/2</p>
<p>PAIS CONSANGÜÍNEOS <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO</p>		<p>DATA DA COLETA ____/____/____</p>
<p>PARTO <input type="checkbox"/> NORMAL <input type="checkbox"/> CESARIANA</p>		<p>COR _____</p>
<p>TRANSFUSÃO? <input type="checkbox"/> SIM - DATA: ____/____/____ </p>	<p>VISTO DO CREDENCIADO _____</p>	<p>DATA ____/____/____</p>
<p>NOME DO PEDIATRA _____</p>		<p>FONE DO PEDIATRA _____</p>

Figura 5. Modelo da requisição de exames do CTN (verso).

TESTE DO PEZINHO CTN: ALTERNATIVAS					
DETERMINAÇÕES	DOENÇAS	TIPOS DE TESTES			
		MASTER	PLUS	AMPLIADO	BÁSICO
PKU	Fenilcetonúria				
Espectrometria de Amidoácidos	Fenilcetonúria e outras aminoacidopatias				
Hb S, Hb C, Hb E e Talassemias	Arenas Facótimas e outras Hemoglobinopatias				
TSH	Hipotireoidismo Congênito				
T4	Hipertireoidismo Congênito				
17-OH-Progesterona	Hiperplasia Adrenal Congênita				
IFT	Fibrose Cística				
Galactose e Galactose-1-Fosfato	Galactosemia				
Atividade da Biotinidase	Deficiência de Biotinidase				
IgM anti-Tropomiosina posível	Trombocitose Congênita				
Atividade da Glicose-6-Fosfato Desidrogenase	Deficiência de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase				
IgM anti-Tropomiosina possível	SF86 Congênita				
IgM anti-Chromogreina	Chromogreina Congênita				
Anticorpos totais anti-Tropomiosina posível	Duquesa de Clermont Congênita				
IgM anti-Vírus da Rubéola	Rubéola Congênita				
Positividade da Mutação 350delG da Catepsina	Sandus Congênita (Catepsina 35)*				
Espectrometria de Massa em Tandem (MS/MS)	Acidos Orgânicos e Aminoácidos patológicos*	*EXAMES OPCIONAIS			
Resposta da Mutação G855A da MCHAD	Deficiência da MCHAD*				
Anticorpos anti-HIV 1 e 2	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA)*				

AUTORIZAÇÃO

Adianto o CTN Diagnósticos, através deste credenciado, a obter amostras de sangue de meu filho para realização do Teste do Pezinho CTN. Estou devidamente informado de que resultados alterados podem exigir a obtenção de nova amostra para confirmação do diagnóstico.

DATA	NOME DO RESPONSÁVEL	ASSINATURA
------	---------------------	------------

CTN Diagnósticos

<p>Tipo de Exame</p> <ul style="list-style-type: none"> • Triagem Neonatal • Diagnóstico de Doenças Raras • Diagnóstico de Doenças em Neonatos (MS/MS) • Diagnóstico de Doenças em Crianças • Diagnóstico de Doenças em Adultos 	<p>Genética Molecular</p> <ul style="list-style-type: none"> • Análise de Alterações Cromossômicas de Doenças • Análise de Alterações Cromossômicas <p>Clonagem</p> <ul style="list-style-type: none"> • Diagnóstico prenatal • Diagnóstico neonatal • Diagnóstico em recém-nascidos • Diagnóstico em adultos 	<p>Erros Inatos do Metabolismo</p> <ul style="list-style-type: none"> • Triagem Neonatal • Diagnóstico de Doenças em Neonatos (MS/MS) • Diagnóstico Neonatal • Diagnóstico em Adultos • Diagnóstico <p>Grupos Especiais</p> <ul style="list-style-type: none"> • Infância • Pré-natal e Pós-natal • Diagnóstico em recém-nascidos
---	---	---

IMPORTANTE: VERIFIQUE SEMPRE NOSSAS RECOMENDAÇÕES NO MANUAL DE PROCEDIMENTOS DE COLETA E REMESSA.

2.2. EQUIPAMENTOS

Leitora de microplacas MRX, Dinex Technologies, Chantilly, VA, USA.

Leitora de microplacas Spectra I, SLT Labinstruments, Salzburg, Austria.

Fluorômetro Fluoroskan, AniLabsystem Oy, Helsinki, Finland.

Agitador de placas Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Germany.

2.3. TESTES EM PAPEL-FILTRO

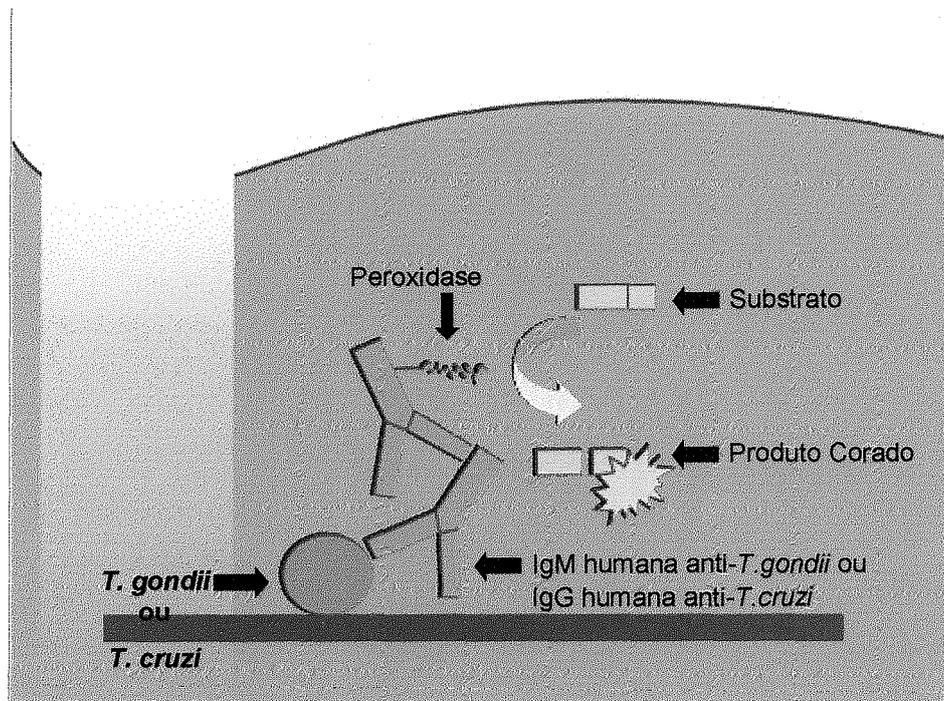
2.3.1. Ensaio para IgM anti-*Toxoplasma gondii*

2.3.1a. Enzimaimunoensaio indireto para IgM anti-*Toxoplasma gondii*

O *Toxoplasma gondii* foi obtido a partir de taquizoítas cultivados em meio de Eagle contendo albumina bovina a 10%, purificado e rompido por sonicação (obtido junto à TRILAB, São Paulo, SP, Brasil) e usado como antígeno na marcação de microplacas de poliestireno. 100 µL suspensão do antígeno em tampão carbonato/bicarbonato, pH 9,8, foram aplicados a cada poço das microplacas e incubado por 18 horas, a 37°C. Discos de 6 mm de sangue total em papel-filtro foram colocados em cada poço e o sangue foi eluído com tampão fosfato-salina, pH 7,4 (PBS), contendo 1% de albumina bovina (tampão PBS/BSA), durante 1 hora, à temperatura ambiente, sob agitação. As placas foram lavadas quatro vezes com PBS e incubadas por 30 minutos, à temperatura ambiente, com 100 µL de anticorpo de carneiro anti-IgM humana, diluído 1:1.000 e conjugado à peroxidase (Genzyme Diagnostics, Cambridge, USA). As placas foram lavadas como na etapa anterior e 200 µL do substrato cromógeno (solução

de H₂O₂ e tetrametilbenzidina) foram adicionados, em nova incubação de 30 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A reação foi inibida com 50 µL de ácido hidrolórico 2 N e as densidades óticas (DO) medidas a 450 nm. Para cálculo do ponto de corte, valor de DO que discrimina as amostras entre negativas e positivas, amostras de 105 neonatos sabidamente não infectados foram testadas e obteve-se uma DO média de 0,035. O ponto de corte foi calculado como três vezes a média das DOs das amostras negativas e fixado em 0,100. Uma amostra era classificada como normal se apresentasse DO inferior a 0,100; inconclusiva, se a DO variasse entre 0,100 e 0,200; e presuntivamente positiva se a DO fosse superior a 0,200 e confirmada em nova análise em duplicata. Material para controle de qualidade interno foi preparado a partir de diluições de soro humano contendo IgM anti-*Toxoplasma gondii* em uma mistura de soros negativos, com quantidades iguais do soro positivo diluído e de hemácias humanas do grupo "O" negativo, obtendo-se um hematócrito de 50%. 100 µL desta suspensão foram aplicados em papel-filtro de forma a obter-se DOs de 0,100; 0,150 e 0,200 ± 10%. A sensibilidade do método foi testada aplicando-se em papel-filtro 39 amostras anti-*Toxoplasma gondii* IgM positivas. Todas as amostras apresentaram valores de DO superiores ao ponto de corte, estimando-se uma sensibilidade analítica preliminar de 100%. O esquema da reação pode ser observado na Figura 6.

Figura 6. Princípio do método EIA para pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* e anti-*T. cruzi*.

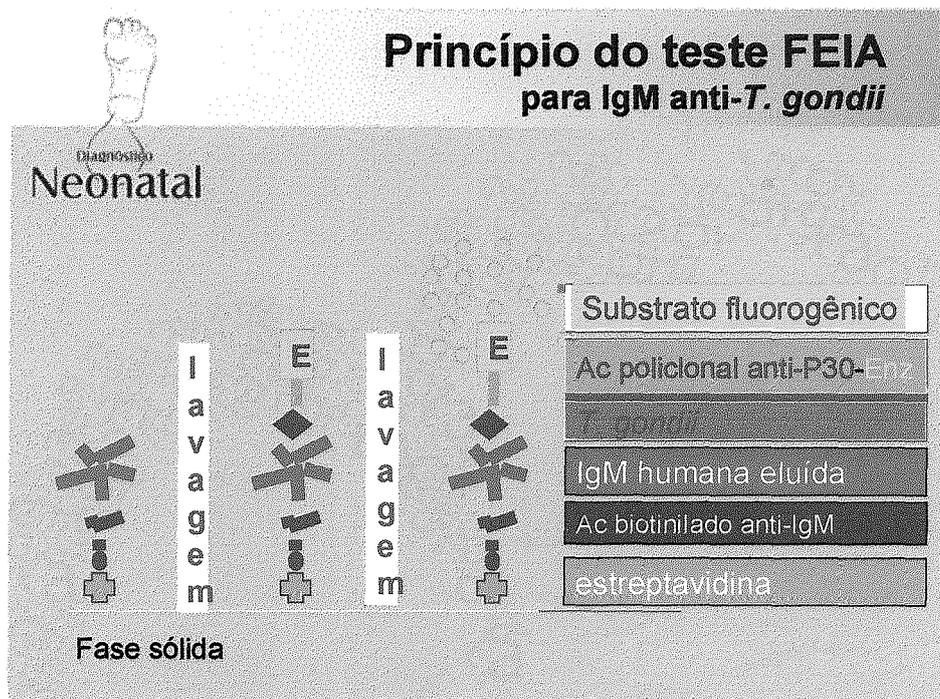


2.3.1b. Imunoensaio enzimático-fluorimétrico (FEIA) por captura de IgM anti-*Toxoplasma gondii*

Foi utilizado kit produzido por AniLabsystems (Helsinki, Finlândia). Sangue total de discos de 3,2 mm foi eluído com 150 μ L de solução contendo anticorpos anti-IgM humana em placa de poliestireno, recobertas com um sistema estraptavidina-avidina ligado a anticorpo policlonal de carneiro anti-IgM humana. Após incubação (16 horas, a 4°C) e quatro lavagens da placa com PBS, 150 μ L de solução contendo cepa RH sonicada do antígeno (*Toxoplasma gondii*) e um anticorpo

monoclonal antiproteína de membrana P30 do *Toxoplasma gondii* marcado com peroxidase foram adicionados à placa. Após uma hora à temperatura ambiente e nova lavagem da placa, 150 µL de um substrato fluorogênico, ácido 3-p-hidroxifenilpropiónico, foram adicionados à placa, sofrendo a ação da peroxidase em meio contendo H₂O₂. A reação foi concluída com a adição de tampão glicina, pH 10,3, e a fluorescência, proporcional à concentração de IgM, foi medida em 405 nm (filtro de excitação de 320 nm). O kit é acompanhado de controles identificados como negativo, ponto de corte, positivo baixo e positivo alto. Para evitar a perda de casos positivos com baixos títulos de IgM específica, definiu-se que todos os neonatos cujas amostras apresentassem fluorescência 20% inferior à do controle do ponto de corte seria reconvocada para testes sorológicos confirmatórios.

Figura 7. Princípio do método FEIA para pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii*.



2.3.2. Ensaio imunoenzimático para IgG anti-*Trypanosoma cruzi*

Foi utilizado kit produzido por Wiener lab (Rosario, Argentina) para a detecção de anticorpos de classe IgG anti-*Trypanosoma cruzi* em soro humano, adaptado para uso em amostras de sangue total em papel-filtro. Sangue total de discos de 3,2 mm foi eluído com 200 μ L de tampão PBS/BSA em microplacas marcadas com o *Trypanosoma cruzi* e incubados 14-16 horas à temperatura ambiente. Após cinco lavagens da placa com tampão PBS, 50 μ L de anticorpo de cabra anti-IgG humana marcado com peroxidase foram adicionados e incubados por 1 hora à temperatura ambiente. Após nova lavagem, 100 μ L da solução do substrato (H_2O_2 e tetrametilbenzidina), foram colocados nas microplacas e incubados por 30 minutos, à temperatura ambiente e no escuro. A reação foi inibida pela adição de 50 μ L de ácido sulfúrico 2N e as DOs foram lidas em 450 nm. Testes com 95 amostras sabidamente negativas preparadas em papel-filtro mostraram uma DO média de 0,150. O ponto de corte foi calculado como três vezes a média das DOs das amostras negativas e fixado em 0,450. Uma amostra era classificada como normal se apresentasse DO inferior a 0,350; inconclusiva, se a DO variasse entre 0,350 e 0,600; e presuntivamente positiva se a DO fosse superior a 0,600 e confirmada em nova análise em duplicata. Como descrito em 2.3.1a, um controle negativo, um controle do ponto de corte e um controle positivo foram preparados a partir de amostras positivas, a fim de obter-se DOs de 0,150; 0,350 e $0,800 \pm 10\%$. A sensibilidade do método foi testada aplicando-se em papel-filtro 43 amostras anti-*Trypanosoma cruzi* IgG positivas. Todas as amostras apresentaram valores de DO superiores ao ponto de corte, estimando-se uma

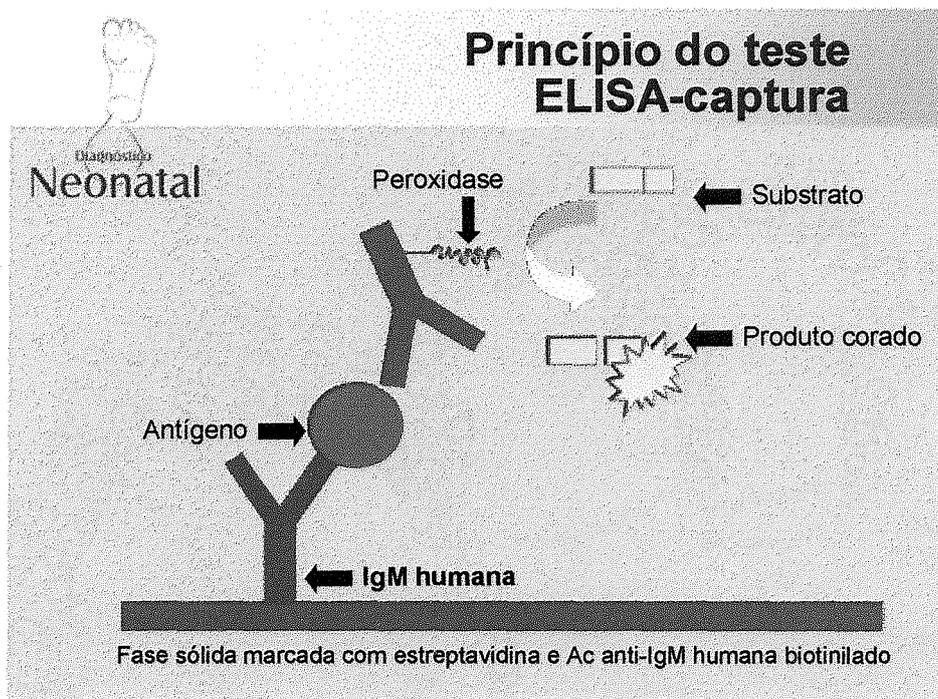
sensibilidade analítica preliminar de 100%. O esquema da reação pode ser observado na Figura 6, página 28.

2.3.3. Ensaio imunoenzimático (ELISA) por captura de IgM anti-CMV

Foi utilizado kit produzido por Dienes Diagnostica Senese (Monteriggioni, Itália) para a detecção de anticorpos de classe IgM anti-CMV em soro humano, adaptado para uso em amostras de sangue total em papel-filtro. Sangue total de discos de 3,2 mm foi eluído com 150 µL de tampão PBS/BSA, em microplacas marcadas com anticorpo monoclonal anti-IgM humana por 2 horas (1ª hora sob agitação), à temperatura ambiente. Após quatro lavagens da placa com PBS, 100 µL de solução contendo citomegalovírus purificado e anticorpo monoclonal anticitomegalovírus marcado com peroxidase foram adicionados e incubados por 2 horas, à temperatura ambiente. Após nova lavagem, 100 µL da solução de substrato (H₂O₂ e tetrametilbenzidina) foram colocados nas microplacas e incubados por 30 minutos, à temperatura ambiente e no escuro. A reação foi inibida pela adição de 50 µL de ácido sulfúrico 0,3 mol/L e as DOs foram lidas em 450 nm. Testes com 86 amostras sabidamente negativas preparadas em papel-filtro mostraram uma DO média de 0,160. O ponto de corte foi calculado como três vezes a média das DOs das amostras negativas e fixado em 0,450. Uma amostra era classificada como normal se apresentasse DO inferior a 0,350; inconclusiva, se a DO variasse entre 0,350 e 0,600; e presuntivamente positiva se a DO fosse superior a 0,600 e confirmada em nova análise em duplicata. Como descrito em 2.3.1a, um controle negativo, um controle do ponto

de corte e controles positivos foram preparados a partir de amostras positivas, a fim de obter-se DOs de 0,150; 0,350 e 0,800 ± 10%. A sensibilidade do método foi testada aplicando-se em papel-filtro 40 amostras anti-CMV IgM positivas. Todas as amostras apresentaram valores de DO superiores ao ponto de corte, estimando-se uma sensibilidade analítica preliminar de 100%.

