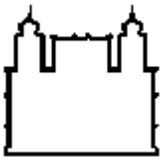
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente
Fernandes Figueira

PCR EM TEMPO REAL NO DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA

Bianca Balzano De La Fuente Villar Zimmermann

Rio de Janeiro

Dezembro de 2022



Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente
Fernandes Figueira

PCR EM TEMPO REAL NO DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA

Bianca Balzano De La Fuente Villar Zimmermann

Dissertação apresentada à Pós-graduação em Pesquisa Aplicada à Saúde da Criança e da Mulher, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientedor (a): Drª Letícia da Cunha Guida

Coorientador (a): Drª Elizabeth de Souza Neves

Rio de Janeiro

Dezembro de 2022

CIP - Catalogação na Publicação

Zimmermann, Bianca Balzano De La Fuente Villar .

PCR em tempo real no diagnóstico da toxoplasmose congênita / Bianca Balzano De La Fuente Villar Zimmermann. - Rio de Janeiro, 2022.
66 f.

Tese (Doutorado Acadêmico em Pesquisa Aplicada à Saúde da Criança e da Mulher) - Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira, Rio de Janeiro - RJ, 2022.

Orientador: Letícia da Cunha Guida.
Co-orientador: Elizabeth de Souza Neves.

Bibliografia: f. 49-55

1. Toxoplasmose congênita. 2. PCR. 3. sangue. 4. líquido amniótico. 5. placenta. I. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/Icict/Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Sergio Ricardo Ferreira Síndico - CRB-7/5094.

AGRADECIMENTOS

À Drª Letícia da Cunha Guida por ter acreditado no meu potencial e pela oportunidade de me orientar nessa longa parceria tanto no Mestrado, quanto no Doutorado.

À Drª Elizabeth de Souza Neves que sempre foi uma fonte de inspiração como médica, especialista e pesquisadora.

Aos Drs. Leonardo Henrique Ferreira Gomes, Danielle Rocha e demais membros do laboratório de alta complexidade do IFF/Fiocruz pelo auxílio na realização dos exames de PCR.

Ao Dr. José Paulo Pereira Junior pelos ensinamentos e apoio nas amniocenteses.

À Drª Elizabeth Avvad Portari pelos exames histopatológicos.

À Drª Carla Nasser Patrocinio Ramos pela prontidão em ajudar no estudo contribuindo com a coleta do sangue dos recém-nascidos.

Ao Dr. Saint Clair pelo auxílio na parte estatística e contribuições ao projeto como docente da pós.

Aos membros do Laboratório de Imunologia do IFF/Fiocruz pelo auxílio e prontidão na emissão dos resultados sorológicos.

Às colegas do curso, pelo estímulo e amizade.

Aos professores da Pós-Graduação, pelo empenho e generosidade no compartilhamento de seus conhecimentos.

À Secretaria Acadêmica, pela eficiência e atenção durante todo o curso.

À minha mãe, pela força e amor incondicional.

Ao Diego Carneiro Zimmermann pelo apoio, paciência e companheirismo.

À minha família e amigos por entender os momentos de ausência e pela torcida diária.

Aos meus colegas de trabalho e amigos do Instituto Nacional de Infectologia pela união e comprometimento em momentos difíceis no combate à pandemia pela COVID-19.

À minha filha Sofia por ter aguardado o tempo da mãe para vir ao mundo.

Às pacientes e seus familiares pelos ensinamentos a cada consulta.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

DNA- Ácido desoxirribonucleico

FAM- 6-carboxi-fluoresceína

IFF- Instituto Nacional de Saúde da Mulher da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira

IL-10- Interleucina-10

IL-12- Interleucina-12

INF- γ- Interferon gama

OMS- Organização Mundial de Saúde

PCR- Reação em cadeia da polimerase

qPCR- Reação em cadeia da polimerase em tempo real

RNAase P- Ribonuclease nuclear P

SUS- Sistema Único de Saúde

T. gondii - *Toxoplasma gondii*

TAMRA- 6-carboxi-tetrametil-rodamina

TGB-β- Fator de Crescimento Transformador Beta

TNF-α- Fator de Necrose Tumoral alfa

ToxoDB – *Toxoplasma Informatics Resources*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fluxograma de diagnóstico da toxoplasmose em gestantes.....27

Figura 2: Conjunto de iniciadores e sonda utilizados nas reações de PCR em tempo real.....36