Figura 8. Princípio do método ELISA para pesquisa de anticorpos anticitomegalovírus e antivírus da rubéola.



2.3.4. Ensaio imunoenzimático (ELISA) por captura de IgM antivírus da rubéola

Foi utilizado kit produzido por Diesse Diagnostica Senese (Monteriggioni, Itália) para a detecção de anticorpos de classe IgM antivírus da

rubéola em soro humano, adaptado para uso em amostras de sangue total em papel-filtro. Sangue total de discos de 3,2 mm foi eluído com 150 μ L de tampão PBS/BSA, em microplacas marcadas com anticorpo monoclonal anti-IgM humana por 1 hora, sob agitação, à temperatura ambiente. Após quatro lavagens da placa com PBS, 100 μ L de solução contendo vírus da rubéola purificado e anticorpo monoclonal antivírus da rubéola marcado com peroxidase foram adicionados e incubados por 1 hora, à temperatura ambiente. Após nova lavagem, 100 μ L da solução de substrato, H_2O_2 e tetrametilbenzidina, foram colocados nas microplacas e incubadas por 30 minutos, à temperatura ambiente e no escuro. A reação foi inibida pela adição de 50 μ L de ácido sulfúrico 0,3 mol/L e as DOs foram lidas em 450 nm. Testes com 90 amostras negativas preparadas em papel-filtro mostraram uma DO média de 0,280. O ponto de corte foi calculado como três vezes a média das DOs das amostras negativas e fixado em 0,840. Uma amostra era classificada como normal se apresentasse DO inferior a 0,650; inconclusiva, se a DO variasse entre 0,650 e 1,000; e presuntivamente positiva se a DO fosse superior a 1,000 e confirmada em nova análise em duplicata. Como descrito em 2.3.1a, um controle negativo, um ponto de corte e um controle positivo foram preparados a partir de amostras séricas positivas, a fim de obter-se DOs de 0,300; 0,850 e $1,500 \pm 10\%$. A sensibilidade do método foi testada aplicando-se em papel-filtro 44 amostras de sangue total antivírus da rubéola IgM positivas. Todas as amostras apresentaram valores de DO superiores ao ponto de corte, estimando-se uma sensibilidade analítica preliminar de 100%. O esquema da reação pode ser observado na Figura 8, página 32.

2.4. TESTES SOROLÓGICOS CONFIRMATÓRIOS

Os pediatras foram comunicados dos resultados alterados e os responsáveis por todas as crianças com testes classificados como positivos no papel-filtro foram contactados para proceder-se, na mãe e no neonato, provas sorológicas para IgM e IgG específicas. Os testes para doença de Chagas foram realizados por imunofluorescência indireta – IFI (Biolab-Merieux Diagnóstica, Rio de Janeiro, Brasil). Os testes confirmatórios para toxoplasmose, CMV e rubéola foram realizados por enzimaímunensaio em micropartículas (MEIA) pelo sistema automatizado AxSYM (Abbott Laboratories, Chicago, IL, USA). A IgM para toxoplasmose foi também avaliada por imunoensaio enzimático-fluorimétrico. Neste caso, o kit AniLabsystems (Helsinki, Finlândia) designado para amostras em papel-filtro, foi adaptado para identificar IgM anti-*Toxoplasma gondii* no soro. Obedecendo-se à estrutura do kit e, sabendo-se que um disco de sangue total de 3,2 mm contém aproximadamente 1,3-1,5 μL de soro (Adam, 2000), 100 μL de soro foram diluídos em 900 μL tampão PBS e 150 μL da diluição foram aplicados à placa de microtitulação. O procedimento foi realizado como descrito em 3.3.1b. Esta alternativa foi testada com 18 soros negativos e 10 soros positivos para IgM anti-*Toxoplasma gondii*, previamente identificados por MEIA, obtendo-se 100% de correlação. Os casos suspeitos de toxoplasmose congênita entre os primeiros 53.945 testes realizados foram confirmados no soro por IFI (Biolab-Merieux Diagnóstica, Rio de Janeiro, Brasil).

2.4.1. Exames clínicos

As crianças com testes confirmatórios compatíveis com infecção foram encaminhados a centros de referência ou foram tratadas pelo pediatra. Pacientes suspeitos de infecção pelo *Toxoplasma gondii* ou pelo CMV foram encaminhados para exames complementares de ultra-som transfontanelar, tomografia ou raio-X do crânio, oftalmoscopia e exames audiológicos. Pacientes suspeitos de infecção pelo *Trypanosoma cruzi* e suas mães foram avaliados para malformações cardíacas e esofágicas. Neonatos suspeitos de infecção pelo vírus da rubéola foram encaminhadas para exames audiométricos e oftalmológicos.

2.4.2. Testes suspeitos na triagem

Quando um teste de triagem sugeriu infecção congênita, amostras de soro do neonato e da mãe foram solicitadas para testes confirmatórios. A decisão de que os casos detectados na triagem eram verdadeiros-positivos foi baseada nos seguintes critérios:

- (a) presença de anticorpos específicos IgM no neonato e na mãe;
- (b) presença de anticorpos específicos IgM somente no neonato;
- (c) aumento dos níveis de IgG específica na criança (sem IgM) e presença de anticorpos IgM específicos na mãe;
- (d) aumento de IgG específica na criança em dosagens seriadas (2 a 3 semanas) quando a IgM não foi identificada no neonato ou na mãe.

Um aumento progressivo de anticorpos específicos na criança é compatível com infecção e exclui sua possível origem materna;

(e) na doença de Chagas, monitoramento dos níveis de IgG na mãe e no neonato.

Todas as informações clínicas foram obtidas em contato com os pediatras ou, em raros casos, diretamente com as famílias.

3. RESULTADOS

3.1. TOXOPLASMOSE CONGÊNITA

Um total de 364.130 amostras em papel-filtro foram analisadas para IgM específica anti-*Toxoplasma gondii*. As primeiras 78.350 amostras foram analisadas pelo método indireto de enzimaensaio, obtendo-se 294 resultados positivos e 258 amostras de soro recebidas para confirmação (dos quais 159 com IgM no papel-filtro com DO 20% abaixo do ponto de corte e nenhum confirmado nos testes sorológicos. Estas 159 amostras eram, portanto, verdadeiramente negativas e foram excluídas da estatística). Foram identificados 17 casos de toxoplasmose congênita entre os demais 135 testes alterados (falso-positivo de 0,17%). Os primeiros 202 casos suspeitos, incluindo os 159 com IgM no papel-filtro com DO 20% abaixo do ponto de corte, em 53.945 testes realizados, foram confirmados por imunofluorescência indireta (9 casos positivos) e os restantes 56 por MEIA (8 casos positivos). As demais 285.780 amostras em papel-filtro foram analisadas pelo método de enzimaensaio fluorimétrico (FEIA) de captura de IgM específica anti-*Toxoplasma gondii*. Com os resultados obtidos por este método, soros de 497 pacientes foram solicitados para testes complementares, tendo-se recebido amostras de 397 crianças e 379 mães (18 crianças adotadas), confirmando-se 178 novos casos e estabelecendo-se um falso-positivo no método de triagem de 0,11%. O método confirmatório foi o MEIA. A confirmação utilizando o teste FEIA por captura de IgM para papel-filtro e adaptado para soro foi feita em 252 amostras de soro materno e em 252 amostras de soro de neonatos, em paralelo aos testes feitos por MEIA. Em 244 amostras de mães e filhos houve concordância dos resultados. Em 6 soros de crianças e em 2

soros de mães houve reação positiva somente no teste FEIA, tendo-se confirmado 7 novos casos (em 1 caso, reação negativa por MEIA para a mãe e para a criança, e reação positiva para ambas no FEIA adaptado). Em 123 casos, IgM específica anti-*Toxoplasma gondii* foi identificada apenas na mãe, e a presença de IgG na criança não foi monitorada por decisão médica, entendendo-se que a mesma era de origem materna.

A toxoplasmose congênita foi confirmada em 195 crianças (1/1.867), com o seguinte quadro laboratorial:

- 84 com presença de IgM no soro da mãe e da criança;
- 21 com IgM somente na criança;
- 49 com IgM somente na mãe;
- 41 com aumento progressivo dos níveis de IgG.

Todos os casos com IgM presente só na mãe foram confirmados pelo aumento de IgG nas crianças em novas amostras com intervalo de duas a três semanas. De 18 pacientes adotados, apenas 1 teve a mãe localizada para realizar testes sorológicos. Nos pacientes com diagnóstico confirmado, instituiu-se o tratamento convencional com sulfadiazina, pirimetamina e ácido fólico (Guerina *et al.*, 1994). A relação completa dos pacientes diagnosticados com toxoplasmose congênita pode ser observada no Anexo I (p. 85). Em 52 pacientes com manifestações clínicas, lesões de retina ou retinocoroidite foram relatadas em 18 crianças, calcificações intracranianas foram demonstradas em 15 pacientes, e os dois sintomas foram descritos em 7, uma tratada tardiamente, a partir dos 14 meses, já com seqüelas. Outros sintomas identificados, presentes ou não nos

casos acima, foram: esplenomegalia, hepatoesplenomegalia, alterações cognitivas, linfadenopatia, linfadenomegalia, malformações, retardo neuromotor, hidrocefalia, microoftalmia e imunossupressão (óbito). Dos 195 pacientes identificados com a doença, 143 (73,3%) permaneceram assintomáticos até, pelo menos, 2 anos de vida. Em 1 paciente assintomático e IgM positivo, foi identificada a presença de anticorpos anti-HIV. As crianças com diagnóstico de toxoplasmose congênita foram acompanhadas por um período que variou de 3 a 60 meses (em média, 12 meses).

3.2. DOENÇA DE CHAGAS CONGÊNITA

A doença de Chagas foi pesquisada em 15.873 amostras em papel-filtro, obtendo-se 32 resultados positivos em 30 soros recebidos da mãe e da criança. Sorologia positiva para IgG em 20 neonatos e 20 mães e IgM e IgG positivas em um par mãe/neonato. A triagem neonatal demonstrou uma prevalência de 1/756 para a presença do *Trypanosoma cruzi* na população. A relação dos casos encontra-se no Anexo II (p. 90).

Em 21 mães e filhos foram demonstrados anticorpos específicos anti-*Trypanosoma cruzi* de classe IgG nos testes sorológicos confirmatórios (falso-positivo de 0,08%). Em 1 caso, anticorpos de classe IgM estavam presentes na mãe e no neonato. Todas as mães foram submetidas a raio-X de tórax e à ecocardiografia. Uma mãe, de 41 anos, apresentou dilatação do coração e relatou história de um irmão com lesão chagásica. Em outra, identificou-se o DNA do *T. cruzi* por técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Todas as demais eram assintomáticas e foram orientadas pelos médicos a fazerem controles

anuais. Os pacientes foram acompanhados por um período que variou de 1 a 24 meses (em média, 15 meses).

Em um estudo paralelo com 377 amostras recebidas da Bolívia (Santa Cruz de La Sierra), anticorpos específicos anti-*Trypanosoma cruzi* de classe IgG foram identificados em 12 crianças (1/31) e 11 mães. Em uma amostra demonstrou-se, também, a presença de IgM específica no neonato (adotado).

3.3. CITOMEGALOVIROSE CONGÊNITA

Anticorpos de classe IgM anti-CMV foram pesquisados em 15.873 amostras de sangue total em papel-filtro. Resultados positivos foram observados em 39 amostras. A relação dos casos encontra-se no Anexo III (p. 91). Em 32 amostras de soro de crianças e em 30 amostras de mães, 16 casos foram diagnosticados pela presença de IgM no soro de 6 mães e 6 crianças, de IgM no soro de 7 crianças cujas mães apresentaram somente IgG, IgM em 2 crianças adotadas e 1 caso com IgM apenas no soro da mãe e aumento progressivo de IgG no soro da criança. Em 8 casos, a IgG diminuiu no soro dos neonatos e, em 8 neonatos a presença de IgG não foi monitorada por decisão médica. Em um caso, IgM e IgG foram detectadas no soro da mãe, com a presença, apenas, de IgG, no soro da criança. O caso foi encerrado pelo pediatra atribuindo a presença de IgG à passagem passiva de anticorpos pela placenta e a IgM materna não foi valorizada. A prevalência estimada foi de 1/992 e o falso-positivo foi de 0,11%. O seguimento dos pacientes infectados revelou que 11 não desenvolveram sintomas até 2 anos de vida, incluindo uma criança adotada e um prematuro (36 semanas). Seis crianças foram tratadas com ganciclovir e as outras dez foram acompanhadas

cl clinicamente. Nas 5 crianças com seqüelas, observou-se:

- microcefalia, calcificações intracranianas e surdez;
- microcefalia, calcificações intracranianas e atraso motor;
- hepatoesplenomegalia (inicialmente investigada para galactosemia);
- atrofia muscular progressiva, sepsis, baixo peso, dificuldades de deglutição (óbito);
- hepatoesplenomegalia, plaquetopenia, leucopenia (29 semanas de gestação, 1.115 g).

As crianças com diagnóstico de citomegaloviruse congênita foram acompanhadas por um período que variou de 1 a 24 meses (em média, 15 meses).

3.4. RUBÉOLA CONGÊNITA

Anticorpos de classe IgM antivírus da rubéola foram pesquisados em 15.873 amostras de sangue total em papel-filtro. Resultados positivos foram observados em 67 amostras, confirmando-se 16 casos na análise de 55 amostras de soro de crianças e 52 amostras de soro de mães. A relação completa dos casos positivos encontra-se no Anexo IV (p. 92). A IgM foi detectada na mãe e na criança em 8 casos (três mães vacinadas), apenas no neonato em 6 casos (um vacinado), em 2 crianças adotadas e apenas na mãe em 2 casos (uma vacinada). Os cinco casos em que houve administração da vacina contra rubéola foram excluídos da casuística. Assim, a prevalência de rubéola congênita foi de 1/1.443 e o falso-positivo foi de 0,30%. Dos 39 neonatos sem IgM positiva no soro, 20 foram acompanhados até o decaimento da IgG e 19 neonatos tiveram a IgG

atribuída, pelos clínicos, à transmissão materna durante a gestação e não foram acompanhados. Destes casos, apenas 3 mães foram vacinadas antes da gestação.

Uma criança faleceu com diagnóstico de síndrome da rubéola congênita; duas apresentaram lesão em um dos olhos; uma (adotada), com catarata, fez cirurgia corretiva e implante de lentes; uma (adotada) apresentou cardiopatia e surdez parcial e seis permaneceram assintomáticas (uma com 35 semanas de gestação). As crianças com diagnóstico de rubéola congênita foram acompanhadas por um período que variou de 1 a 24 meses (em média, 15 meses).

4. DISCUSSÃO

4.1. ASPECTOS TÉCNICOS

A importância do uso de sangue seco em papel-filtro para a triagem e prevenção de doenças metabólicas e hereditárias, de doenças infecciosas ou para estudos epidemiológicos está bem documentada e aceita na literatura (Parker *et al.*, 1999; Mei *et al.*, 2001). Na ausência de produtos comerciais designados para a análise de um metabólito qualquer em papel-filtro, a adaptação de produtos comerciais desenvolvidos para amostras em meio líquido (soro ou plasma) implica em uma minuciosa análise da “estrutura” do produto. Na impossibilidade de saber as concentrações de anticorpos ligados à fase sólida e dos anticorpos conjugados à enzima (dados não fornecidos pelos fabricantes), o fator mais crítico a ser observado é a diluição da amostra de soro determinada nas instruções do fabricante. A maioria dos produtos comerciais exige uma diluição prévia das amostras de forma tal que o ensaio ocorra utilizando cerca de 1 μ L de soro. A adaptação é possível sabendo-se que um disco de 3,2 mm impregnado com sangue total, com hematócrito ao redor de 55%, contém cerca de 1,3 a 1,5 μ L de soro (Adam *et al.*, 2000). De acordo com o mesmo autor, este volume pode variar de acordo com o volume de sangue aplicado no papel-filtro.

Segundo Weinblen *et al.* (1993), “certos problemas são inerentes aos imunoensaios: efeito do pH, composição dos tampões, temperatura, a fase sólida, impureza dos reagentes, etc. Placas de poliestireno exibem variações em suas propriedades de ligação a proteínas. A qualidade da água, ácidos orgânicos, material inorgânico e bactérias podem afetar as reações enzimáticas. Laboratórios que utilizam produtos comerciais devem estar atentos para DOs mais elevadas

com papel-filtro e devem ser feitas modificações nos kits para soro”.

O fator mais crítico observado nas reações antígeno-anticorpo, quando utilizamos papel-filtro como matriz da amostra, é a temperatura. Sem exceção, as técnicas para amostras de soro são rápidas, com incubações, em geral, não superiores a 60 minutos na sua primeira etapa, com tempos menores após cada lavagem das placas, independentemente do fabricante ou da molécula a ser pesquisada, com ensaios submetidos à temperatura de 37°C. Com diferentes produtos testados, de diferentes fabricantes e para qualquer uma das doenças estudadas neste trabalho, reações com papel-filtro submetidas à temperatura de 37°C apresentaram resultados falsos-positivos em todas as amostras. Para corrigir este problema, todas as reações foram realizadas à temperatura ambiente, em sala climatizada (20-25°C), e os tempos de reação foram prolongados, como descrito em “Material e Métodos”, até as técnicas tornarem-se reprodutíveis e capazes de distinguir nitidamente as amostras negativas das positivas. Ainda, foi necessário estabelecer um critério de classificação das amostras, produzindo-se um controle como “ponto de corte”, evitando-se desta forma o erro de avaliação das DOs e os falsos-resultados, negativos e positivos.

A padronização de um imunoensaio é dependente de se produzir controles em testes qualitativos, ou padrões de valores conhecidos em testes quantitativos (Neto *et al.*, 1998), na mesma matriz utilizada para as amostras. Desta forma, os controles líquidos que acompanham os “kits” comerciais podem produzir distorções na interpretação dos ensaios em papel-filtro. O efeito da matriz

sobre o ensaio é extremamente dependente do formato do ensaio (competitivo, não-competitivo, homogêneo, etc) e dos anticorpos utilizados, e pode interferir de diferentes maneiras (Stenmann, 1997).

As variáveis de erro na obtenção da amostra em papel-filtro, de acordo com alerta do fabricante do papel SS 903, Schleicher & Schuell Inc., são:

- quantidade insuficiente de amostra para teste;
- amostras raspadas ou arranhadas;
- amostra não estava seca quando enviada ao laboratório, apresentando extravasamento de soro;
- formação de microcoágulos;
- aparência supersaturada, mais de uma gota de sangue no mesmo local do papel;
- amostra com aspecto de diluída, descolorida ou contaminada.

4.2. TOXOPLASMOSE CONGÊNITA

Durante a execução deste trabalho, houve uma informação de que uma criança, avaliada pelo método EIA, apresentou sintomas de toxoplasmose tardiamente, com 11 meses de vida, podendo caracterizar um resultado falso-negativo na triagem. Não foi descartada a hipótese de a infecção ter ocorrido após a realização do teste de triagem. Os resultados falsos-positivos podem ser atribuídos a ligações inespecíficas ou a reações cruzadas com anticorpos heterofílicos. Estes, correspondem a um grupo de anticorpos endógenos, não bem definidos, mas historicamente aceitos como de classe IgM, capazes de reagir com um grande número de antígenos e produzindo interferências em ensaios

imunométricos (Miller *et al.*, 1996). Resultados falsos-positivos podem ocorrer, também, por ligação de fatores reumatóides maternos, ou de IgG específica ao conjugado (Stenmann, 1997; Reis, 1998).

A “acurácia do diagnóstico (proximidade entre o valor obtido experimentalmente e o valor verdadeiro na medição de uma grandeza física, (Houaiss, 2002)” refere-se à habilidade de um teste identificar uma condição de interesse. Em estudos de acurácia, os resultados de um ou mais testes são comparados com um padrão de referência (“gold standard”) em um grupo de pacientes suspeitos de ter uma condição qualquer de interesse. O termo “acurácia”, neste contexto, refere-se ao grau de concordância entre os testes estudados e o padrão de referência (Bruns, 2003). Na ausência de um teste de referência, o desempenho dos métodos de triagem adaptados e descritos acima podem ser avaliados pelos dados descritos em Material e Métodos e pelo resultado final obtido no estudo: 243 casos diagnosticados (1/1.500), incluindo as mães portadoras de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi*. A facilidade de manuseio das amostras e da realização dos exames demonstram que os testes podem ser empregados na triagem neonatal em larga escala populacional. Além disso, o percentual de resultados falsos-positivos é aceitável, melhor, para as quatro doenças [0,17% (EIA) e 0,11% (FEIA), para toxoplasmose; 0,08%, para doença de Chagas; 0,11%, para citomegalovirose, e 0,30% para rubéola], do que o falso-positivo ao redor de 0,70% a 1,13% obtido para fibrose cística, uma doença com triagem neonatal implantada em um grande número de programas em todo o mundo (Wilcken 1995; Neto, 1999).

Dos 195 diagnósticos confirmados na triagem para toxoplasmose

congenita (1/1.867), somente 110 (56%) pacientes apresentaram IgM no soro. O diagnóstico de 90 casos (46%) foi possível pelo monitoramento dos níveis de IgG ou porque, em 49 casos, a investigação prosseguiu devido à presença de IgM específica apenas no sangue materno. A razão pela qual alguns testes sorológicos para IgM em crianças não confirmaram a reação de triagem positiva no teste em papel-filtro (falsos-positivos) pode ter explicações diversas, entre as quais:

- baixa sensibilidade da imunofluorescência na confirmação dos primeiros 202 casos suspeitos de toxoplasmose congênita;
- alta diluição do soro (1/100) realizada pelos equipamentos de automação (MEIA);
- diminuição dos níveis de IgM no período entre a coleta para a triagem e a coleta para o teste confirmatório (média, 7 dias);
- o ponto de corte dos kits MEIA é ajustado para adultos (os fabricantes de kits para IgM específicas não recomendam o uso de amostras de neonatos);
- ausência de IgM em filhos de mães tratadas durante a gestação (informação não obtida no seguimento dos pacientes).

Cabe questionar se a alternativa em papel-filtro não é mais sensível, ainda que menos específica, do que os testes sorológicos. Estes dados fazem crer que muitos erros de avaliação podem ser cometidos no seguimento de crianças nas quais não é demonstrada a presença de anticorpos de classe IgM, na avaliação sorológica confirmatória do resultado da triagem. Quanto às limitações dos métodos confirmatórios, é importante ressaltar que em 6 soros de crianças e em 2 soros de mães, obteve-se reação positiva para IgM sérica somente na

adaptação do teste FEIA para o soro, identificando-se 7 casos, potencialmente perdidos (um falso-positivo).

Um estudo prospectivo de dez anos, com 217 crianças com diagnóstico pós-natal de toxoplasmose congênita (Jaisson-Hot *et al.*, 2001), revelou que a sorologia para toxoplasmose pode estar transitoriamente negativa, correndo-se o risco de não se fazer o diagnóstico. Os autores demonstraram que este fenômeno, de mecanismo patofisiológico desconhecido, ocorreu em 15% dos casos. Este fato já fora observado anteriormente (Robert-Gangneux *et al.*, 1999), em uma população de crianças filhas de mães que contraíram a doença durante a gestação. A IgM específica anti-*Toxoplasma gondii* foi detectada em sangue de cordão de 76,5% das crianças infectadas (IgA específica, em 70,6%). Os autores concluíram que não é constante o surgimento de anticorpos específicos ao nascimento, e que o diagnóstico da toxoplasmose congênita pode ser retardado em 6 a 9 meses, até a observação de níveis persistentemente elevados de IgG. A decisão clínica de não monitorar os níveis séricos de IgG permite concluir que ainda vigora o conceito clássico de que, na ausência da IgM no soro, a presença de IgG demonstra, apenas, que esta é de origem materna e que o neonato tem imunidade passiva. Este conceito não foi demonstrado em 90 pacientes diagnosticados pelo aumento da IgG no soro em função do tempo, representando 46,0% dos casos de toxoplasmose congênita descritos neste trabalho, número superior ao descrito por Robert-Gangneux *et al.* (1999). O fato de 123 pacientes com IgM sérica detectada apenas na mãe não serem acompanhados, sugere que vários casos não foram diagnosticados pela decisão médica de não prosseguir a investigação. Se 49 casos com este perfil laboratorial foram confirmados com

toxoplasmose congênita em 195 pacientes (25%), podemos estimar que, em 123, pelo menos 31 neonatos poderiam ter a doença e ficaram sem diagnóstico, o que elevaria a prevalência da doença para 1/1.600 nascidos vivos.

Também deve ser ressaltado que em muitos casos a instituição do tratamento foi tardia e justificada por, pelo menos, três causas:

- dúvida do clínico quanto à imediata instituição do tratamento devido à ausência de sintomas e à toxicidade das drogas;
- tempo transcorrido entre o nascimento, triagem neonatal, recebimento dos resultados do laboratório, avaliações oftalmológicas e de imagens;
- decisão das famílias de buscar outra opinião médica.

Uma das crianças com calcificações intracranianas, retinocoroidite e outros comprometimentos sistêmicos, teve o tratamento interrompido sucessivas vezes pelos pais, que demonstraram desinteresse pela doença do filho. O caso pode não ser único, entre tantos outros que poderiam não apresentar sintomas ou terem seqüelas menos graves, se o tratamento não fosse comprometido por situações dessa natureza.

Estudos com diagnóstico pré-natal da toxoplasmose congênita são realizados na França, incluindo ultra-som, isolamento de sangue fetal e de líquido amniótico para inoculação em camundongo, IgM e IgA específicas em sangue de cordão (Pratlong *et al.*, 1994) e provas de PCR, se necessárias (Ambroise-Thomas *et al.*, 2001). O programa francês de prevenção à toxoplasmose congênita tem como propósito:

- identificação de mulheres não-imunes, para aconselhamento;
- triagem e tratamento das gestantes infectadas;

- diagnóstico e tratamento da infestação em útero;
- diagnóstico e tratamento preventivo dos neonatos assintomáticos.

Em um país rico, e com mais de 50% da população adulta com toxoplasmose adquirida, entendem os franceses que o alto custo deste programa é justificado, estimando uma prevalência mínima de 1/1.000 casos de toxoplasmose congênita (Ambroise-Thomas *et al.*, 2001). Os autores, entretanto, consideram muito difícil calcular a eficácia do programa, mesmo considerando os seus benefícios. Os riscos dos procedimentos invasivos e as exigências de logística não foram considerados. Levando em conta que a triagem pré-natal é de baixa cobertura, 35% (Petry *et al.*, 2000), e de acordo com o estudo de Lebech *et al.* (1999), a pesquisa da IgM no período neonatal apresenta uma melhor relação custo/benefício se incluída nos programas de triagem.

4.3. DOENÇA DE CHAGAS CONGÊNITA

A detecção de IgM específica anti-*Trypanosoma cruzi* é uma situação pouco freqüente no laboratório clínico, razão pela qual a triagem para a doença de Chagas congênita baseou-se na pesquisa da IgG específica. Esta alternativa foi justificada pelos resultados obtidos nos testes sorológicos, nos quais a IgM foi detectada em apenas um neonato, em 41 amostras (20 mães e 21 filhos) examinadas. O fato de todas as crianças serem assintomáticas e de os níveis de IgG específica em todas terem decaído, exceto no neonato com IgM positiva, revelou um curioso resultado da triagem para doença de Chagas: o teste mostrou que pode trazer benefícios, também, à saúde das mães, todas previamente infectadas pelo *Trypanosoma cruzi*. Além de uma mãe de 41 anos identificada

com dilatação cardíaca, e com um irmão chagásico, todas as demais, entre 22 e 28 anos e assintomáticas, receberam orientação para acompanhamento médico periódico.

Na população estudada, a maioria das amostras foi proveniente de zonas urbanas, e a prevalência de 1 caso identificado com anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* em cada 756 testes (0,13%) sugere que a quantidade de indivíduos soropositivos em zonas endêmicas pode se aproximar dos números relatados em outras populações na América do Sul (Schenone *et al.*, 2001; Guzman-Bracho *et al.*, 1998; Mancebo *et al.*, 1999; Zaidenberg *et al.*, 1999).

Como afirmado por Gürtler *et al.*, (2003), o aumento das migrações internacionais de indivíduos latinoamericanos de áreas endêmicas com *Trypanosoma cruzi* sugere a necessidade de um aumento de conscientização entre obstetras, neonatologistas e pediatras.

Considerando-se a facilidade do diagnóstico em amostras de sangue em papel-filtro, a padronização de testes confirmatórios e a eficácia do tratamento (Blanco *et al.*, 1999), a doença de Chagas pode estar sendo subidentificada e a sua inclusão em programas de triagem neonatal pode vir a beneficiar mães e filhos, e ajudar em um melhor controle da prevalência da doença.

Em um estudo paralelo com 377 amostras recebidas de Santa Cruz de La Sierra, Bolívia, anticorpos específicos anti-*Trypanosoma cruzi* de classe IgG foram identificados em 12 crianças (1/31) e 11 mães. Em uma amostra demonstrou-se, também, a presença de IgM específica no neonato (adotado). Os pacientes (3,2% do total de amostras) não foram acompanhados laboratorialmente e, de acordo com Corália Maia (comunicação pessoal, Instituto Bioclínico Central,

Santa Cruz de La Sierra) não há dados oficiais naquele país, mas uma alta prevalência é reconhecida pelos especialistas. Estes dados ratificam a alta prevalência na Bolívia, apresentada na “Introdução”.

4.4. CITOMEGALVIROSE CONGÊNITA

A IgM específica anti-CMV foi identificada em 87,5% dos pacientes diagnosticados com citomegalovirose. Demonstrou-se a presença da doença em 0,1% da população estudada e que 68,8% dos pacientes eram assintomáticos no período neonatal, resultados que, embora abaixo da expectativa descrita na literatura (Peckman *et al.*, 2001, prevalência entre 0,3 e 2,4%, 90% de casos assintomáticos), ainda representam alto impacto social. Em apenas 1 entre 8 pacientes o diagnóstico foi confirmado pelo aumento de IgG, deixando-se de investigar 15 casos nos quais a ausência da IgM e a presença de IgG no soro das crianças foi interpretada pelo médico assistente como transferência passiva de anticorpos maternos durante a gestação. A escassez de dados na literatura sobre a imunologia do recém-nascido quanto à velocidade de produção de anticorpos específicos de classe IgM anti-CMV, permite considerar que a ausência dos mesmos pode ser justificada pelas mesmas razões expostas acima, a exemplo do que ocorre com a toxoplasmose congênita (56% de pacientes com IgM no soro). Também não deve-se desconsiderar a possibilidade descrita por Robert-Gangneux *et al.*, (1999) e Jaisson-Hot *et al.*, (2001) de que a sorologia transitoriamente negativa para toxoplasmose congênita não possa também ser aceitável para a citomegalovirose congênita, correndo-se o risco de não se fazer o diagnóstico precoce. Um dos benefícios da triagem neonatal para CMV é o

emprego de técnicas de prevenção para defeitos auditivos. Atualmente, alguns países estão implantando a triagem neonatal para defeitos de audição (Kim SY *et al.*, 2002).

Em um estudo de 16 anos (Fowler KB *et al.*, 1999), 388 crianças com citomegalovirose congênita foram avaliadas para perda de audição neurossensorial. A deficiência foi observada em 5,2% das crianças, ao nascimento, e em até 15,4% aos 6 anos de vida. Como menos da metade das crianças infectadas foram diagnosticadas, os autores sugerem a introdução de testes que identifiquem o CMV no período neonatal.

Ao contrário da infecção pelo *Toxoplasma gondii* (Remington *et al.*, 2001), infecções congênicas sintomáticas pelo CMV podem ocorrer após infecção materna recorrente. No entanto, a incidência destes casos em crianças nascidas de mães com imunidade pré-existente permanece indefinida (Boppana *et al.*, 1999). O mesmo autor demonstrou (2001) que mulheres soropositivas reinfectadas por uma diferente cepa de CMV pode transmitir a infecção pela placenta e dar à luz uma criança sintomática. Recentemente, Silveira *et al.* (2003) descreveram a transmissão do *Toxoplasma gondii* por mãe tratada 20 anos antes de dar à luz um neonato com retinocoroidite focal necrotizante e sorologia positiva para IgG e IgM.

Em pacientes sintomáticos com citomegalovirose congênita, comparados com um grupo normal de crianças, a tomografia computadorizada é melhor preditor de seqüelas no neurodesenvolvimento do que as informações clínicas e laboratoriais (Boppana *et al.*, 1997). Sintomas como retardo de crescimento intra-uterino, petéquias, hepatoesplenomegalia, hepatite,

trombocitopenia e calcificações intracranianas foram associados à perda de audição. A presença de microcefalia e outras anormalidades neurológicas, no entanto, não são sinais preditivos. Em crianças sintomáticas, a evidência de infecção disseminada (altos títulos de CMV na urina), com ou sem envolvimento neurológico ao nascimento, é um fator preditivo de perda de audição progressiva (Rivera *et al.*, 2002). Não houve consenso, entre os pediatras, quanto ao tratamento dos pacientes assintomáticos. Dos 5 pacientes diagnosticados com seqüelas, apenas um teve defeito auditivo comprovado. Assim, além dos benefícios que as possibilidades terapêuticas podem trazer aos pacientes, o permanente acompanhamento e a facilidade de identificação da surdez progressiva justificam a adoção de medidas preventivas.

4.5. RUBÉOLA CONGÊNITA

A prevenção da infecção pelo vírus da rubéola através de campanhas de vacinação em massa não fazia prever uma prevalência tão elevada de crianças infectadas (1/1.443 nascidos vivos, excluídos os testes positivos em 4 mães e uma criança vacinadas). Este resultado permite questionar a eficácia da vacinação em massa e a necessidade de um seguimento das crianças vacinadas a fim de saber se houve ou não desenvolvimento de anticorpos. Um estudo realizado em uma área endêmica em Minas Gerais, com 18.414 neonatos, apresentou resultados positivos em 175 amostras (1/105 mães portadoras de anticorpos) e 3 crianças foram diagnosticadas (Andrade *et al.*, 2003).

Os resultados obtidos endossam a afirmativa de Cutts e Vynnycky (1999), de que a rubéola é subidentificada em muitos países em desenvolvimento,

e a previsão da Secretaria de Estado da Saúde do Paraná (2002), de que há um grande número de mulheres em idade fértil expostas ao risco de contrair a rubéola no curso da gestação. A doença, de notificação compulsória e de investigação obrigatória, foi estimada por Cutts *et al.* (1999) em 110.000 casos por ano em países em desenvolvimento, menor que o número estimado de mortes anuais por tétano (400.000) ou *Bordetella pertussis* (300.000). No entanto, as deficiências irreversíveis associadas à SRC representam um ônus maior ao indivíduo, à família e à sociedade, justificando-se o seu diagnóstico precoce.

A exemplo do observado com alguns casos positivos na triagem para toxoplasmose e citomegalovirose congênitas, em 38,7% dos casos sem a presença de IgM no teste sorológico confirmatório não houve acompanhamento dos níveis de IgG, tendo os mesmos sido atribuídos pelos médicos assistentes à passagem transplacentária.

4.6. CONSIDERAÇÕES GERAIS

O diagnóstico de doenças infecciosas limitantes, capazes de levar a severas seqüelas ou à morte, a partir da pesquisa de anticorpos específicos anti-*Toxoplasma gondii* (1/1.867), anti-*Trypanosoma cruzi* (1/756), anti-CMV (1/992) e antívirus da rubéola (1/1.443) em sangue seco em papel-filtro, pôde ser demonstrado como viável. A triagem neonatal pode identificar infecções subclínicas e o tratamento precoce pode reduzir a severidade das seqüelas. A ausência de casos negativos na triagem e confirmados tardiamente pela presença de sintomas clínicos, acompanhada do baixo número de testes falsos-positivos e

com prevalência superiores à maioria das doenças genéticas que fazem parte de programas de triagem neonatal, são fatores que referendam os métodos aqui empregados no diagnóstico neonatal da toxoplasmose, da doença de Chagas, da citomegalovirose e da rubéola congênitas.