Figura 3: Gráfico de amplificação da amostra de DNA extraído do líquido amniótico gerado através do *Applied Biosystem 7500 Real-Time PCR Software*. Eixo x - ciclos; eixo y – valores de fluorescência normalizada (∆Rn). A seta indica a curva de amplificação do controle, e a ponta de seta indica as curvas referentes à triplicata da amostra.....37

Figura 4: Fluxograma descritivo dos resultados da população estudada.....41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição dos casos de toxoplasmose congênita e dos com amostra de PCR positiva.....43

RESUMO

O diagnóstico da toxoplasmose congênita apresenta limitações sendo, portanto, necessárias novas opções de exames. A análise do líquido amniótico pela PCR em tempo real já se mostrou eficaz para confirmação da infecção fetal. No entanto, o seu desempenho em outras amostras biológicas ainda não está claro. O objetivo deste estudo é avaliar a PCR em tempo real no sangue da mãe e do recém-nascido assim como no líquido amniótico e placenta, no diagnóstico da toxoplasmose congênita. Esse é um estudo descritivo de gestantes com toxoplasmose acompanhadas no Rio de Janeiro, Brasil. Foi realizada PCR em tempo real em amostras de sangue materno, líquido amniótico, placenta e sangue dos recém-nascidos e o exame histopatológico das placentas. Também foram coletados dados clínicos e laboratoriais dos recém-nascidos. Foram acompanhadas 116 gestantes e analisadas 298 amostras. Uma (0,9%) gestante apresentou PCR positiva no sangue, três (3,5%) no líquido amniótico, uma (2,3%) na placenta e nenhum recém-nascido apresentou PCR positiva no sangue. O estudo histopatológico foi sugestivo de infecção por toxoplasmose em 24 (49%) placentas. Seis (5,2%) recém-nascidos foram diagnosticados com toxoplasmose congênita e apenas os casos com PCR positiva no líquido amniótico tinham associação do resultado da PCR com o diagnóstico de infecção congênita. Tanto as amostras de sangue materno quanto as de sangue dos recém-nascidos e placenta, não demonstraram ser promissoras no diagnóstico da toxoplasmose congênita. Novos estudos são necessários para avaliar o real papel do diagnóstico molecular em outros materiais biológicos que não o líquido amniótico.

Palavras chaves: **toxoplasmose congênita, PCR, diagnóstico, sangue, líquido amniótico, placenta**

ABSTRACT

The diagnosis of congenital toxoplasmosis has limitations so new options are needed. Real-time PCR analysis of amniotic fluid has proven effective for confirming fetal infection. However, its performance in other biological samples still needs to be determined. This study aims to evaluate the real-time PCR role in the blood of the mother and newborn as well as in the amniotic fluid and placenta, in congenital toxoplasmosis diagnosis. It is a descriptive study of pregnant women with toxoplasmosis followed in Rio de Janeiro, Brazil. Real-time PCR was performed on maternal blood, amniotic fluid, placenta, and newborn blood samples. In addition, a histopathological examination of the placentas was performed and data from the babies were collected. One hundred and sixteen pregnant women were followed and 298 samples were analyzed. One (0.9%) pregnant woman had positive PCR in the blood, three (3.5%) in the amniotic fluid, one (2.3%) in the placenta, and any newborn had positive PCR in the blood. The histopathological study suggested toxoplasmosis infection in 24 (49%) placentas. Six (5.2%) newborns were diagnosed with congenital toxoplasmosis and only the cases with positive PCR in amniotic fluid associated with the diagnosis of congenital infection. Neither maternal nor newborn blood and placenta samples have not shown promise in diagnosing congenital toxoplasmosis. Further studies are needed to evaluate the fundamental role of molecular diagnostics in others biological materials than amniotic fluid.