De acordo com Ambroise-Thomas (2003), as estratégias de prevenção da toxoplasmose congênita repousam sobre quatro eixos:

1) identificar as mulheres suscetíveis e limitar o risco de contaminação durante a gestação (prevenção primária);

2) identificar o mais precocemente possível a toxoplasmose gestacional, evitando ou limitando a transmissão placentária do *Toxoplasma*, pelo tratamento da gestante (prevenção secundária);

3) após o diagnóstico de soroconversão materna, realizar o diagnóstico da infecção fetal e tratar o feto;

4) diagnosticar e tratar os neonatos com toxoplasmose congênita, mesmo os assintomáticos.

O programa pré-natal francês não considera a triagem neonatal como uma forma de prevenção secundária.

Mesmo considerando-se que a triagem neonatal para doença de Chagas identificou apenas uma criança com a infecção, o baixo custo da sua implementação em programas de triagem neonatal já existentes pode beneficiar muitas mães, portadoras sadias ou não da doença. Mostra, também, que há um

grande contingente de portadores de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* que desconhece o seu potencial de vir a desenvolver sintomas da doença.

A prevenção se dá principalmente:

- a) pela eliminação do *Triatoma infestans* de dentro das casas;
- b) pela melhoria das construções;
- c) pelo uso de inseticidas.

O diagnóstico da doença de Chagas congênita, pré ou neonatal, são possíveis, e o tratamento é disponível e eficaz.

Não há tratamento específico para a infecção congênita por CMV. O tratamento de crianças sintomáticas e identificadas no período neonatal é sugerido para evitar ou diminuir seqüelas auditivas. Crianças assintomáticas não costumam ser tratadas, mas exames periódicos para déficit de audição são indicados.

Considerando-se que as fontes primárias de infecção em mulheres em idade fértil são a exposição a crianças excretando CMV e o contato sexual com parceiros infectados. A higiene e lavagem das mãos, quando em contato com secreções de crianças, o não compartilhamento de utensílios de alimentação e a redução do número de parceiros sexuais são particularmente importante.

As dificuldades no tratamento da citomegalovirose e a ausência de tratamento específico para rubéola não são argumentos para não incluí-las em programas de triagem, uma vez que as medidas terapêuticas podem beneficiar as crianças infectadas, diminuindo a severidade das seqüelas e o estresse familiar.

Uma das maiores dificuldades deste trabalho foi o acompanhamento dos pacientes identificados como positivos nos testes confirmatórios, sobretudo dos pacientes com resultados preliminarmente inconclusivos. As grandes dimensões territoriais do país, mudanças de endereço de algumas famílias, falta de telefone para contato e informações imprecisas em situações nas quais a IgM não foi detectada no soro da criança ou da mãe, resultou em mais de 100 casos com estas características, não incluídos nos dados deste trabalho, devendo-se admitir, portanto, que o número de casos verdadeiramente positivos de cada doença possa ser maior do que o aqui reportado. Entretanto, independentemente de não poder precisar este número com absoluta segurança, a ausência de sintomas na maioria das crianças submetidas a tratamento, em um seguimento dos pacientes no qual a idade atual da primeira criança diagnosticada foi de 7 anos e a última de apenas 6 meses, e a constatação de que as demais não tiveram avanço significativo das seqüelas detectadas quando do diagnóstico, justificam ações preventivas de doenças infecciosas congênitas através da triagem neonatal em massa. Contudo, cuidados no pré-natal podem prevenir o surgimento de novos casos, especialmente no que diz respeito às medidas de vacinação contra a rubéola.

O propósito da triagem neonatal é o de identificar neonatos com doenças metabólicas ou infecções congênitas, assintomáticos no nascimento e no período neonatal. No Brasil, com cerca de 180 milhões de habitantes e uma taxa de nascidos vivos próxima de 2,5 milhões por ano, a prevalência de doenças infecciosas congênitas é maior do que a da fenilcetonúria (1/13.000) e do que a do hipotireoidismo congênito (1/3.200). A toxoplasmose congênita, com protocolos de

tratamento mais bem definidos e de alta prevalência, merece especial atenção das autoridades da saúde e sua inclusão em programas de triagem neonatal deve ser considerada. O acompanhamento de crianças até 7 anos de idade mostrou que a maioria dos pacientes tratados precocemente eram assintomáticos, e que as seqüelas observadas no momento do diagnóstico não tiveram progresso significativo após a instituição do tratamento.

Comparando os custos do Estado na prevenção das doenças metabólicas hoje oferecidas (fenilcetonúria, hipotireoidismo congênito e anemia falciforme), com as doenças infecciosas, temos o seguinte:

- assumindo que a prevalência da fenilcetonúria, na nossa experiência, é de 1/13,000, e que o custo de uma reação, convertido em dólares americanos é de U\$ 0,77, (considerando U\$ 1 equivalente a R\$ 3,00), para identificar um caso de PKU, o custo, em reativos, é de U\$ 10.000,00;

- assumindo que a prevalência do hipotireoidismo congênito, na nossa experiência, é de 1/3.200, e que o custo de uma reação, é de U\$ 1,00, para identificar um caso de hipotireoidismo congênito, o custo, em reativos, é de U\$ 3,200, e,

- assumindo que a prevalência da anemia falciforme no Rio Grande do Sul, na nossa experiência, é de 1/7.000, e que o custo de uma reação é de U\$ 1,55, para identificar um caso de anemia falciforme o custo, em reativos, é de U\$ 10,850.

Avaliando os custos da triagem neonatal para as doenças infecciosas estudadas neste trabalho, temos que:

- assumindo que a prevalência da toxoplasmose congênita, é de

1/1.867, e que o custo de uma reação utilizando o teste FEIA é de U\$ 1,70, o custo em reativos para identificar um caso de toxoplasmose congênita é de U\$ 3,174.

- assumindo que a prevalência da doença de Chagas congênita é de 1/756, e que o custo de uma reação é de U\$ 0,75, para identificar um caso de doença de Chagas congênita o custo, em reativos, é de U\$ 567.

- assumindo que a prevalência da citomegalovirose congênita, é de 1/992, e que o custo de uma reação é de U\$ 2, para identificar um caso de citomegalovirose congênita o custo, em reativos, é de U\$ 2,000, e,

- assumindo que a prevalência da rubéola congênita, é de 1/1.443, e que o custo de uma reação é de U\$ 1,80, para identificar um caso de rubéola congênita o custo, em reativos, é de U\$ 2,600.

Assim, nota-se que o custo da triagem neonatal para identificação de um paciente com uma das quatro doenças infecciosas estudadas é menor que o custo de identificação de um paciente com qualquer uma das doenças metabólicas oferecidas pelo Estado. Não foram calculados os custos de tratamentos de longo prazo da fenilcetonúria, do hipotireoidismo congênito e da anemia falciforme, ou dos tratamentos disponíveis para as doenças infecciosas. Da mesma forma, não foram calculados os gastos paralelos, de difícil estimativa, dos casos que evoluem com seqüelas, exames laboratoriais ou de imagem para confirmação de diagnósticos e monitoramento dos pacientes, mais o acompanhamento clínico e o custo de medidas de reabilitação, eventualmente

necessárias, tanto para doenças metabólicas quanto para doenças infecciosas congênitas

Sem descontinuar os programas de triagem neonatal para doenças genéticas e utilizando a estrutura já existente no país, o investimento em prevenção de doenças infecciosas, que não distinguem etnias, apresentam alta prevalência e dispõem de tratamento barato e de curto prazo, deve ser considerado pelas autoridades da área da Saúde Pública.

5. CONCLUSÕES

1. As doenças infecciosas congênitas podem produzir seqüelas tão devastantes quanto algumas desordens genéticas.
2. As doenças infecciosas congênitas pesquisadas neste trabalho, apresentam, em relação às doenças genéticas:
 - procedimentos de triagem de menor custo;
 - tratamentos de mais curta duração;
 - maior prevalência;
 - maior número de crianças potencialmente beneficiadas.
3. Os métodos desenvolvidos/adaptados foram eficientes para a detecção das quatro infecções congênitas estudadas, em amostras de sangue seco impregnado em papel-filtro.
4. A avaliação de amostras de sangue de neonatos coletadas para a detecção de doenças metabólicas permitiu estimar que a prevalência das infecções congênitas é mais elevada que a prevalência das doenças metabólicas oferecidas pelo Estado
5. A ausência de IgM no neonato não descarta a infecção.
6. Considerando:
 - A elevada incidência das infecções congênitas estudadas;
 - e o fato de os testes desenvolvidos serem práticos, de custo inferior ao

custo de identificação de doenças metabólicas, automatizáveis e aplicáveis em larga escala:

- é indicada a adição dos mesmos aos programas de triagem neonatal atualmente existentes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM BW, ALEXANDER JR, SMITH SJ, CHACE DH, LOEBER JG, ELVERS LH, HANNON WH. Recoveries of phenylalanine from two sets of dried blood spots reference materials: prediction from hematocrit, spot volume and paper matrix. Clin Chem 2000;46:126-128.

AHLFORS K, BÖRJESON M, HULDT G, FORSBERG E. Incidence of toxoplasmosis in pregnant women in the city of Malmö, Sweden. Scand J Infect Dis 1989; 21:315-321.

ALFORD CA JR, WU LYF, BLANCO A, LAWTON, AR: Developmental humoral immunity and congenital infections in man. 1974, p 42. Neter E, Milgrom F (editors): The Immune System and Infectious Diseases. Basel, Karger, New York.

ALTCHEH J, BILKIS M, HUALDE G, GRINSTEIN S. Rubéola congénita: un problema aún no resuelto en Argentina. Arch Argent Pediatr 1999;97(1):8-12.

AMBROISE-THOMAS P, SCHWEITZER M, PINON JM, THIEBAUGEORGES O. Prevention of congenital toxoplasmosis in France. Risk assessment. Results and perspectives of prenatal screening and newborn follow up. Bull Acad Natl Med 2001;185:665-83.

ANDRADE GMQ, GONTIJO ED, DIAS JCP, MOREIRA EF, GALVÃO L,

JANUÁRIOJN ET AL. Neonatal screening as a model in Minas Gerais. In: Abstracts of the 2nd Brazilian Meeting of Neonatal Screening; Belo Horizonte; 2003 Sept 24-27; Abstract 130. Brazil: Rev Med Minas Gerais 2003;13(1 Supl 2):S40-S106.

ASPÖCK H, POLLAK A. Prevention of prenatal toxoplasmosis by serological screening of pregnant women in Austria. Scand J Infect Dis Suppl. 1992;84:32-38.

AZOGUE E. Women and congenital Chagas' disease in Santa Cruz, Bolivia: epidemiological and sociocultural aspects. Soc Sci Med 1993;37(4):503-511.

BANATVALA JE. Rubella - could do better. Lancet 1998;351:849-50.

BARRETT DJ, BUTLER JL, COOPER MD. Antibody deficiency diseases. 1997, cap. 128, The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease on CD-ROM of Inherited Disease on CD-ROM. Scriver CR (ed.) The McGraw-Hill Companies, Inc.

BASOMBRIO MA, NASSER J, SEGURA MA, MARCO D, SANCHEZ NEGRETTE O, PADILLA M, MORA MC. The transmission de Chagas disease in Salta and the detection of congenital cases. Medicina (B Aires) 1999;59(2):143-146.

BLACK SB, SHOEN EJ, COHEN D. Screening for congenital toxoplasmosis: Experience using a commercial kit in California. 1996, pg. 66-67. Proceedings do Third Meeting of The International Society for Neonatal Screening and 12th National Neonatal Screening Symposium, Boston, MA, USA,.

BLANCO SB, SEGURA EL, GURTLER RE. Control of congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Argentina. *Medicina*. 1999;59:138-42.

BLANCO SB, SEGURA EL, CURA EN, CHUIT R, TULIAN L, FLORES I, *et al.* Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: an operational outline for detecting and treating infected infants in north-western Argentina. *Trop Med Int Health* 2000;5(4):293-301.

BOPPANA SB, FOWLER KB, VAID Y, HEDLUND G, STAGNO S, BRITT WJ, PASS RF. Neuroradiographic findings in the newborn period and long-term outcome in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Pediatrics* 1997;99:409-14.

BOPPANA SB, FOWLER KB, BRITT WJ, STAGNO S, PASS RF. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection in infants born to mothers with preexisting immunity to cytomegalovirus. *Pediatrics* 1999;104:55-60.

BOPPANA SB, RIVERA LB, FOWLER KB, MACH M, BRITT WJ. Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. *N Engl J Med* 2001(3);344:1366-71.

BRUNS DE. The STARD Initiative and the Reporting of Studies of Diagnostic Accuracy *Clin Chem* 2003;49:19-20.

CANOSA CA. HIV in Newborns in Europe: The Anonymus Study in Spain, 1991-1994. 1996, pg. 79-80. Proceedings of the Third Meeting of The International Society for Neonatal Screening and 12th National Neonatal Screening Symposium, Boston, MA, USA.

CDC. Control and Prevention of Rubella: Evaluation and Management of Suspected Outbreaks, Rubella in Pregnant Women, and Surveillance for Congenital Rubella Syndrome *Morb Mortal Wkly Rep*. 1999;48:560-3.

CDC. Control and prevention of rubella: evaluation and management of suspected outbreaks, rubella in pregnant women, and surveillance for congenital rubella syndrome. *Morb Mortal Wkly Rep* 2001;13:1-23.

CDC. Newborn Screening Quality Assurance Program. Summary Report. *Inborn Errors of Metabolism*. 2001;18:1-47.

CONTRERAS S, FERNANDEZ MR, AGUERO F, DESSE J, ORDUNA T, MARTINO O. Congenital Chagas-Mazza disease in Salta, Argentina. *Rev Soc Bras Med Trop* 1999;32:633-66.

CUTTS FT, VYNNYCKY E. Modelling the incidence of congenital rubella syndrome in developing countries. *Int J Epidemiol* 1999;28:1176-84.

DAMATO EG, WINNEN CW. Cytomegalovirus infection: perinatal implications. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* 2002;31:86-92.

DIAS JC. The clinical, social and occupational aspects of Chagas disease in an endemic area under the control of the state of Minas Gerais, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 1993;26(2):93-99.

DEMMLER GJ. Congenital cytomegalovirus infection. *Semin Pediatr Neurol* 1994;1(2):36-42.

DUSSAULT JH, COULOMBE P, LABERGE C, LETARTE J, GUYDA H, KHOURY K. Preliminary report on a mass screening program for neonatal hypothyroidism. *J Pediatr*. 1975;86:670-674.

EATON RB, PETERSEN E, SEPPÄNEN H, TUUMINEM T. A multicenter evaluation of a fluorometric enzyme immunocapture assay to detect toxoplasma-specific IgM in newborn dried blood filter paper specimens. 1996, pg. 71-72. Proceedings of The Third Meeting of The International Society for Neonatal Screening and 12th National Neonatal Screening Symposium, Boston, MA, USA.

ESKILD A, OXMAN A, MAGNUS P, BJORNDAL A, BAKKETEIG LS. Screening for toxoplasmosis in pregnancy: what is the evidence of reducing a health problem? J Med Screening 1996;3(4):188-194.

FELDKAMP CS AND CAREY JL. Immune Function and Antibody Structure. 2001, pg 24. Immunoassay, editado por Elephterios P. Diamandis e Theodore K. Christopoulos. Academic Press, San Diego, California, USA.

FOULON, W, I. VILLENA, B. STRAY-PEDERSEN, A. DECOSTER, M. LAPPALAINEN, J. M. PINON, *et al.* Treatment of toxoplasmosis during pregnancy: a multicenter study of impact on fetal transmission and children's sequelae at age 1 year. Am J Obstet Gynecol 1999;180:410-415.

FOWLER KB, DAHLE AJ, BOPPANA SB, PASS RF. Newborn hearing screening: will children with hearing loss caused by congenital cytomegalovirus infection be missed? J Pediatr 1999;135:60-4.

FRANK M, HEGENSCHIED B, JANITSCHKE K, WEINKE T. Prevalence and epidemiological significance of Trypanosoma cruzi infection among Latin American immigrants in Berlin, Germany. Infection 1997;25:355-8.

FREILIJ H, ALTCHER J. Congenital Chagas' disease: diagnostic and clinical aspects. Clin Infect Dis 1995;21(3):551-5.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Guia de Bolso - Doenças

infeciosas e Parasitárias do Ministério da Saúde - 1999.

GAGNE SS. Toxoplasmosis. Prim. Care Update Ob Gyns 2001;8(3):122-126.

GLASNER PD, SILVEIRA C, KRUSZON-MORAN D, MARTINS MC, BURNIER JUNIOR M, SILVEIRA S, *et al.* An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. Am J Ophthalmol 1992;15;114(2):136-44.

GRADY GF. Screening for Infectious diseases: The HIV Experience. 1996, pg. 73-75. Proceedings do Third Meeting of The International Society for Neonatal Screening and 12th National Neonatal Screening Symposium, Boston, MA, USA.

GREGG NM. Congenital cataract following German measles in the mother. Trans Ophtal Soc Aust. 1941;3:35.

GUERINA NG, HSU H-W, MEISSNER HC, MAGUIRE R, LYNFIELD B, STECHENBERG B, *et al.* Neonatal serological screening and early treatment for congenital *Toxoplasma gondii* infection. N Engl J Med 1994;330:1858-1863.

GUIA DE BOLSO - Doenças Infeciosas e Parasitárias do Ministério da Saúde - Fundação Nacional de Saúde - Centro Nacional de Epidemiologia - 1999.

GÜRTLER RE, SEGURA EL, COHEN JE. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* infection in Argentina. *Emerg Infect Dis*. 2003;9(1):29-3.

GUTHRIE R, SUSI A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics* 1963;32:338-43.

GUTHRIE R. The origin of newborn screening. *Screening* 1992;1:5-15.

GUZMAN-BRACHO C, LAHUERTA S, VELASCO-CASTREJÓN O. Chagas disease. First congenital case report. *Arch Med Res* 1998;29(2):195-196.

HARRIS S, AHLFORS K, IVARSSON S, LERNMARK B, SVANBERG L. Congenital cytomegalovirus infection and sensorineural hearing loss. *Ear Hear* 1984;5:352-5.

HOUAISS A. Dicionário eletrônico Houaiss da língua portuguesa. Editora Objetiva, Rio de Janeiro, Brasil. 2002.

JAISSON-HOT I, WALLON M, AL KURDI M, THULLIEZ P, KAHI S, COZON G, PEYRON F. Congenital toxoplasmosis. Transitory Negative serology. *Presse Med* 2001;30:1001-4.

JARAMILLO R, BRYAN JP, SCHUR J, PAN AA. Prevalence of antibody to *Trypanosoma cruzi* in three populations in Belize. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 57(3):298-301.

JEANNEL D, NIEL G, COSTAGLIOLA D, DANIS M, TRAORE BM, GENTILINI M. Epidemiology of toxoplasmosis among pregnant women in the Paris area. *Int J Epidemiol* 1988;17: 595-602.

JONES CA, ISAACS D. Predicting the outcome of symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J Paediatr Child Health* 1995;31(2):70-1.

JONES JL, LOPEZ A, WILSON M, SCHULKIN J, GIBBS R. Congenital toxoplasmosis: a review. *Obstet Gynecol Surv* 2001;56(5):296-305.

KIM SY, BOTHWELL NE, BACKOUS DD. The expanding role of the otolaryngologist in managing infants and children with hearing loss. *Otolaryngol Clin North Am* 2002;35(4):699-710.

KOCH JH. Robert Guthrie. 1996. The PKU Story. A Crusade Against the Mental Retardation. Home Publishing House, Pasadena, CA, USA.

KRAUSSE T, STRAUBE W, WIERSBITZKY S, HITZ V, KEWITSCH A. Toxoplasmosescreening in der Schwangerschaft - ein Pilotprogramm in Nordosten Deutschlands. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 1993;53:613-618.

LAPPALAINEN M, KOSKELA P, HEDMAN K, TERAMO K, ÄMMÄLÄ P, HIULESMAA V AND KOSKINIEMI M. Incidence of primary *toxoplasma* infection during pregnancy in Southern Finland: a prospective cohort study. *Scand J Infect Dis* 1992; 24:97-104.

LEBECH M, ANDERSEN O, CHRISTENSEN NC, HERTEL J, NIELSEN HE, PEITERSEN B, *et al.* Feasibility of neonatal screening for toxoplasma infection in the absence of prenatal treatment. *Lancet* 1999;353:1834-7.

MANCEBO R, FERNANDEZ N, CALEGARI L. Seroprevalence of *T. cruzi* infection in 6- and 12- year-old school children from three Uruguayan endemic departments. *Bol Chil Parasitol* 1999;54(3-4):51-56.

MEI JV, ALEXANDER JR, ADAM BW, HANNON WH. Use of filter paper for the collection and analysis of human whole blood specimens. *J Nutr* 2001;(5): 1631S-6S.

MELAMED J, SEBBEN, MAESTRI M, SILVEIRA S, LOCATELLI. Epidemiology of toxoplasmosis in Rio Grande do Sul, Brazil. *Recent Advances on Uveitis* 1992:211-14.

MILLER JJ, LEVINSON SS. Interferences in Immunoassays. *Em Immunoassay*. Diamandis EP, Christopoulos TK, (editors). Academic Press, San Diego, CA, USA. 1996:165-90.

NETO EC. Neonatal hypothyroidism screening with immunochemiluminometric assay of thyrotropin. *Clin Chem* 1991;37:1796 .

NETO EC. One year experience on neonatal screening for congenital toxoplasmosis in Porto Alegre, Brazil. 1996, pg. 68-70. Proceedings of The Third Meeting of The International Society for Neonatal Screening and 12th National Neonatal Screening Symposium, Boston, MA, USA,.

NETO EC, SCHULTE J. Rapid and automated assay for thyrotropin in Guthrie cards on the ACS:180™. Clin Chem 1998;44:2372-73.

NETO EC, SCHULTE J, DEMARI J AND LEWIS E. A two-tier neonatal screening for cystic fibrosis. 1999, P:90. Book of Abstracts of the 4th Meeting of the International Society for Neonatal Screening. Stockholm, Sweeden.

NETO EC, ANELE E, RUBIM R, BRITES A, SCHULTE J, BECKER D, TUUMINEN. High prevalence of congenital toxoplasmosis in Brazil estimated from a three-years prospective neonatal screening. Int J Epidemiol 2000;29:941-947.

PARKER SP, CUBITT WD. The use of the dried blood spot sample in epidemiological studies. J Clin Pathol 1999;52:633-9.

PAUL M, PETERSEN E, PAWLOWSKI ZS, SZCZAPA J. Neonatal screening for congenital toxoplasmosis in the Poznan region of Poland by analysis of *Toxoplasma gondii* -specific IgM antibodies eluted from filter paper blood spots. Pediatr Infect Dis J 2000;19(1):30-36

PECKHAM C, TOOKEY P, LOGAN S, GIAQUINTO C. Screening options for prevention of congenital cytomegalovirus infection. *J Med Screen* 2001;8:119-124.

PETRY LC, TESSARO MM, GUEDES CR, REIS MM. Análise dos Resultados da Sorologia para Toxoplasmose em Gestantes do Hospital Materno-Infantil Presidente Vargas (HMIPV) em Porto Alegre, RS, utilizando a Pesquisa de Anticorpos Específicos pelo Enzime Linked Fluorescent Assay (ELFA), Sistema Vidas, BioMérieux. *NewsLab* 2000;42:114-20.

PINON JM, DUMON H, CHEMLA C, FRANCK J, PETERSEN E, LEBECH M, ZUFFEREY J, BESSIERES MH, *et al.* Strategy for Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis: Evaluation of Methods Comparing Mothers and Newborns and Standard Methods for Postnatal Detection of Immunoglobulin G, M, and A Antibodies. *Journ Clin Microbio*, 2001;6:2267-2271.

PRATLONG F, BOULOT P, ISSERT E, MSIKA M, DUPONT F, BACHELARD B, *et al.* Fetal diagnosis of toxoplasmosis in 190 women infected during pregnancy. *Prenat Diagn* 1994;14:191-8.

REIS MM. Testes Imunológicos: manual ilustrado para profissionais da saúde. AGE Editora, Porto Alegre, RS, Brasil. 1998.

REMINGTON JS, MCLEOD R, THULLIEZ P, DESMONTS G.
Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein JO, eds. Infectious Diseases of the
Fetus and Newborn Infant, 5th ed. Philadelphia USA: WB Saunders, 2001:205-
346.

RIVERA LB, BOPPANA SB, FOWLER KB, BRITT WJ, STAGNO S,
PASS RF. Predictors of hearing loss in children with symptomatic congenital
cytomegalovirus infection. Pediatrics 2002;110(4):762-7.

ROBERT-GANGNEUX F, COMMERCE V, TOURTE-SCHAEFER C,
DUPOUY-CAMET J. Performance of a Western blot assay to compare mother and
newborn anti-Toxoplasma antibodies for the early neonatal diagnosis of congenital
toxoplasmosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1999;18:648-54.

RUSSOMANDO G, DE TOMASSONE MM, DE GUILLEN I, ACOSTA N,
VERA N, ALMIRON M, *et al.* Treatment of congenital Chagas' disease diagnosed
and followed up by the polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg
1998;59(3):487-491.

SCHEDLBAUER LM, PASS KA. HIV testing in newborn: Reporting the results. 1996, pg. 79-80. Proceedings of The Third Meeting of The International Society for Neonatal Screening and 12th National Neonatal Screening Symposium, Boston, MA, USA.

SCHENONE H, GAGGERO M, SAPUNAR J, CONTRERAS MC, ROJAS A. Congenital Chagas disease of second generation in Santiago, Chile. Report of two cases. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2001;43(4):231-232.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE INSTITUTO DE SAÚDE DO PARANÁ. www.saude.pr.gov.br/Agravos/Rubeola/sindrome.htm. 2002.

SILVEIRA C, FERREIRA R, MUCCIOLI C, NUSSENBLATT R, BELFORT R JR. Toxoplasmosis transmitted to a newborn from the mother infected 20 years earlier. Am J Ophthalmol. 2003;136(2):370-1.

STENMANN, U-H. Standardisation of Immunoassays. 1997. p. 243-68. Price CP, Newton DJ. (ed). Macmillan Reference Ltd, London, UK.

STRAY-PEDERSEN B, LORENTZEN-STYR AM. The prevalence of *toxoplasma* antibodies among 11,736 pregnant women in Norway. Scand J Infect Dis 1979; 128:716-721.

TRINCADO DE, RAWLINSON WD. Congenital and perinatal infections with cytomegalovirus. Paediatr Child Health 2001;37(2):187-92.

VILLENA I, AUBERT D, LEROUX B, DUPOUY D, TALMUD D, CHEMLA C, *et al.* Pyrimethamine-sulfadoxine treatment of congenital toxoplasmosis: follow-up of 78 cases between 1980 and 1997. Reims Toxoplasmosis Group. *Scand J Infect Dis* 1998;30:295-300.

WALLON M, LIOU C, GARNER P, PEYRON F. Congenital toxoplasmosis: systematic review of evidence of efficacy of treatment in pregnancy. *BMJ* 1999; 318:1511-4.

WANDERLEY DM, CORREA FM. Epidemiology of Chagas' heart disease. *Rev Paul Med* 1995;113(2):742-9.

WEIBLEN BJ, GRAGY GF AND HOFF R, Screening for Toxoplasmosis 1993:191-202. Newborns. Laboratory Methods for Neonatal Screening. Bradford L. Therrel (ed), American Public Health Association, Washington, DC, USA.

WENG YH, CHU SM, LIEN RI, CHOU YH, LIN TY. Clinical experience with ganciclovir and anti-cytomegalovirus immunoglobulin treatment for a severe case of congenital cytomegalovirus infection. *Chang Gung Med J* 2003;26:128-32.

WILCKEN B, WILEY V, SHERRY G, BAYLISS U. Neonatal screening for cystic fibrosis: a comparison of two strategies for case detection in 1.2 million babies. *Pediatr* 1995;127(6):965-70.

WONG SY, REMINGTON JS. Biology of *Toxoplasma gondii*. AIDS 1993;7:299-316.

WONG SY, REMINGTON JS. Toxoplasmosis in pregnancy. Clin. Infect. Dis. 1994;18:853-861.

ZAIDENBERG M. Congenital Chagas' disease in the province of Salta, Argentina, from 1980 to 1997. Rev Soc Bras Med Trop 1999;32:689-95.

ZUBER P, JACQUIER P. Epidemiology of toxoplasmosis: worldwide status. Schweiz Med. Wochenschr. 1995;Suppl 65:19S-22S.

8. ANEXOS

Resultados laboratoriais confirmatórios para toxoplasmose congênita e sintomas

Cidade/Estado	Sexo	IgM específica positiva			aumento de IgG específica na criança	Sintomas
		na criança e na mãe	só na criança	só na mãe		
1 Veranópolis-RS	M		+			
2 Pomerode-SC	M	+				calcificações intracranianas
3 Porto Alegre-RS	M	+				
4 Butiá-RS	M		+			
5 Barbacena-MG	M			+		
6 Brasília-DF	M			+		
7 Teresina-PI	F	+				
8 Lagoa Vermelha-RS	M				+	
9 Teofilândia-BA	F	+				
10 Sarandi-RS	M			+		
11 Uruguaiana-RS	M				+	retinocoroidite
12 Sapucaia-RS	M				+	
13 Caxias do Sul-RS	M				+	
14 Rio Pardo-RS	M				+	retinocoroidite
15 Colinas-TO	M				+	
16 Belo Horizonte-MG	M	+				
17 Estrela-RS	F				+	
18 Julio de Castilhos-RS	F				+	
19 J.Guararapes-PE	M				+	
20 Campo Grande-MT	M		+			
21 Belém-PA	F				+	
22 São Lourenço-MG	F				+	
23 Pelotas-RS	M		+			hepatoesplenomegalia linfadenopatia
24 Caxias do Sul-RS	F			+		
25 Santa Maria-RS	M	+				retinocoroidite
26 Canoas-RS	F	+				retinocoroidite
27 Porto Alegre-RS	F	+				
28 Porto Alegre-RS	M	+				esplenomegalia
29 Bento Gonçalves-RS	M		+			
30 Alta Floresta-MT	F	+				
31 Garibaldi-RS (gêmeo 1)	F	+				
32 Garibaldi-RS (gêmeo 2)	M	+				retinocoroidite
33 Claudia-MT	M			+		
34 Santa Maria-RS	F				+	
35 Vacaria-RS	F		+			imunossupressão(óbito)
36 Itajuba-MG	F	+				
37 Porto Alegre-RS	F			+		
38 Pelotas-RS	F	+				
39 São Paulo-SP	F	+				
40 Serafina Corrêa-RS	F	+				retinocoroidite

Resultados laboratoriais confirmatórios para toxoplasmose congênita e sintomas

ANEXO I

41	Lajeado-RS	M			+		
42	Rio de Janeiro-RJ	M		+			
43	Xanxere-SC	F		+			
44	Horizontina-RS	F					+
45	Antonio Prado-RS	M		+			
46	Feira de Santana-BA	F		+			
47	Caxias do Sul-RS	M					+
48	Porto Alegre-RS	F		+			calcificações intracranianas
49	Cuiabá-MT	M		+			
50	Tangará da Serra-MT	F					+
51	Pelotas-RS	F		+			
52	Tapurah-MT	F		+			
53	Marabá-PA	M		+			retinocoroidite
54	Vacaria-RS	M		+			
55	S.Bento do Sul-SC	F		+			
56	Belém-PA	F		+			
57	Passo Fundo-RS	M		+			calcificações intracranianas
58	Fax.Dos Guedes-SC	M		+			
59	Recife-PE	M		+			malformações, cego retardo neuromotor
60	Pelotas-RS	M					+
61	Restinga Seca-RS	F		+			
62	Brasília-DF	M		+			
63	Não-me-Toque-RS	M					+
64	Porto Alegre-RS	F		+			
65	Rio Grande-RS	F		+			
66	Caxias-RS	M					+
67	Uruguaiana-RS	M					+
							lesão de retina calcificações intracranianas
68	Campo Grande-MT	M					+
							lesão de retina calcificações intracranianas
69	Cacoal-RO	M		+			
70	Jequié-BA	F					+
71	Rio de Janeiro-RJ	F					+
72	Recife-PE	M					+
73	Porto Alegre-RS	M		+			
74	Primavera-MT	M		+			cego de um olho
75	Palotina-PR	F					+
76	Itapetinga-BA	M		+			
77	Iraí-RS	F		+			
78	Canoas-RS	M					+
79	S.Cruz Cabralia-BA	M					+
80	Maceió-AL	M		+			
81	Minas do Leão-RS	F					+
82	Salto Veloso-SC	M		+			
83	Guanambi-BA	M		+			
84	Coronel Barros-RS	M		+			
85	Cachoeira-RS	M		+			

86	São Pedro-RS	F				+	
87	Porto Alegre-RS	M				+	
88	Porto Alegre-RS	M		+			
89	Recife-PE	M				+	
90	J.Guararapes-PE					+	
91	Belém-PA	F					+
92	Macapá-Amapá	M		+			
93	Sinópolis-MT	M		+			
94	S.Antonio da Patrulha-RS	F		+			
95	Sinópolis-MT	M		+			
96	Sarandi-RS	F				+	lesão de retina
97	Campo Bom-RS	F		+			
98	Juazeiro do Norte-CE	F		+			
99	Sinópolis-MT	M		+			lesão de retina
100	Juazeiro do N-CE	F		+			lesão de retina
101	Porto Alegre-RS	F		+			
102	Severiano de Almeida-RS	F		+			calcificações intracranianas
103	Venâncio Aires-RS	M				+	lesão de retina
104	Caxias do Sul-RS	M					calcificações intracranianas
105	Sarandi-RS	M				+	lesão de retina
106	Boa Vista do Buricá-RS	F				+	calcificações intracranianas
107	Marau-RS	M				+	lesão de retina
108	Severiano de Almeida-RS	F		+			
109	Uruguaiana-RS	F					calcificações intracranianas lesão de retina
110	Fortaleza-CE	M				+	
111	Recife-PE						+
112	Campo Grande-MT						+
113	Teresina-PI					+	
114	Rio de Janeiro-RJ	M		+			
115	Novo Hamburgo-RS	M				+	esplenomegalia
116	Pelotas-RS	F		+			
117	São Paulo-SP	M					hepatoesplenomegalia
118	São João Del Rei-MG	F				+	calcificações intracranianas
119	São Luís-MA	M				+	
120	São Paulo-SP	F		+			
121	Belém-PA	F				+	calcificações intracranianas
122	Taquari-RS	M				+	esplenomegalia
123	Concórdia-SC	M		+			
124	Sobral-CE	F		+			
125	Caruaru-PE	F		+			
126	Belem-PA	M					+
127	Jequié-BA	M		+			
128	Paulista-PE	M		+			
129	Rio de Janeiro-RJ	F					+
130	Antônio Prado-RS	M		+			
131	Fraiburgo-SC	M				+	
132	Canoas-RS	F		+			calcificações intracranianas

133	Jequié-BA	M	+					
134	Feira de Santana-BA	M				+		
135	Santa Rosa-RS	F					+	
136	Arroio do Tigre-RS	M						+
137	Canoas-RS	F			+			
138	Rio de Janeiro-RJ	M	+					
139	Porto União-SC	F					+	calcificações intracranianas alterações cognitivas
140	Bento Gonçalves-RS	F	+					calcificações intracranianas
141	Brasília-DF	M					+	
142	Tapes-RS	M				+		
143	João Pessoa-PB	M				+		
144	Colorado Oeste-RO	M				+		
145	Bebedouro-SP	M				+		
146	Roraima-RO	F				+		
147	Alvorada-RS	M				+		
148	Rio Grande-RS	F				+		
149	Passo Fundo-RS	M	+					calcificações intracranianas
150	Recife-PE	F					+	
151	São Paulo-SP	M					+	
152	Rio de Janeiro-RJ	F					+	
153	Lajeado-RS	F				+		
154	C. Grande-PB	F	+					lesão de retina
155	Maceió-AL	M					+	
156	Belém-PA	M					+	
157	Lajeado-RS	F	+					retinocoroidite hepatoesplenomegalia calcificações intracranianas
158	Realeza-PR	M				+		
159	Novo Hamburgo-RS	M				+		
160	Feira de Santana-BA	F					+	
161	Governador Valadares-MG	M				+		
162	Bagé-RS	M	+					esplenomegalia retinocoroidite calcificações intracranianas
163	Castro-PR	F					+	
164	Pelotas-RS	M				+		
165	Bebedouro-SP	F				+		
166	Campo Grande-PB	M					+	
167	São Paulo-SP	F			+			
168	Gravataí-RS	F	+					linfonomegalia calcificações intracranianas hepatoesplenomegalia
169	Uberlândia-MG	F				+		
170	Pontes e Lacerda-MT	F				+		
171	Taquara-RS	M				+		
172	J. Guararapes-PE	F	+					
173	Belem-PA	F				+		calcificações intracranianas