Keywords: congenital toxoplasmosis, PCR, diagnosis, blood, amniotic fluid, placenta.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....10

JUSTIFICATIVA.....12

OBJETIVOS.....14

1. Objetivo geral.....14
2. Objetivos específicos.....14

REFERENCIAL TEÓRICO.....15

1. Histórico.....15
2. O parasita.....16
3. Transmissão.....18
4. Epidemiologia.....20
5. Imunopatogenia.....22
6. A doença.....23
7. Diagnóstico.....25
   7.1. qPCR.....28
8. Tratamento.....31

METODOLOGIA.....34

1. Desenho de estudo.....34
2. Estatística e análise de dados.....38
3. Questões éticas.....39

RESULTADOS.....40

DISCUSSÃO.....44

CONSIDERAÇÕES FINAIS.....48

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS.....49

APÊNDICE I.....56

APÊNDICE II.....60

APÊNDICE III.....62

ANEXO I.....64

INTRODUÇÃO

Apesar de ser considerada uma doença infecciosa negligenciada, a toxoplasmose acomete um terço da população mundial[1]. No Brasil, sua elevada prevalência sugere alta exposição da população ao seu agente infeccioso o *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*)[2].

Quando a infecção ocorre na gestação pode levar à má formação ou até mesmo à perda fetal[3]. Entretanto, a grande maioria dos recém-nascidos são assintomáticos podendo desenvolver alterações principalmente oculares ao longo da vida[3].

Apenas de 10 a 20% das gestantes infectadas são sintomáticas e mesmo aquelas assintomáticas podem transmitir a doença ao feto[1]. Não há consenso internacional quanto ao rastreio sorológico da toxoplasmose durante o pré-natal que é recomendado no Brasil pelo Ministério da Saúde[1,4]. O tratamento, quando empregado ainda durante a gestação reduz tanto a possibilidade de transmissão quanto a ocorrência de sequelas graves no bebê[5].

O rastreio da toxoplasmose durante o pré-natal é feito por meio de testes sorológicos e avidez de IgG, que apresentam limitações[6,7]. Os testes moleculares permitem maior agilidade e precisão diagnóstica[8]. A alta sensibilidade e especificidade da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) no líquido amniótico levou à inclusão deste exame na rotina de atendimento a gestantes com toxoplasmose em centros de referência[9].

Outras amostras biológicas como sangue, placenta, urina e líquido cefalorraquidiano (LCR) também já foram avaliadas por meio dos testes moleculares para averiguar sua contribuição no diagnóstico da toxoplasmose

congênita[8]. Entretanto, o desempenho desses outros exemplares biológicos ainda é controverso[8].

O objetivo deste estudo é compreender o papel da qPCR no sangue da mãe, do recém-nascido, no líquido amniótico e na placenta, no diagnóstico da toxoplasmose congênita.

JUSTIFICATIVA

A toxoplasmose congênita é um problema grave de saúde no Brasil[5]. A soroprevalência da infecção em grávidas varia de 36 a 92% e suas taxas da doença no bebê é uma das mais elevadas no mundo[2,5].

Em 2020, o Ministério da Sáude atualizou o protocolo de manejo da toxoplasmose no pré-natal, no entanto ainda existem variações regionais[4,10]. Apesar de ser uma doença de notificação compulsória desde 2018 e ter o tratamento garantido pelo SUS, ainda ocorrem subnotificações, subdiagnósticos e por consequência, desfechos desfavoráveis[5,11,12].

O diagnóstico da toxoplasmose baseia-se na interpretação de exames sorológicos que apresentam algumas limitações[13]. O advento dos testes moleculares, permitiu novas possibilidades nesse contexto[14]. A identificação do DNA do parasita no líquido amniótico pela qPCR já faz parte da rotina de atendimento a gestantes com toxoplasmose em serviços de excelência em todo o mundo[15], mas no Brasil, sua oferta restringe-se a centros de referência e polos de pesquisa[10].

O diagnóstico pré-natal da toxoplasmose congênita auxilia na tomada de decisão da terapêutica mais adequada, reduzindo o uso desnecessário do esquema que associa três drogas e por consequência acarreta mais eventos adversos[8,16]. Além disso, essa detecção precoce da infecção, facilita o cuidado pós-natal[8].

O uso dos testes moleculares em outras amostras biológicas para o diagnóstico da toxoplasmose congênita ainda é pouco explorado, e os dados disponíveis até o momento, apresentam resultados controversos[8,17].

Com isso, diante da importância da doença no Brasil, as limitações inerentes aos testes sorológicos, as contribuições observadas com o uso dos testes moleculares e as controvérsias encontradas sobre seu desempenho em diversos materiais biológicos que não o líquido amniótico é que se faz necessário estudar o real papel da qPCR no diagnóstico da toxoplasmose congênita.

OBJETIVOS

1. Objetivo geral

- Avaliar a qPCR no sangue da mãe, do recém-nascido, no líquido amniótico e na placenta, no diagnóstico da toxoplasmose congênita.