174	Aracatuba-SP	F	+						atraso motor
175	Maceió-AL	F	+						
176	Castelo-ES	M			+				
177	Recife-PE	F	+						
178	Belem-PA	M					+		
179	Aracaju-SE	F			+				lesão de retina
180	Porto Alegre-RS	F					+		lesão de retina
<hr/>									
181	Itu-SP	M			+				
182	Jaquirana-RS	F	+						retinocoroidite
183	Porto Alegre-RS	F	+						
184	Porto Alegre-RS	M			+				hepatoesplenomegalia linfonodomegalia
185	Porto Alegre-RS	M	+						hepatoesplenomegalia retinocoroidite
<hr/>									
186	Porto Alegre-RS	F			+				calcificações intracranianas hidrocefalia
<hr/>									
187	Porto Alegre-RS	M	+						calcificações intracranianas retinocoroidite hepatoesplenomegalia linfonodomegalia
188	Rio de Janeiro-RJ	F	+						
189	São Leopoldo-RS	F					+		
190	Porto Alegre-RS	F						+	calcificações intracranianas
191	Porto Alegre-RS	M						+	retinocoroidite
192	Porto Alegre-RS	M						+	
193	Porto Alegre-RS	F						+	
194	Porto Alegre-RS	F						+	
195	Porto Alegre-RS	F			+				retinocoroidite

ANEXO II

Resultados laboratoriais confirmatórios para
doença de Chagas congênita e sintomas

Resultados laboratoriais confirmatórios para doença de Chagas e sintomas					
	Cidade/Estado	Sexo	IgM positiva	IgG positiva	Sintomas
			na criança e na mãe	na criança e na mãe	
1	Ji-Paraná/RO	F		+	
2	Caçapava do Sul/RS	M		+	
3	N.Hamburgo/RS	F		+	
4	Caçapava do Sul/RS	M		+	
5	Porto Alegre/RS	M		+	Mãe com cardiopatia com irmão portador sintomático
6	Igrejinha/RS	M		+	<i>T.cruzi</i> identificado no soro materno por análise de DNA.
7	Porto Alegre/RS	F		+	
8	Arcos/MG	M		+	
9	Alta Floresta/MT	F		+	
10	Sorocaba/SP	M		+	
11	Porto Alegre/RS	F		+	
12	Quixada/CE	F		+	
13	Iturama/MG	F	+	+	
14	Porto Alegre/RS	M		+	
15	Santa Rosa/RS	F		+	
16	Taguara/RS	F		+	
17	Porto Alegre/RS	F		+	
18	Porto Alegre+C2/RS	F		+	
19	Santiago/RS	M		+	
20	Porto Alegre/RS	M		+	
21	Maceió/AL	M		+	

Resultados laboratoriais confirmatórios para citomegalovirose congênita e sintomas

Resultados laboratoriais confirmatórios para citomegalovirose e sintomas						
Cidade/Estado	Sexo	IgM específica positiva			aumento de IgG específica na criança	Sintomas
		na criança e na mãe	só na criança	só na mãe		
1 Santa Cruz/RS	F		+			Atraso motor, microcefalia, calcificação intracraniana
2 Teresina/PI	F	+				Ganciclovir Assintomática, ganciclovir
3 Itaqui/RS	F	+				Ganciclovir, Atraso motor, microcefalia, calcificação intracraniana
4 Rio de Janeiro/RJ	M		+			Ganciclovir. Hepatoesplenomegalia. Investigada inicialmente para galactosemia
5 Maceió/AL	F		+			Assintomático, Sem medicação
6 Caibaté/RS	M		+			Dificuldade de deglutição atrofia muscular, sépsis progressiva, perda de peso Óbito, sem medicação
7 Guanambi/BA	M		+			Ganciclovir Assintomático
8 Campo Grande/MS	M		+			Assintomático, adotado Sem medicação
9 Ipatinga/MG	F	+				Assintomático Sem medicação
10 Nazareno/MG	M	+				Assintomático ganciclovir
11 Rio de Janeiro/RJ	M		+			Sem medicação, adotado Assintomático
12 Santa Rosa/RS	M		+			Prematuro Assintomático
13 Porto Alegre/RS	F	+				Assintomático Sem medicação
14 Porto Alegre/RS	M			+	*	Assintomático Sem medicação
15 Escada/PE	M		+			Assintomático, ganciclovir
16 Frutal/MG	M	+				29 semanas de gestação peso: 1.115 kg leucopenia plaquetopenia hepatoesplenomegalia

* > de IgG na criança

Resultados laboratoriais confirmatórios para rubéola e sintomas						
Cidade/Estado	Sexo	IgM específica positiva			aumento de IgG específica na criança	Sintomas
		na criança e na mãe	só na criança	só na mãe		
1	Porto Alegre/RS	M		+		Lesão ocular
2	Canguçu/RS	F		+		Catarata, Implante de lente
3	Ji-Paraná	F	+			Bebe faleceu
4	Vitória de S. Antão/PE	M		+		Cardiopatia, surdez parcial Adotado
5	Santa Cruz/RS	F	+			Lesão em um olho
6	Curitiba/PR	F		+		Neonato vacinado
7	Porto Alegre/RS	M	+			Assintomático
8	J. do Norte/CE	F		+		Assintomático
9	Santos/SP	F	+			Assintomático
10	Santana do Ipanema/AL	F			+	Mãe vacinada.
11	Maceió/AL	F	+			Mãe vacinada.
12	Recife/PE	M	+			Assintomático
13	Curitiba/PR	M	+			Mãe vacinada.
14	Sorocaba/SP	F		+		Adotada, assintomática
15	Campina Grande/PB	F	+			Mãe vacinada.
16	Arvorezinha/RS	F			+	Prematura, 35 semanas Assintomática

Resultados laboratoriais confirmatórios para
rubéola congênita e sintomas

ANEXO IV

ANEXO V

High prevalence of congenital toxoplasmosis in Brazil estimated in a 3-year prospective neonatal screening study

Eurico Camargo Neto,^a Elaine Anele,^a Rosélia Rubim,^a Adriana Brites,^a Jaqueline Schulte,^a Daniela Becker^a and Tamara Tuuminen^b

Background A pilot neonatal screening programme revealed a high (approximately 1 per 4800 live births) prevalence of congenital toxoplasmosis (CT) in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. The purpose of this paper was to estimate in a larger prospective study the prevalence of CT in the country.

Methods At the beginning of the study, an in-house indirect enzyme immunoassay (EIA) was used, to be later replaced with a commercial capture IgM fluorometric enzyme immunoassay (FEIA). Both methods detect specific anti-*Toxoplasma gondii* IgM-class antibodies eluted from dried blood spots.

Results Of the total of 140 914 samples received from all over the country, 47 cases were identified and confirmed as CT. This finding suggests a prevalence of 1 per 3000 live births. Of the 47 patients, only eight (17%) had clinical manifestations: two had intracranial calcifications, four had retinal scars, one had an intracranial calcification and retinal scars, and one had hepatosplenomegaly with lymphadenopathy. The testing was paid for by the patients' families who volunteered for the study and gave their informed consent.

Conclusion The 3-year prospective study using sensitive detection methods, reliable confirmation, and feedback from clinicians showed that CT has an extraordinarily high prevalence in Brazil, in fact the highest ever reported in the world. Although the long-term efficacy of treatment of CT has not been well documented, in view of the availability of reliable diagnostics, confirmation and monitoring, functional logistics, and networking for screening, the insidious nature of the sequelae and the very high prevalence of the disease, neonatal screening for CT should be considered an alternative to no screening at all.

Keywords Congenital toxoplasmosis, neonatal screening, Brazil, prevalence

Accepted 17 April 2000

Traditionally, screening for toxoplasmosis has been carried out in France¹ and Austria² as a mandatory part of prenatal care. Prenatal screening has also been carried out in pilot projects in Finland,³ Norway,⁴ some parts of Sweden⁵ and Germany.⁶ The screening programmes have revealed congenital toxoplasmosis (CT) prevalences varying from 1 per 1000² to 0.3 per 1000³ live births. However, some programmes owing to their short-term nature and limited sample sizes hardly present a comprehensive picture of the spread of the disease. Furthermore, the benefits of prenatal programmes have been recently questioned.⁷ Thus,

according to Eskild *et al.*⁷ 'during almost two decades of experience, prenatal screening has not revealed either the natural history of toxoplasmosis or the efficacy of the antiparasitic treatment during pregnancy'. More comprehensive results on the true prevalence of CT, approximately 1 per 10 000 live births, were recently published from an ongoing neonatal screening programme in Massachusetts.^{8,9} The experience of this programme prompted us to study the prevalence of CT in Brazil. Preliminary results from the neonatal screening programme have indicated a prevalence of approximately 1 per 4800 live births there.¹⁰

Since 1989, a private neonatal screening programme for congenital hypothyroidism and phenylketonuria has been implemented in Porto Alegre, the capital of the Rio Grande do Sul State, South Brazil. The programme offers a comprehensive panel of screening tests for the detection of genetic and infectious

^a Centro de Triagem Neonatal and Laboratório Nobel RIE, Av. Ipiranga, 5.000, Porto Alegre, RS, 90.610-000, Brazil. E-mail: nobelrie@voyager.com.br or eneto@voyager.com.br

^b Labsystems Research Laboratories, Sorvaajankatu 15, 00811, Helsinki, Finland.

Table 1 Tests offered by the Neonatal Screening Center of Porto Alegre

Thin-layer chromatography for aminoacid disorders
Quantitative phenylalanine for phenylketonuria
T ₄ and TSH for congenital hypothyroidism
17- α -hydroxy-progesterone for congenital adrenal hyperplasia
IRT and ΔF_{508} for cystic fibrosis
Total galactose for galactosaemia
Biotinidase deficiency
IgM-class antibody detection for congenital toxoplasmosis
Detection of sickle cells anaemia and haemoglobinopathies
HIV-1 testing from dried blood spots
Galactose-6-phosphate dehydrogenase deficiency
PCR for the G985A mutation for MCAD deficiency
* Congenital Chagas' disease
* Congenital syphilis
* Congenital cytomegalovirus infection
* Congenital rubella infection

* Pilot projects.

diseases (Table 1). The tests are paid for either by the patients' families or health insurance schemes. Generally, after the detection of the disease, the patients are referred to the local reference health centres for treatment and monitoring.

The present extended study was undertaken to confirm earlier results and to estimate the feasibility of routine neonatal screening. We describe our 3-year experience of testing 140 914 newborns from volunteer families for CT.

Subjects and Methods

Clinical specimens

Blood samples from infants aged 3–15 days were spotted onto Schleicher and Schuell # 903 filter paper and dried overnight at room temperature. The samples were collected by heel prick and used for all routine neonatal screening tests and throughout the study. For confirmation, maternal and child serum samples were analysed.

Neonatal screening

The pilot screening programme was carried out from September 1995 to September 1996. During this time, 33 625 newborns were screened, and seven cases of CT were detected, indicating an initial prevalence of 1 per 4800.¹⁰ On the basis of these preliminary results, the screening programme was extended using, in the beginning, an in-house indirect enzyme immunoassay (EIA).¹⁰ In this EIA, *Toxoplasma gondii* tachyzoites purified and disrupted by sonication and cultivated in Eagle's medium with 10% fetal bovine serum were used as antigen. Polystyrene microplates were coated overnight in carbonate/bicarbonate buffer, pH 9.8. Dried blood spots, 6 mm in diameter, were placed into the wells of the microplates, and the blood was eluted with phosphate buffer saline, pH 7.4, for one hour at room temperature with shaking. After the first incubation, the plates were washed four times, and peroxidase-labelled sheep anti-human IgM conjugate (Genzyme Diagnostics, Cambridge, USA) was added. Thereafter, the plates were washed again as above and a substrate reaction with tetramethylbenzidine as chromogen was

performed. The reaction was stopped with 2N hydrochloric acid, and optical densities (OD) were read at 450 nm. To calculate the cutoff value, 105 filter paper blood samples from healthy blood donors were screened and an average OD of 0.035 was obtained. Thus, the cutoff value was set as three-fold, 0.100. A sample was classified as normal if the OD was below 0.100; inconclusive if the OD varied between 0.100 and 0.200; and presumptively positive if the OD exceeded 0.200 when confirmed in duplicates from the same filter card. Internal quality control material on the filter paper was prepared from positive IgM anti-*Toxoplasma gondii* serum, which was mixed with human erythrocytes to achieve a haematocrit of 50%. These controls gave OD values of 0.100, 0.150 and 0.200. The sensitivity of the method was determined by testing of 39 artificially prepared positive dried blood samples. All samples were over the cutoff, to a preliminary analytical sensitivity of 100%. However, indirect methods are known to be less sensitive than capture IgM methods because of the competition of IgG with IgM for binding sites. Therefore, in 1997, a commercial capture *Toxoplasma gondii* IgM fluorometric enzyme immunoassay (FEIA) (Labsystems, Helsinki, Finland) method especially designed for newborn screening¹¹ was adopted after evaluation in parallel with the in-house method. This method is a solid-phase capture EIA with fluorometric detection. Briefly, IgM class antibodies are eluted from single 3 mm dried blood spot disks and simultaneously captured by biotinylated sheep polyclonal anti-human antibody, which binds to streptavidin-coated microplates. After incubation and the first washing step, a mixture of *Toxoplasma gondii* disrupted tachyzoites as antigen (RH strain) and horseradish peroxidase-labelled monoclonal antibody derived against P30, a major membrane protein, is added and allowed to bind to immobilised IgM. After the second washing step, an enzymatic reaction with a fluorogenic substrate, 3-p-hydroxyphenylpropionic acid, is performed. The reaction is stopped by addition of glycine buffer, and fluorescence is measured using Fluoroskan™ (Labsystems) at 405 nm, with 320 nm excitation. The reproducibility of the method measured by testing duplicate samples presented a calculated CV% below 13% from raw fluorescence. The samples were considered initially positive in the FEIA method when their fluorescence was above or below 20% of the fluorescence of the Borderline control supplied by the manufacturer. Initially, 3787 consecutive samples obtained from infants with a mean age of 18 days for the routine neonatal screening programme were tested using both methods. Thereafter, for the sake of economy, the FEIA was compared to the in-house method by doing them alternatively on consecutive days. Altogether, 10 320 samples were run, 6005 using the commercial *Toxoplasma gondii* IgM FEIA and 4315 using the in-house *Toxoplasma gondii* IgM EIA.

Confirmation, follow-up and treatment

The samples were analysed in duplicates from the same filter paper card when the results were between 0.100 and 0.200 of OD (EIA) and above or below the 20% of the Borderline control (FEIA) at the primary screen.

When the samples were at repeat above or maximally 20% below the cutoff value, serum samples from the infant and the mother were requested. Specific anti-*Toxoplasma gondii* IgM and IgG class antibodies were measured in the mother's and the child's serum at the beginning of the programme using an indirect immunofluorescence (IF) method (Biolab-Merieux

Diagnostica, Rio de Janeiro, Brazil) and later, owing to the inferior sensitivity of the IF IgM method, the MEIA IgM kit (Abbott Laboratories, Chicago, IL, USA) was also used.

When the initial laboratory findings indicated congenital infection, serum samples were collected for follow-up three times at 2-week intervals, and the detection of specific IgG and IgM antibodies in the serum was continued. The decision that the detected cases were true positives was based on a repeated positive screening test and one of the following criteria:

- (1) positive confirmatory serum results for both IgM and IgG specific antibodies in the infant and the mother;
- (2) a high IgG level in the infant and positive serum IgM and IgG in the mother;
- (3) positive IgM and IgG results in the infant only;
- (4) increase in specific IgG in the infants with titres of 1 per 256 to 1 per 256 000 during the follow-up period, sampling three times at 2-week intervals. An increase in the infant's specific antibodies excludes their maternal nature.

IgM IF was applied to 156 suspected case pairs, of which five were confirmed as CT in both the mother and the child, two cases in the child only and three in the mother only. Diagnosis was confirmed in the remainder of 366 suspected sample pairs using the MEIA, and 30 cases were then confirmed by the detection of IgM in the maternal serum and/or in the child's serum. The diagnosis of the remaining 12 cases was confirmed by an increase in IgG in the infants' samples at follow-up (Table 2). Two of the infants were adopted children, and four mothers were not tested for serum antibodies. It should be noted that the cutoff for the MEIA was used according to the manufacturer's instructions, without adjusting it for the infants' samples. In addition to laboratory testing, the infants underwent an ophthalmologic examination for retinal scars and cranial x-ray and/or tomography for cranial calcification by a local paediatrician. Infants diagnosed as having CT were referred to their local paediatricians for follow-up and treatment, except for six infants born in the Porto Alegre Metropolitan area who were treated in the capital. The treatment was given according to established protocols using pyrimethamine, sulphadiazine, and leucovorin during one year.

Results

From September 1995 to December 1998, a total of 140 914 infants at the mean age of 18 days from various parts of the country were screened for *Toxoplasma gondii* IgM antibodies. Of these infants, 78 350 were tested using an in-house EIA and 62 564 using a commercial FEIA. Of the samples, 66 320 (47%) were from the State of Rio Grande do Sul and 74 684 (53%) from the rest of the country.

The screening programme detected 47 cases of CT. Thus, the calculated prevalence of CT in Brazil was found to be 1 per 3000 live births. Of the 47 detected cases, 29 (61.7%) were from the State of Rio Grande do Sul. It is of interest that of the 47 patients, 39 (83%) were asymptomatic during the period of observation ranging from 6 months to 3 years and 7 months. Only eight infants (17%) presented with clinical manifestations: one had intracranial calcifications, five had retinal scars, one had intracranial calcification and retinal scars, and one had

hepatosplenomegaly with lymphadenopathy. Table 2 shows detailed demographic, laboratory, and clinical data on each infant. According to the criteria of confirmation (Subjects and Methods) the detected cases can be divided as follows: 20 cases, including four infants with symptoms; eight cases; seven cases, including one infant with symptoms and one who died of immunosuppression; 12 cases, including three infants with symptoms.

A total of 474 infants and their mothers were recalled for confirmatory serum tests. Negative results were obtained with 202 samples from these infants and their mothers (excluding four mothers not tested, and the two mothers of adopted infants). In the remaining 272 suspected cases, only IgG antibodies were found with decreasing levels without treatment at follow-ups at 2-week intervals. These antibodies were assumed to be of maternal origin as a result of past parasite exposure.

Specific IgG antibodies were detected in all pairs of patients and their mothers, whereas IgM antibodies were detected as follows: Of 32 mother-child serum pairs, IgM were present in 15 pairs, in five maternal samples and in eight infant samples. These results were obtained using the MEIA IgM (starting with patient No. 17, see Table 2). By contrast, in this group only 13 infants and/or their mothers were confirmed as having CT by IF. The discrepancy between the numbers of infants and those of mothers is due to the fact that two of the infants were adopted and four mothers did not participate in sample collection.

The results of the in-house EIA and those of the FEIA showed good agreement: the retest rates, i.e. the proportion of samples retested on the same dried blood spot for EIA and FEIA, were 2.2% and 0.5%, respectively. The recall rates, i.e. the proportion of initially positive samples requested for new testing on serum for EIA and FEIA, were 0.33% and 0.42%, respectively. With the 3787 samples, one case of CT was found by both methods and confirmed positive by serum findings, skull radiography, and ophthalmoscopy. The screening of 10 320 samples revealed two positive cases by both methods, one case positive by FEIA and a borderline case by EIA. Additional laboratory and clinical investigations confirmed these three cases as CT. At the beginning of FEIA use, one case was found positive by EIA but negative by FEIA. This case was confirmed as positive at follow-up. One case determined by EIA as disease-free was later found positive. However, acquired infection could not be ruled out in this case. Two infants proven positive on screening died without a clinical diagnosis. Table 3 compares the performance of the in-house EIA against that of the commercial FEIA.

Discussion

Earlier epidemiological studies in Brazil have revealed an average seroprevalence of CT of approximately 80% (Camargo Neto, unpublished observation) in the general population, which speaks of a high risk of acquired acute infection in the mother. Unfortunately, no data are available on the seroprevalence of CT among women of childbearing age. Since many logistical problems, e.g. transport and storage of large quantities of serum samples, make prenatal screening impracticable, the only way to detect CT in infants is neonatal screening using specific IgM as a marker. Some authors¹² have questioned the usefulness of the IgM method with the low observed detection rate of only 50%. However, recent findings^{9,13} suggest that the detection rate when IgM test is used alone approaches 80%. Several

Table 2 Demographic, laboratory and clinical data from detected cases with congenital toxoplasmosis

ID	State/city	Sex	Age, days after birth		Laboratory data			Increase of specific IgG in baby	Symptoms and special notes
			When the initial dried blood spot sample was collected	When the serum sample was analysed	Positive specific IgM				
					In mother and baby	In baby only	In mother only		
1	RS-Veranópolis	M	7	14		+			Adopted
2	SC-Pomerode	M	13	25	+				Intracranial calcifications
3	RS-Porto Alegre	M	29	49	+				
4	RS-Butiá	M	10	33		+			
5	MG-Barbacena	M	17	33			+		
6	DF-Brasília	M	17	97			+		
7	PI-Teresina	F	20	33	+				Symptoms in the mother
8	RS-Lagoa Vermelha	M	22	30				+	
9	BA-Teofilândia	F	19	34	+				
10	RS-Sarandi	M	18	32			+		
11	RS-Uruguaiana	M	10	20				+	Retinal scar in one eye
12	RS-Sapucaia	M	10	17				+	
13	RS-Caxias do Sul	M	24	44				+	
14	RG-Rio Pardo	M	35	47				+	Retinal scar
15	TO-Colinas	M	9	28				+	
16	MG-Belo Horizonte	M	8	15	+				
17	RS-Estrela	F	22	32				+	
18	RS-Júlio de Castilhos	F	24	34				+	
19	PE-Jaboatão	M	10	31				+	
20	MT-Campo Grande	M	12	44		+			Mother's serum was not tested
21	PA-Belem	F	20	31				+	
22	MG-São Lourenço	F	17	40				+	
23	RS-Pelotas	M	15	22		+			Hepatomegaly, lymphadenopathy
24	RS-Caxias do Sul	F	20	42			+		Mother's serum was not tested
25	RS-Santa Maria	M	57	76	+				Retinal scar
26	RS-Canoas	F	10	18	+				Retinal scar
27	RS-Porto Alegre	F	9	33	+				
28	RS-Porto Alegre	F	20	34	+				
29	RS-Bento Gonçalves	M	22	38		+			Adopted
30	MT-Alta Floresta	F	18	41	+				
31*	RS-Garibaldi	F/M	27	40	+				Twins, both positive for specific IgM; Retinal scar in one baby
32*					+				
33	MT-Cláudia	M	14	48			+		

Table 2 *continued*

ID	State/city	Sex	Age, days after birth		Laboratory data			Increase of specific IgG in baby	Symptoms and special notes
			When the initial dried blood spot sample was collected	When the serum sample was analysed	Positive specific IgM				
					In mother and baby	In baby only	In mother only		
34	RS-Santa Maria	F	25	39				+	
35	RS-Vacaria	F	25	33		+			Died from immunosuppression
36	MG-Itajubá	F	4	16	+				
37	RS-Porto Alegre	F	16	22			+		
38	RS-Pelotas	F	15	29	+				Mother's serum was not tested
39	SP-São Paulo	F	2	9	+				
40	RS-Serafina Corrêa	F	18	26	+				
41	RS-Lajeado	M	25	36		+			Mother's serum was not tested
42	RJ-Rio de Janeiro	M	19	34	+				
43	SC-Xanxerê	F	25	32	+				A twin sister without infection, her IgG 1/64; the mother infected
44	RS-Horizontina	F	20	33				+	
45	RS-Antônio Prado	M	20	31	+				
46	BA-Feira de Santana	F	12	22	+				
47	RS-Caxias do Sul	M	10	22				+	

reasons may explain the low detection yield of the IgM screening. One is the use of an indirect method in which maternal IgG competes for antigen binding sites with newborn IgM present in the circulation in much lower quantities. The second reason is the use of the cutoff for the IgM method defined in adult population studies. The importance of the low cutoff for the efficacy of newborn testing has been repeatedly emphasized.⁸⁻¹⁰ The third reason may be that specific IgM is absent in some newborns¹² as a result of the mother's treatment during pregnancy. Furthermore, the reliability of a positive IgM result as a marker of an acute primary infection has been questioned¹⁴ because indirect methods tend to produce false-positive results. It is well known that adult serum is abundant in IgM interfering naturally occurring antibodies¹⁵ that may non-specifically react with the antigen alone or with HRP-labelled conjugate preparations.¹⁶ Because newborn sera are devoid of these interfering factors, the cutoff can be set much lower to increase the analytical sensitivity at no expense of analytical specificity. Moreover, the use of the capture technology further increases the analytical sensitivity of the method, and thus the clinical sensitivity of the screening programme. In our study, the indirect in-house EIA was replaced with the commercial capture method, which proved reliable (Table 3) and confirmed earlier findings.¹¹ To ensure the highest detection rate, we recalled for confirmation the samples that showed values 20% below the set cutoff at the primary screen. We took this precaution for two reasons: the imprecision of the method and the possible analytical variation of the sample at the cutoff level. Moreover, possible pre-analytical factors such as non-uniform impregnation of a filter paper with blood might have had untoward effects.

Our screening programme also detected one case of CT among the 55 tested samples (data not shown) that were submitted from Bolivia. This finding, the results of our study, and the similarity in economic and cultural conditions indicate that the very high prevalence of CT in Brazil can be extrapolated to other Latin American countries.

Our test samples were obtained from volunteer families. Selection bias may therefore have affected the results. Although the samples largely represented the demography of the Brazilian newborn population, the prevalence of CT is probably even higher among the poor that cannot afford testing.

In conclusion, the reliable methods of detection and confirmation of our prospective study revealed a prevalence of CT of 1 per 3000 live births, which is the highest rate ever reported in the world. Although treatment efficacy has not been documented in recent study better than in previous studies of prenatal screening, this should not be used as an argument for abstaining from screening, especially in areas with a high CT prevalence. When facilities are available for the detection, confirmation, follow-up, and treatment of CT, no screening means not caring for children and is thus unethical. Moreover, our findings should help national health care authorities to implement preventive measures.

Acknowledgements

We express our gratitude to Dr Roger Eaton and Dr Ho-Wen Hsu from the New England Regional Newborn Screening Programme, Massachusetts State Laboratory Institute, Boston, MA, USA, for their valuable comments.

Table 3 Comparison between the in-house indirect enzyme immunoassay (EIA) and the *Toxoplasma gondii* IgM fluoro-metric enzyme immunoassay (FEIA)

I. Initial comparison of analytical sensitivity with artificial dried blood spot controls		
FEIA and in-house EIA controls	Optical densities in the in-house EIA method	Fluorescence in the FEIA method
Negative control from the FEIA	0.056	166
Borderline control from the FEIA	0.144	244
Low positive control from the FEIA	0.380	815
High positive control from the FEIA	1.440	5018
Negative control from the EIA	0.075	122
Cutoff control from the EIA	0.190	340
Positive control from the EIA	0.548	1250
The ratio of the high positive control to the negative control from the FEIA	7.3	10 ^a
The ratio of the high positive control of the negative control from the EIA	25.7	30 ^a
II. Comparison of the detection rate in the simultaneous use		
	1 positive out of 3787	1 positive out of 3787
III. Comparison of the detection rate in the intermittent use		
	3 positives and 1 borderline out of 4315 ^b	3 positives and 1 negative ^c out of 6005
IV. Comparison of analytical specificity and appropriateness for screening		
Retest rate	2.2%	0.5%
Recall rate	0.33%	0.42%

^a Systematically higher ratio of the positive control to the negative control in the FEIA method indicating higher analytical sensitivity.

^b One false-negative case was found with EIA, however the acquired infection could not be excluded.

^c One false-negative case in the beginning of the familiarization period.

References

- Jeannel D, Niel G, Costagliola D, Danis M, Traore BM, Gentilini M. Epidemiology of toxoplasmosis among pregnant women in the Paris area. *Int J Epidemiol* 1988;17:595-602.
- Aspöck H, Pollak A. Prevention of prenatal toxoplasmosis by serological screening of pregnant women in Austria. *Scand J Infect Dis Suppl.* 1992;84:32-38.
- Lappalainen M, Koskela P, Hedman K *et al.* Incidence of primary *Toxoplasma* infection during pregnancy in Southern Finland: a prospective cohort study. *Scand J Infect Dis* 1992;24:97-104.
- Stray-Pedersen B, Lorentzen-Styr AM. The prevalence of *Toxoplasma* antibodies among 11 736 pregnant women in Norway. *Scand J Infect Dis* 1979;128:716-21.
- Ahlfors K, Börjeson M, Huldt G, Forsberg E. Incidence of toxoplasmosis in pregnant women in the city of Malmö, Sweden. *Scand J Infect Dis* 1989;21:315-21.

- ⁶ Krause T, Straube W, Wiersbitzky S, Hitz V, Kewitsch A. Toxoplasmosis screening in der Schwangerschaft—ein Pilotprogramm in Nordosten Deutschlands. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 1993;**53**:613–18.
- ⁷ Eskild A, Oxman A, Magnus P, Bjorndal A, Bakketeig LS. Screening for toxoplasmosis in pregnancy: what is the evidence of reducing a health problem? *J Med Screening* 1996;**3**(4):188–94.
- ⁸ Guerina NG, Hsu H-W, Meissner HC *et al.* Neonatal serological screening and early treatment for congenital *Toxoplasma gondii* infection. *N Engl J Med* 1994;**330**:1858–63.
- ⁹ Eaton RB, Hsu H-W, Grady GF. *Newborn screening for congenital toxoplasmosis infection*. Oral presentation at the 4th International Neonatal Screening Symposium, 13–16 June, 1999, Stockholm, Sweden.
- ¹⁰ Neto EC. One year experience on neonatal screening for congenital toxoplasmosis in South Brazil. *Proceedings of the 3rd International Neonatal Screening Symposium*, 21–24 October, 1996, Boston, Massachusetts, USA, pp. 68–70.
- ¹¹ Eaton BR, Petersen E, Seppänen H, Tuuminen T. Multicenter evaluation of a fluorometric enzyme immunocapture assay to detect *Toxoplasma*-specific immunoglobulin M in dried blood filter paper specimens from newborns. *J Clin Microbiol* 1996;**34**:3147–50.
- ¹² Pratlong F, Boulot P, Issert E *et al.* Fetal diagnosis of toxoplasmosis in 190 women infected during pregnancy. *Prenatal Diag* 1994;**14**: 191–98.
- ¹³ Lynfield R, Guerina NG. Toxoplasmosis. *Pediatrics in Review* 1997; **18**:75–83.
- ¹⁴ Liesenfeld O, Press C, Montoya JG *et al.* False-positive results in immunoglobulin M (IgM) *Toxoplasma* antibody tests and importance of confirmatory testing: the Platelia Toxo IgM test. *J Clin Microbiol* 1997;**35**:174–78.
- ¹⁵ Potasman I, Araujo FG, Remington J. *Toxoplasma* antigens recognised by naturally occurring human antibodies. *J Clin Microbiol* 1986;**24**: 1050–54.
- ¹⁶ Tuuminen T, Seppänen H, Pitkänen E-M, Palomäki P, Käpyaho K. Improvement of immunoglobulin M capture immunoassay specificity: *Toxoplasma* antibody detection method as a model. *J Clin Microbiol* 1999;**37**:270–73.

Newborn Screening for Congenital Infectious Diseases

Eurico Camargo Neto,*†‡ Rosélia Rubin,† Jaqueline Schulte,† and Roberto Giugliani*†§

To estimate the prevalence of congenital toxoplasmosis, Chagas disease, cytomegalovirus, and rubella, blood samples on dried blood spot (DBS) from neonates (day 3–20 of life) were screened for immunoglobulin (Ig) M against *Toxoplasma gondii*, cytomegalovirus, rubella virus, and IgG against *Trypanosoma cruzi* by methods used for serum and adapted for use with DBS. Positive samples were further analyzed for IgM and IgG in serum from neonates and mothers. DBS samples from 364,130 neonates were tested for *Toxoplasma gondii*-specific IgM, and 15,873 neonates were also tested for IgM against cytomegalovirus and rubella virus and for *Trypanosoma cruzi*-specific IgG. A total of 195 were diagnosed with congenital toxoplasmosis, 16 with cytomegalovirus, and 11 with congenital rubella. One newborn had a confirmed result for Chagas disease, and 21 mothers had positive serum antibodies. These results suggest that infectious diseases should be considered for future inclusion in programs for newborn screening of metabolic diseases in disease-endemic areas.

Toxoplasmosis infection during pregnancy can cause congenital infection and manifestations, such as mental retardation and blindness (1). Hydrocephalus, intracranial calcification, and retinoblastitis are the most common manifestations of tissue damage from congenital toxoplasmosis. However, the effect of prenatal treatment on these outcomes is unclear (2), and the best method for preventing and controlling congenital toxoplasmosis is controversial. A neonatal screening program based on detecting immunoglobulin (Ig) M antibodies against *Toxoplasma gondii* alone would identify 70%–80% of congenital toxoplasmosis cases (3). Moreover, prenatal screening has indicated neither the natural history of toxoplasmosis nor the efficacy of antiparasite treatment during pregnancy (4). A study by Guerina et al. (5) showed a prevalence of congenital toxoplasmosis of 1 per 10,000 live births in the United States, where 85% of women of

childbearing age are susceptible to acute infection with *T. gondii* (6).

Congenital Chagas disease has been reported, mostly in Latin America (7), where approximately 20 million persons are affected; 90 million others are at risk of being infected by the parasite (8). The high prevalence of the disease has been demonstrated in several Latin American countries (8–10). The evolution of the congenital and reactive forms of the disease has yet to be determined (11). The vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* cannot be prevented, but early detection and treatment of congenital infection achieve cure rates close to 100% (12–14). Persons infected by *T. cruzi* can be successfully treated with nifurtimox or benznidazole (12,14).

Cytomegalovirus is the most common congenital virus infection in the world. Both primary and recurrent infection can result in fetal infection. The birth prevalence of congenital cytomegalovirus infection varies from 0.3% to 2.4%, and at least 90% of congenitally infected infants have no clinical signs (15). The disease causes illnesses ranging from no clinical signs to prematurity, encephalitis, deafness, hematologic disorders, and death (16). Congenital cytomegalovirus infection is described in 30,000 to 40,000 newborns each year in the United States; approximately 9,000 of these children have permanent neurologic sequelae (17). The death rate of symptomatic congenital cytomegalovirus infection is approximately 30% (18). The value of vaccination against congenital cytomegalovirus infection is not known, and screening of newborn infants has been recommended to indicate infants at high risk for deafness and to make early rehabilitation possible (18).

Rubella virus infection during early pregnancy can lead to severe birth defects known as congenital rubella syndrome (19). Sequelae of rubella virus infection include three distinct neurologic syndromes: postinfectious encephalitis after acute infection, a range of neurologic manifestations after congenital infection, and an extremely rare neurodegenerative disorder, progressive rubella panencephalitis, that can follow either congenital or postnatal infection (19). A review of the literature that identified studies about the

*Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; †Nobel RIE Laboratory, Porto Alegre, Brazil; ‡Neonatal Screening Center, Porto Alegre, Brazil; and §Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

prevalence of anti-rubella antibodies from developing countries concluded that congenital rubella syndrome is an under-recognized public health problem and that appropriate data need to be collected to estimate the cost-effectiveness of a potential global rubella control program (20).

Material and Methods

Samples

Blood was obtained by heel puncture and applied on filter paper Schleicher and Schuell 903 (Keene, NH, USA), between day 3 and day 20 of life (mean day 10). The samples were collected in areas throughout Brazil and sent by mail to Porto Alegre, South Brazil, where the tests were performed.

Tests in Filter Paper Dried Blood Spots (DBS)

An indirect enzymatic immunoassay for IgM anti-*Toxoplasma gondii* prepared in-house (21) was used to test the first 78,350 samples. A fluorometric capture enzymatic immunoassay (FEIA) (Neonatal *Toxoplasma gondii*, AniLabsystems, Helsinki, Finland) was used in 285,780 samples. A kit produced by Wiener Laboratory (Rosario, Argentina) to detect IgG against *Trypanosoma cruzi* in human serum was adapted. In brief, a 3.2-mm DBS paper disk was placed in microtiter plates precoated with *T. cruzi*. The serum was eluted with 200 μ L of phosphate-buffered saline (PBS)/bovine serum albumin (BSA) buffer on an orbital shaker set at 100 rpm for 60 min and incubated for 14–16 h at room temperature. After washing with PBS/BSA buffer, the protocol was followed according to the manufacturer's instructions with two modifications: the reactions occurred at room temperature, and the incubation times were duplicated, except after the addition of the color reagent. Also, two kits produced by Diesse Diagnostica Senese (Monteriggioni, Italy) were adapted to detect IgM against cytomegalovirus and IgM against rubella in human serum eluted from filter paper. A 3.2-mm DBS paper disk was placed in microtiter plates precoated with an anti-human IgM monoclonal antibody. The serum was eluted with 150 μ L of PBS/BSA buffer on an orbital shaker set at 100 rpm for 2 h at room temperature. Afterwards, the protocol was followed according to the manufacturer's instructions with the same modifications made with the IgG Chagas test.