2. Objetivos específicos

- Descrever a positividade da qPCR no sangue periférico, líquido amniótico e placenta da gestante.

- Comparar a positividade da qPCR na placenta com sua análise histopatológica.

- Descrever a positividade da qPCR no sangue periférico dos recém-nascidos.

- Avaliar alterações nos recém-nascidos a partir da análise da qPCR nessas amostras biológicas.

REFERENCIAL TEÓRICO

1. Histórico

O agente causador da toxoplasmose hoje denominado *T. gondii,* quando identificado pela primeira vez em animais silvestres foi considerado um parasito do gênero *Leishmania*[2]*.* Em 1908 foi observado pela primeira vez por dois pesquisadores franceses Nicolle e Mancaeux na Tunísia e no Brasil por Splendore. Posteriormente foi nomeado como *T. gondii* por Nicolle e Mancaeux em 1909[2].

A toxoplasmose congênita provavelmente foi reconhecida pela primeira vez no Brasil em 1927 por Carlos Bastos Magarinos Torres que identificou em autópsia de uma menina de dois anos no Rio de Janeiro o protozoário em tecidos como sistema nervoso central, cardíaco, musculoesquelético e subcutâneo[2]. Na época, Torres denominou o parasita como *Encephalitozoon chagasi,* posteriormente, em análise retrospectiva, pela descrição das lesões e morfologia do parasita, compreendeu se tratar do *T. gondii*[2].

O primeiro relato comprovado de toxoplasmose congênita foi descrito por Wolf, Cowen e Page (1939) no Estados Unidos[18]. Em 1942, Sabin reuniu todo conhecimento adquirido sobre toxoplasmose congênita e propôs sinais e sintomas típicos da doença: hidrocefalia ou microcefalia, calcificação intracerebral e retinocoroidite[18]. Esses sinais passaram a auxiliar o diagnóstico da toxoplasmose congênita[18]. Após revisar os vários relatos de toxoplasmose em humanos no mundo, Guimarães em 1943 descreveu o primeiro caso confirmado de toxoplasmose congênita no Brasil em menina de 14 meses de vida com alterações cerebrais e oculares[2].

Embora o *T. gondii* tenha uma distribuição mundial e talvez seja o parasita com a maior variedade de hospedeiros, há apenas uma espécie (*gondii*), no gênero *Toxoplasma*[18].

Seu ciclo evolutivo só foi elucidado em 1970, quando se descobriu que os felídeos são seus hospedeiros definitivos e que o oocisto é sua forma de resistência no meio ambiente, eliminado nas fezes dos gatos infectados com o *T. gondii*[18].

O *T. gondii* é um dos parasitas mais bem estudados devido à sua importância médica e veterinária, e à sua adequação como modelo para biologia celular e estudos moleculares com um organismo unicelular[18].

2. O parasita

O *T. gondii* é o agente causador da toxoplasmose, protozoário intracelular obrigatório, que pertence ao filo Apicomplexa, subclasse coccidia[19]. Apresenta-se em três formas evolutivas distintas: oocisto, taquizoíta e cisto contendo bradizoítas[19].

O oocisto, resultado da replicação do *T. gondii* no intestino deste que é seu hospedeiro definitivo, é eliminado nas fezes dos felinos e representa sua forma de resistência[20]. Sua eliminação ocorre por sete a 21 dias e após a esporulação ele se torna infectivo[19]. Os oocistos são altamente resistentes as influências ambientais, como o congelamento e não são mortos por processos físicos e químicos usualmente utilizados para o tratamento da água, como a cloração, ozonioterapia e radiação ultravioleta[21].

O taquizoíta caracteriza-se por ser a forma de multiplicação mais rápida do parasita[20]. Está relacionado à fase mais inflamatória da infecção[19]. Ele tem o

poder de infectar o núcleo celular, promover sua ruptura e invadir as células vizinhas[19]. Com isso, dissemina-se pela corrente sanguínea e infecta outros tecidos como sistema nervoso central, ocular, musculoesquelético e placenta[19]. O taquizoíta está associado a doença congênita, pois ultrapassa a barreira transplacentária, ocasionando a infecção fetal[19].

O cisto é formado por uma pressão decorrente do sistema imune do hospedeiro infectado[19]. Representa a forma de transmissão da infecção pelo hospedeiro intermediário e de aquisição da infecção pelo hospedeiro definitivo e corresponde a fase crônica da infecção[19]. Contém formas do parasito denominadas bradizoítas que se caracterizam por sua replicação lenta[20]. Os cistos podem conter de centenas a milhares de bradizoítas e ficam alojados em tecidos como sistema nervoso central, muscular e ocular[20]. Na toxoplasmose ocular e em situações de imunodeficiência, os cistos podem romper-se e eliminar os bradizoítas que então assumem a forma de taquizoítas com reativação ou recrudescência da infecção[19]. Os cistos teciduais são os responsáveis pela transmissão da toxoplasmose pelo consumo de carnes mal cozidas de mamíferos e aves[22].

A diversidade genética do *T. gondii* desempenha importante papel na sua fisiopatogenia[23]. Os primeiros estudos de genotipagem realizados na França e Estados Unidos demonstraram uma estrutura populacional, com três linhagens clonais principais denominadas tipo I, II e III[24]. Novas variações genéticas foram sendo descritas em outros continentes[23]. Essas novas cepas foram designadas como genótipos atípicos, exóticos, recombinantes ou não-atípicos[23]. A análise multilocus pela PCR de 10 marcadores genéticos em 1457 isolados do *T. gondii*

distribuídos no mundo revelou 189 genótipos diferentes que são exibidos no ToxoDB[23].

Entre as linhagens principais os genótipos tipos I e III são os mais prevalentes nas Américas e o genótipo tipo II na Europa[24]. O genótipo tipo II é o mais prevalente entre pacientes com AIDS, na toxoplasmose congênita e na toxoplasmose ocular[23]. Já os genótipos atípicos são mais comuns entre os indivíduos imunocompetentes[23]. O genótipo I está associado a maior letalidade da doença, enquanto os genótipos II e III são menos virulentos[23].

Além disso, entre os genótipos descritos pela nova nomenclatura e exibidos em ToxoDB (#1 - #231), o genótipo #65 é o mais prevalente na toxoplasmose ocular e pacientes com AIDS, e os genótipos #11 e #9 são mais prevalentes na forma congênita e outras condições da doença, respectivamente[23].

A diversidade genética do *T. gondii* nas Américas acentua-se no Norte e Sul, ao contrário do observado na África e Ásia[23]. Essas variações genéticas justificariam a possibilidade de quadros de reinfecção, principalmente no caso de uma nova infecção por cepa mais virulenta que a exposta previamente, explicando a capacidade de enganar a resposta imune desse hospedeiro já exposto ao parasita[25].

3. Transmissão

O felino é o único animal que alberga a fase sexuada do ciclo evolutivo do *T. gondii* e portanto, é o único hospedeiro definitivo[24]. Ele elimina pelas fezes o oocisto, que contamina a água e o solo[22]. Um gato pode eliminar até 10 milhões de oocistos por dia em um período que varia de 7 a 20 dias durante uma vez na

sua vida[22,24]. Estes oocistos são eliminados ainda imaturos, mas em condições apropriadas esporulam em até cinco dias tornando-se infectantes[22]. Os oocistos maduros contêm quatro esporozoítos e, em condições ambientais favoráveis, podem permanecer viáveis no solo por até 18 meses[19]. Assim como os hospedeiros intermediários, o felino também precisa se contaminar com o *T. gondii* para poder eliminá-lo[19]. Essa contaminação ocorre geralmente pelo consumo de cistos teciduais por meio de canibalismo, hábito de felinos silvestres e gatos de rua[24].

Animais homeotérmicos, como aves e mamíferos, são os hospedeiros intermediários, que são infectados pela ingestão de água, vegetais, carnes e frutas contaminados[24]. Além da fase aguda da toxoplasmose desencadeada pelos taquizoítas, os hospedeiros intermediários podem evoluir para fase latente com a formação de cistos teciduais que se alojarão nos tecidos como o sistema nervoso central, ocular e muscular[19].

O ser humano, hospedeiro intermediário, pode infectar-se tanto com o oocisto pelo consumo de água, vegetais e frutas contaminados, quanto por hábitos carnívoros, pelo consumo de carnes mal cozidas contendo cistos teciduais[19]. Além disso, em caso de infecção durante a gestação há a passagem de taquizoítas pela placenta causando a infecção congênita[19].