Controls

The cutoff for each test was obtained by testing 97 whole blood samples negative for IgM *Toxoplasma gondii* antibodies, 95 whole blood samples negative for IgG *Trypanosoma cruzi* antibodies, and 86 whole blood samples negative for IgM cytomegalovirus and rubella virus antibodies. The cutoff was established as three times the

mean optical density of the negative samples. Negative, cutoff, and positive control samples were prepared in DBS for each test. The sensitivity of the methods was tested with 55 positive IgM *Toxoplasma gondii* samples, 43 IgG positive *Trypanosoma* samples, and 40 positive IgM cytomegalovirus and rubella samples. All samples were over the cutoff point for a preliminary analytical sensitivity of 100%. The presumptive positive samples were confirmed in a new duplicate run.

Confirmatory Serologic Tests

Serum tests were performed on samples from the mothers and neonates. For the first 202 case-patients with possible congenital toxoplasmosis and Chagas disease, an indirect immunofluorescence test (Biolab-Meriéux Diagnostica, Rio de Janeiro, Brazil) was used. Confirmatory serum tests for toxoplasmosis, cytomegalovirus, and rubella (IgM and IgG) were run by microparticle enzyme immunoassay (MEIA) in the AxSYM (Abbott Laboratories, Chicago, IL). The FEIA method was used for serum tests and run in parallel with the AxSYM, which showed good agreement.

Clinical Examination of Infected Infants

Patients suspected to have congenital toxoplasmosis and cytomegalovirus were given a skull ultrasound, tomography, or x-ray and ophthalmoscopic and audiologic exams. Patients suspected to have congenital Chagas disease and their mothers were evaluated for cardiac and esophageal malformations. Patients suspected to have congenital rubella were evaluated for hearing loss and eye lesions. When the samples were above or maximally 20% below the cutoff value, serum samples from the infant and the mother were requested. All clinical and follow-up information was obtained by contacting the pediatricians or, in rare cases, the families.

A neonate was followed and classified as infected by meeting one of the following criteria: antigen-specific IgM and IgG in the neonate and in the mother, antigen-specific IgM in the neonate only, antigen-specific IgM in the mother only, or increased amount of antigen-specific IgG in the neonate. An increase in the neonate's IgG antibodies excluded maternal origin.

Results

Congenital Toxoplasmosis

We analyzed 364,130 DBS samples for IgM against *Toxoplasma gondii*, and 699 samples were positive; all were recalled for serum confirmation. Serum samples from 594 neonates and 576 mothers were received, and of these, 202 suspected cases were tested by indirect immunofluorescence (IIF) (17 diagnosed with congenital

toxoplasmosis), and 497 were tested by MEIA and FEIA (178 were diagnosed with congenital toxoplasmosis). A total of 195 neonates (1 in 1,867) were confirmed to have congenital toxoplasmosis. The laboratory findings are presented in Table 1, and the clinical findings are summarized in Table 2. The false-positive percentage was 0.16%. All patients with confirmed diagnoses were given sulphadiazine, pyrimethamine, and folinic acid.

Of the 195 patients with congenital toxoplasmosis, 138 (70.7%) were asymptomatic until 7 years of age. One IgM-positive asymptomatic infant also had HIV, and six patients with sequelae received late treatment (6–14 months after diagnosis) and could be asymptomatic if treated early. The follow-up was 1–84 months (mean 30 months).

Congenital Chagas Disease

We analyzed 15,873 DBS samples for Chagas disease and had 36 positive results. Serum samples from 31 neonates and 30 mothers were received for confirmatory tests. Results are shown in Table 1. The prevalence of specific *Trypanosoma cruzi*-specific IgG was estimated in 1 in 756 mothers (false-positive rate of 0.08%). All mothers and neonates had x-rays and echocardiographs. One mother (age 41) had an expanded heart and had a brother with Chagas disease. All others were asymptomatic and are under clinical observation. The antibodies observed in the neonates disappeared in time. The follow-up for positive children was 1–24 months (mean 15 months).

Congenital Cytomegalovirus

A total of 15,873 DBS samples for IgM against cytomegalovirus were analyzed, and 39 were positive. Thirty-two serum samples from neonates and 30 from mothers were received for confirmatory testing, and 16 cases were confirmed (Table 1). In 8 case-patients, the IgG levels decreased in the neonates, and in 15 case-patients, IgG in the neonates' serum only was interpreted by the clinicians as being of maternal origin. Likewise, in one case, antigen-specific IgM was detected only in the mother's serum and antigen-specific IgG only in the neonate's serum. This neonate was not followed. The prevalence of cytomegalovirus was estimated at 1 in 992 live births, and the false-positive was 0.11%. The follow-up of the infected patients showed that 11 were asymptomatic until 2 years of age, including a premature baby (36 weeks' gesta-

tion). Laboratory results and clinical findings are presented in Tables 1 and 3. The follow-up was 1–24 months (mean 15 months).

Congenital Rubella

A total of 15,873 DBS samples for IgM against rubella virus were analyzed, and positive results were obtained in 67. Serum samples from 55 neonates and 52 mothers were received, and 16 were positive. Four mothers and one neonate were vaccinated against rubella and were excluded from the sample. The prevalence estimated was at 1 in 1,443, and the false-positive rate was 0.30%. Of 49 neonates and mothers without detectable IgM, 30 were followed until the specific IgG levels decreased. In 19 cases, the infant's IgG levels were interpreted by the pediatrician as being of maternal origin and were not followed. From these cases, three mothers received rubella vaccine before pregnancy. The follow-up of the 11 positive cases is shown in Table 4. The follow-up was 1–24 months (mean 15 months).

Discussion

In screening for congenital toxoplasmosis, 195 neonates had diagnosis confirmed, and 103 (53.8%) had specific IgM. The diagnosis of 41 cases (21%) was only possible by monitoring the specific IgG levels in the infants; 49 (25%) cases were followed because of IgM in the mother's serum samples. Some mistakes may have occurred in the clinical evaluation of neonates in whom IgM were not detected in serum. A prospective study showed that a serologically transient toxoplasmosis occurred in 15% of the cases of unknown pathophysiology, leading to a risk of misdiagnosis and inadequate surveillance (22). The clinical decision not to monitor IgG levels in 123 patients for whom IgM was detected only in the mother's serum suggests that the concept still prevails: in the absence of IgM in the neonate, the IgG is from maternal origin. Several cases might have been misdiagnosed in these cases. In some cases, the beginning of treatment was delayed because of the following: 1) unwillingness of the clinician to treat asymptomatic infants because of the toxicity of the drugs; 2) time elapsed between birth, screening, confirmatory tests, and clinical examinations; and 3) the decision of the family to consult another physician.

Table 1. Serum results in the confirmatory tests

Disease	IgM ^a in mother and neonate	IgM in neonate	IgM in mother	Increase of IgG in neonate
Congenital toxoplasmosis	84	21	49	41
Chagas disease	1 ^b	1	1	1 ^b
Cytomegalovirus infection	6	9 (2 adopted)	1 ^b	1 ^b
Congenital rubella	8 (4 mothers vaccinated)	9 (2 adopted)	2 ^b	1 ^b

^aIg, immunoglobulin.

^bSame neonate.

Table 2. Symptoms and findings in patients with congenital toxoplasmosis

n	Complementary examination	Clinical findings
25	Retinal scar or retinochoroiditis	2 blind, 1 with myopia
14	Intracranial calcifications	1 with cognitive deficiency, 4 with splenomegaly or hepatosplenomegaly (HSM)
7	Retinal scar or retinochoroiditis and intracranial calcifications	2 with splenomegaly or HSM, 2 with neuromotor retardation, 1 microcephaly, 1 hydrocephaly and microphthalmia, 1 died immunosuppressed
7	Other symptoms	Splenomegaly or HSM, neuromotor retardation, microcephaly, hydrocephaly and microphthalmia, 1 died immunosuppressed

Congenital toxoplasmosis is routine in prenatal studies in France, and the efficacy of this program is difficult to estimate, even considering the benefits (23). Moreover, prenatal programs have the risk of invasive methods and, according to Lebech (3), testing for specific IgM shows a better cost-benefit ratio if included in newborn-screening programs.

In 41 confirmatory serum tests for Chagas disease on samples from 21 neonates and 20 mothers, IgM antibodies were found in one neonate. He was treated and remains asymptomatic. IgG levels decreased in all asymptomatic neonates. One mother was identified with cardiac enlargement, and all the others received clinical counseling. In the population studied, most of the samples came from urban areas, and the incidence of mothers with specific antibodies (1 in 756) suggests that the seroprevalence can be higher in rural and disease-endemic areas (9,11,12). Because testing to detect IgM against *Trypanosoma cruzi* is not available, neonatal screening could detect asymptomatic mothers.

IgM against cytomegalovirus was detected in 87.5% of the patients diagnosed with congenital cytomegalovirus; 68.8% were asymptomatic. In 15 neonates, having only IgG antibodies in the serum was interpreted as being of maternal origin by the clinicians. The lack of information about the synthesis of specific antibodies against cytomegalovirus could be justified for the same reasons described previously for congenital toxoplasmosis (22). In a 16-year study, 388 children with congenital cytomegalovirus were evaluated for neurosensory hearing loss (24). A hearing deficit was observed in 5.2% of the cases at birth and 15.4% in children ≥ 6 years of age, and neonatal screening for cytomegalovirus infection was suggested (23). Symptomatic cytomegalovirus can occur after maternal recurrent infection, but the incidence of these cases is still not established (16). Seropositive women reinfected by a different strain of cytomegalovirus can transmit the infection to the fetus and deliver a sympto-

Table 3. Pediatric decision and symptoms presented in patients with congenital cytomegalovirus

n	Decision	Symptoms
5	No treatment	Asymptomatic, clinical follow-up
6	Symptomatic; treated with ganciclovir	Microcephaly, intracranial calcifications, deafness, failure to thrive, HSM* (initially investigated for galactosemia), progressive muscular atrophy, sepsis, low weight, difficulty swallowing (died), thrombocytopenia, leukopenia

*HSM, hepatosplenomegaly.

matic child (25,26). In this work, the incidence of congenital infection by the cytomegalovirus was estimated to be 1 in 992. A successful treatment with the combined use of ganciclovir and anti-cytomegalovirus immunoglobulin was reported (27).

Because of the mass vaccination to rubella, the high incidence of positive tests was unexpected (1 in 1,443, excluding the positive tests in vaccinated mothers). The results confirmed the findings of Cutts and Vynnycky (20) that the disease is under-recognized in developing countries. As observed with congenital toxoplasmosis and cytomegalovirus, 38.7% of neonates showed only IgG antibodies in the confirmatory tests. No further investigation was made because the clinicians presumed at follow-up that IgG was of maternal origin. Also, rubella vaccination of young women does not seem to be enough to prevent the transmission of the virus in a future pregnancy (28). However, prenatal care and mass vaccination seem to be the better choices to prevent new cases of congenital rubella. The purpose of neonatal screening would be to identify congenitally asymptomatic, infected neonates at birth. In Brazil (170 million persons and approximately 2,400,000 newborns/year), the prevalence of infectious diseases is higher than phenylketonuria (1 in 13,000) and congenital hypothyroidism (1 in 3,500). Congenital toxoplasmosis, with well-defined treatment protocols and a high prevalence, deserves special attention from health authorities, and its inclusion in screening programs should be considered. The follow-up of children until 7 years of age showed that most patients treated were asymptomatic or that the sequelae observed at the time of diagnosis had not progressed. By using the existing programs of newborn screening in the country, the inclusion of congenital toxoplasmosis, cytomegalovirus, and Chagas disease in disease-endemic areas would increase the cost

Table 4. Symptoms and number of patients with congenital rubella

Asymptomatic	Symptomatic
6 (1 adopted)	1 congenital rubella syndrome (died)
	2 with scars in 1 eye
	1 with cataract and received lens implant
	1 with cardiopathy and partial deafness

of the program to approximately U.S.\$1.50 per test. Also, treating infectious diseases is cheaper, and the time of treatment is shorter when compared to the expensive and long-term treatment of metabolic diseases. Studies on long-term follow-up of these children are in progress for a better understanding of the efficacy of the treatments and the effectiveness of mass screening.

Acknowledgments

We thank Dr. George Reclos for his valuable comments.

Dr. Neto is a researcher at the Biochemistry Department of the Federal University, Porto Alegre, Brazil. His main research interest is the prevention of sequelae caused by congenital metabolism defects and by congenital infections in newborns.

References

- Wallon M, Liou C, Garner P, Peyron F. Congenital toxoplasmosis: systematic review of evidence of efficacy of treatment in pregnancy. *BMJ*. 1999;318:1511-4.
- Gras L, Gilbert R, Ades A, Dunn D. Effect of prenatal treatment on the risk of intracranial and ocular lesions in children with congenital toxoplasmosis. *Int J Epidemiol*. 2001;30:1309-13.
- Lebech M, Andersen O, Christensen NC, Hertel J, Nielsen HE, Peitersen B, et al. Feasibility of neonatal screening for toxoplasma infection in the absence of prenatal treatment. *Lancet*. 1999;353:1834-7.
- Eskild A, Oxman A, Magnus P, Bjorndal A, Bakketeig LS. Screening for toxoplasmosis in pregnancy: what is the evidence of reducing a health problem? *J Med Screen*. 1996;3:188-94.
- Guerina NG, Hsu HW, Meissner HC, Maguire JH, Lynfield R, Stechenberg B, et al. Neonatal serologic screening and early treatment for congenital *Toxoplasma gondii* infection. The New England Regional Toxoplasma Working Group. *N Engl J Med*. 1994;330:1858-63.
- Jones JL, Lopez A, Wilson M, Schulkin J, Gibbs R. Congenital toxoplasmosis: a review. *Obstet Gynecol Surv*. 2001;56:296-305.
- Wanderley DM, Correa FM. Epidemiology of Chagas' heart disease. *Rev Paul Med*. 1995;113:742-9.
- Mancebo R, Fernandez N, Calegari L. Seroprevalence of *T. cruzi* infection in 6 and 12 year-old school children from three Uruguayan endemic departments. *Bol Chil Parasitol*. 1999;54:51-6.
- Jaramillo R, Bryan JP, Schur J, Pan AA. Prevalence of antibody to *Trypanosoma cruzi* in three populations in Belize. *Am J Trop Med Hyg*. 1997;57:298-301.
- Azogue E. Women and congenital Chagas' disease in Santa Cruz, Bolivia: epidemiological and sociocultural aspects. *Soc Sci Med*. 1993;37:503-11.
- Russomando G, de Tomassone MM, de Guillen I, Acosta N, Vera N, Almiron M, et al. Treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and followed up by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*. 1998;59:487-91.
- Basombrio MA, Nasser J, Segura MA, Marco D, Sanchez Negrette O, Padilla M, et al. The transmission of Chagas' disease in Salta and the detection of congenital cases. *Medicina (B Aires)*. 1999;59:143-6.
- Contreras S, Fernandez MR, Aguero F, Desse J, Orduna T, Martino O. Congenital Chagas-Mazza disease in Salta, Argentine. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1999;32:633-6.
- Pays JF. Human American trypanosomiasis 90 years after its discovery by Carlos Chagas. II-Clinical aspects, physiopathology, diagnosis and treatment. *Med Trop (Madr)*. 1999;59:79-94.
- Trincado DE, Rawlinson WD. Congenital and perinatal infections with cytomegalovirus. *J Paediatr Child Health*. 2001;37:187-92.
- Harris S, Ahlfors K, Ivarsson S, Lernmark B, Svaenborg L. Congenital cytomegalovirus infection and sensorineural hearing loss. *Ear Hear*. 1984;5:352-5.
- Damato EG, Winnen CW. Cytomegalovirus infection: perinatal implications. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs*. 2002;31:86-92.
- Peckham C, Tookey P, Logan S, Giaquinto C. Screening options for prevention of congenital cytomegalovirus infection. *J Med Screen*. 2001;8:119-24.
- Frey TK. Neurological aspects of rubella virus infection. *Intervirology*. 1997;40:167-75.
- Cutts FT, Vynnycky E. Modelling the incidence of congenital rubella syndrome in developing countries. *Int J Epidemiol*. 1999;28:1176-84.
- Neto EC, Anele E, Rubin R, Brites A, Schulte J, Becker D, et al. High prevalence of congenital toxoplasmosis in Brazil estimated from a three-years prospective neonatal screening. *Int J Epidemiol*. 2000;29:941-7.
- Jaisson-Hot I, Wallon M, al Kurdi M, Thulliez P, Kahi S, Cozon G, et al. Congenital toxoplasmosis. Transitory negative serology. *Presse Med*. 2001;30:1001-4.
- Ambroise-Thomas P, Schweitzer M, Pinon JM, Thiebaugeorges O. Prevention of congenital toxoplasmosis in France. Risk assessment. Results and perspectives of prenatal screening and newborn follow up. *Bull Acad Natl Med*. 2001;185:665-83.
- Fowler KB, Dahle AJ, Boppana SB, Pass RF. Newborn hearing screening: will children with hearing loss caused by congenital cytomegalovirus infection be missed? *J Pediatr*. 1999;135:60-4.
- Remington JS, McLeod R, Desmonts SG. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein JO, editors. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. Philadelphia: WB Saunders; 1995. p. 140-267.
- Boppana SB, Rivera LB, Fowler KB, Mach M, Britt WJ. Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with pre-conceptual immunity. *N Engl J Med*. 2001;344:1366-71.
- Weng YH, Chu SM, Lien RI, Chou YH, Lin TY. Clinical experience with ganciclovir and anti-cytomegalovirus immunoglobulin treatment for a severe case of congenital cytomegalovirus infection. *Chang Gung Med J*. 2003;26:128-32.
- Ushida M, Katow S, Furukawa S. Congenital rubella syndrome due to infection after maternal antibody conversion with vaccine. *Jpn J Infect Dis*. 2003;56:68-9.

Address for correspondence: Eurico Camargo Neto, Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Nobel RIE Laboratory and Neonatal Screening Center, Av. Ipiranga, 5000, Porto Alegre, RS, Brazil 90610-000; fax: 55-51-3336-1933; email: eneto.voy@terra.com.br

The opinions expressed by authors contributing to this journal do not necessarily reflect the opinions of the Centers for Disease Control and Prevention or the institutions with which the authors are affiliated.

Use of trade names is for identification only and does not imply endorsement by the Public Health Service or by the U.S. Department of Health and Human Services.