Menos comumente ocorre a transmissão da infecção por transfusão de hemoderivados, transplante de órgãos sólidos e acidentes com material perfurocortante[19].

O oocisto é a principal rota de transmissão da toxoplasmose no país envolvendo principalmente sua dispersão pela água, mas com relatos

importantes também de contaminação pelo consumo de frutas e vegetais[26]. Desde os anos 2000, no Brasil já foram observados diversos surtos da doença associados ao consumo de água contaminada com o *T. gondii*[27]. A identificação desse parasito diretamente na água serviu de alerta para o mundo sobre essa abrangente e importante via de transmissão[28]. Surtos da doença relacionados a transmissão hídrica acarretam maior número de infectados do que a transmissão por outras vias[28]. Além disso, hábitos alimentares como o consumo de carnes cruas ou mal cozidas também já foi identificado como fator de risco para a infecção, visto que o processo de congelamento e cozimento inativam os cistos teciduais[28].

4. Epidemiologia

Apesar de acometer um terço da população mundial e ser classificada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2015 como a terceira causa mais frequente de doença transmitida por alimentos, a toxoplasmose segue considerada como uma doença negligenciada[1,6].

A soroprevalência do *T. gondii* pode variar segundo a faixa etária, localidade e estratos socioeconômicos de uma determinada população[29]. Em algumas regiões como América do Sul, Oriente Médio e África, as taxas de infecção podem atingir 90%[29]. Em algumas regiões do Brasil, a prevalência da infecção varia de 50% a 80% na população adulta, sendo as taxas mais altas observadas nas regiões Norte e Sul[26]. Em estudo no município do Rio de Janeiro, com o avanço da idade, a prevalência atingiu pico de 71%[26]. Dados sobre a prevalência da infecção em outros municípios do estado do Rio de Janeiro são escassos[26].

"*One Health*" é um esforço colaborativo e interdisciplinar que busca a saúde ideal para pessoas, animais, plantas e meio ambiente[29]. Esse conceito se aplica à toxoplasmose por afetar a saúde de humanos, animais domésticos, selvagens e ecossistemas, além de ser percebida como uma ameaça por aqueles que dependem de recursos animais[29].

No Brasil a toxoplasmose é uma constante ameaça à saúde[29]. Diversas epidemias já foram descritas pelo país[28]. Em 2018, por exemplo, um grande surto da doença foi observado na região de Santa Maria, Rio Grande do Sul, com a confirmação de 809 casos, sendo que 114 desses casos foram identificados em gestantes, com 3 mortes fetais, 10 abortamentos e 22 casos de toxoplasmose congênita[30]. Estima-se que a soroprevalência entre gestantes varia entre 36% a 92%[2]. Mulheres brasileiras suscetíveis a infecção durante a gestação apresentam elevado risco de se contaminar[2]. A infecção em gestantes na maioria dos casos é assintomática, apenas 10% a 20% apresentam sintomatologia[10]. Por isso, o rastreio por meio de testes sorológicos durante o pré-natal é de suma importância para identificar a doença[31]. No entanto, dificuldades no manejo pré-natal de gestantes com toxoplasmose já foram observadas nos serviços de saúde brasileiros[10,12].

O perfil epidemiológico da toxoplasmose difere entre os países, o que pode ser um dos fatores para a ausência de um consenso internacional sobre o manejo da infecção em gestantes[1]. Na França, após um programa bem estruturado de rastreio mensal da toxoplasmose no pré-natal com gestantes soronegativas, a prevalência da infecção em gestantes foi reduzida de 83% para 37%[32]. Já nos Estados Unidos onde há prevalência bem menor da infecção (entre 9,1% a 14,9%), raramente se realiza seu rastreio durante o pré-natal[32].

A incidência da toxoplasmose congênita a cada 10.000 nascidos-vivos varia segundo a localização geográfica[33]. No Estados Unidos estima-se um caso da doença a cada 10.000 nascidos-vivos, enquanto na França esse número sobe para 2,9 a cada 10.000 nascidos vivos[33]. Já no Brasil observa-se uma taxa superior de nove casos a cada 10.000 nascidos-vivos[33].

Embora hábitos de higiene e práticas alimentares individuais parecerem impactar a prevalência da toxoplasmose, políticas de saúde direcionadas para saneamento básico, processamento de carnes entre outras, também demonstraram ser relevantes[33].

5. Imunopatogenia

A resposta do hospedeiro ao parasita envolve o estímulo a sua imunidade celular, humoral e inata[33,34]. Essa resposta imunológica é responsável pelo controle da replicação do *T. gondii* no organismo por meio da ativação do sistema monócito-macrofágico, células dendríticas, células *natural killer* e células T CD4+ e CD8+ citotóxicas e específicas contra o *T. gondii*[34]. Além disso, moléculas coestimuladoras e citocinas como INF- γ, IL-12, TNF-α, IL-10 e TGB-β também estão envolvidas[33].

Em casos de infecção congênita, um atraso ou diminuição na resposta da célula T CD4+ antígeno-específica é observado[33]. Uma resposta imune efetiva elimina a maioria dos taquizoítas e aqueles remanescentes convertem-se em bradizoítas contidos em cistos teciduais[33]. Em caso de comprometimento significativo da imunidade celular esses bradizoítas podem reverter-se em taquizoítas resultando em reativação da doença[33].

6. A doença

Em contraste à sua elevada prevalência, geralmente sinais e sintomas da doença são incomuns[19]. Em torno de 10 a 20% dos infectados serão sintomáticos com a infecção aguda[19]. Entre as gestantes observa-se situação similar, pois, a maioria dos casos de infecção aguda serão assintomáticos, reforçando a necessidade do diagnóstico laboratorial durante o pré-natal[15].

A gravidade da doença está diretamente relacionada a fatores como a virulência da cepa envolvida e características genéticas do indivíduo acometido[35]. Os imunocomprometidos e os fetos geralmente apresentam quadros mais graves da doença[19].

Entre os indivíduos imunocomprometidos, a manifestação clínica mais observada é a encefalite, representando a principal causa de massa cerebral em pacientes portadores do vírus HIV, principalmente aqueles com contagem de células T CD4+ inferior a 200[29]. Entre os sintomas mais comuns estão cefaléia, febre, hemiparesia, ataxia, paralisia de nervo craniano, alteração do nível de consciência e convulsão[36]. Esta é uma condição potencialmente fatal[36].

A toxoplasmose ocular é considerada uma das principais causas de cegueira em diversos países[37]. Sintomas visuais relacionam-se ao local anatômico onde se forma a lesão inflamatória[38]. Alterações acentuadas na acuidade visual resultam de importante acometimento da mácula, enquanto lesões mais periféricas geram alterações visuais mais frustas e por vezes imperceptíveis[38]. Apresenta-se comumente como uveíte posterior, com lesão de retinocoroidite unilateral e vitreíte[38]. A toxoplasmose ocular é secundária à infecção congênita ou adquirida, sendo clinicamente impossível distingui-las,

especialmente no adulto[39]. No entanto, há evidências que a maioria dos casos de retinocoroidite por *T. gondii* seja secundária à infecção pós-natal[38].

Em pacientes imunocompetentes, a toxoplasmose aguda adquirida geralmente é uma infecção autolimitada e benigna similar à síndrome de mononucleose que raramente necessita de tratamento[40]. Transtornos neuropsiquiátricos e da cognição também já foram relacionadas à infecção[29].

Gestantes sintomáticas cursam com quadros clínicos benignos e auto-limitados, referindo principalmente febre, linfonodomegalias, cefaléia, mialgia, astenia e dor de garganta[10]. A transmissão transplacentária do *T. gondii* acontece em casos de infecção aguda materna, mesmo na ausência de sintomas maternos[15].

Quando a infecção ocorre no primeiro trimestre a chance de transmissão para o feto é menor, em torno de 15% (13%-17%), porém o risco para doença congênita grave é maior[41]. Já com o avançar da gestação essas taxas de transmissão aumentam para 44% (40%-47%) no segundo trimestre e 71% (66%-76%) no terceiro trimestre[41]. Cerca de 70% dos recém-nascidos com a doença congênita são assintomáticos ao nascimento e aproximadamente 10% apresentam manifestações graves da doença ao nascimento[41]. Fatores que impactam na incidência e sinais clínicos da doença são a idade gestacional, genética do hospedeiro e do parasita, tamanho do inóculo, forma de aquisição (oocisto ou cisto tecidual) e tratamento durante a gestação[33]. Em países como a França que rastreiam e tratam a infecção na gestante, observa-se redução expressiva dos casos sintomáticos ao nascimento, contrastando com países como os Estados Unidos e os da América Latina onde se observam altas taxas de mortalidade e casos mais graves da doença congênita[33].

Alterações em ultrassonografia obstétrica variam desde total normalidade até morte fetal[33]. Além disso, em algumas situações é possível observar hidrocefalia, calcificações cerebrais ou hepáticas, esplenomegalia, pericardite e ascite[33]. Manifestações clínicas da toxoplasmose congênita são diversas como coriorretinite, encefalite, convulsões, alterações no perímetro cefálico (microcefalia, macrocefalia ou hidrocefalia), nistagmo, hipotonia, paralisias, espasticidade, calcificações cerebrais ou hepáticas, retardo intelectual e psicomotor, esplenomegalia, hepatomegalia, ascite, pericardite, pneumonite, diarreia, hipotermia, icterícia, petéquias, erupção cutânea, hipoacusia ou crescimento intrauterino restrito[41]. A tríade altamente sugestiva de doença congênita configura a presença de microcalcificações cerebrais, hidrocefalia e retinocoroidite[33]. Em alguns casos, o bebê pode nascer assintomático, mas desenvolver principalmente alterações oculares ao longo da vida[42].

Os custos para o sistema de saúde de um bebê com toxoplasmose congênita superam os gastos referentes a prevenção da infecção durante a gestação[43]. Além disso, a repercussão no âmbito familiar de um bebê acometido é inestimável[43].

7. Diagnóstico

Diversos são os testes disponíveis para o diagnóstico da toxoplasmose[19]. A sorologia é o mais amplamente utilizado, mas existem outras ferramentas como a demonstração histológica do parasito ou de seus antígenos, o isolamento do parasito por meio de cultura e a identificação e amplificação de seu material genético pela reação em cadeia da polimerase (PCR)[3,7].

O rastreio e tratamento da toxoplasmose durante a gestação, reduz transmissão e sequelas no feto[6,39]. A sorologia é o exame de escolha para rastreio de provável infecção materna[6]. A pesquisa de imunoglobulinas específicas anti-*T. gondii* das classes IgM e IgG e menos comumente das classes IgA e IgE contribuem no seu diagnóstico[7].

Gestantes suscetíveis à toxoplasmose, ou seja, que não tiveram contato prévio com o *T. gondii*, apresentam resultado de sorologia IgM e IgG não reagentes[7]. Estas devem redobrar os cuidados em prevenção e realizar o monitoramento sorológico durante o pré-natal[6]. O Ministério da Saúde desde 2020 sugere o rastreio da infecção durante o pré-natal pelo menos trimestral e se possível mensal[4]. Esta prática assemelha-se a política de sucesso adotada pela França no combate a toxoplasmose congênita[44].

A soroconversão de IgG, elevação dos títulos de IgG e presença de IgM indicam infecção aguda[7]. Mulheres imunocomprometidas podem reativar a infecção latente e ainda assim, transmitir ao feto[33].

O teste de avidez de IgG é um marcador temporal que avalia a força de ligação entre o antígeno do *T. gondii* e o anticorpo do tipo IgG do indivíduo infectado[45]. Avidez baixa ou intermediária sugere infecção recente, que tenha ocorrido há menos de quatro meses, já avidez alta indica infecção há mais de quatro meses e em gestantes com menos de 16 semanas de idade gestacional, permite excluir a possibilidade de risco para o feto (FIGURA 1)[31].

Apesar dos testes sorológicos serem amplamente difundidos, esses podem apresentar algumas limitações[46]. A possibilidade de resultados falso-

positivos, a presença de anticorpos residuais da classe IgM e o retardo da maturação do IgG, comprometem sua acurácia[46].

Uma vez confirmada a infecção materna não há obrigatoriedade de ter ocorrido infecção fetal[33]. O diagnóstico de certeza da toxoplasmose congênita ainda intraútero só é possível por meio da análise molecular do líquido amniótico utilizando a técnica de PCR que apresenta alta sensibilidade e especificidade diagnóstica, sendo utilizada rotineiramente no acompanhamento de gestantes com toxoplasmose em centros de referência[9,14].

A amniocentese é um procedimento seguro e de baixo risco[47]. No entanto, demanda a estrutura de um serviço qualificado em medicina fetal, normalmente restrito a centros de referência e nem sempre disponível a todas as gestantes com toxoplasmose[6].

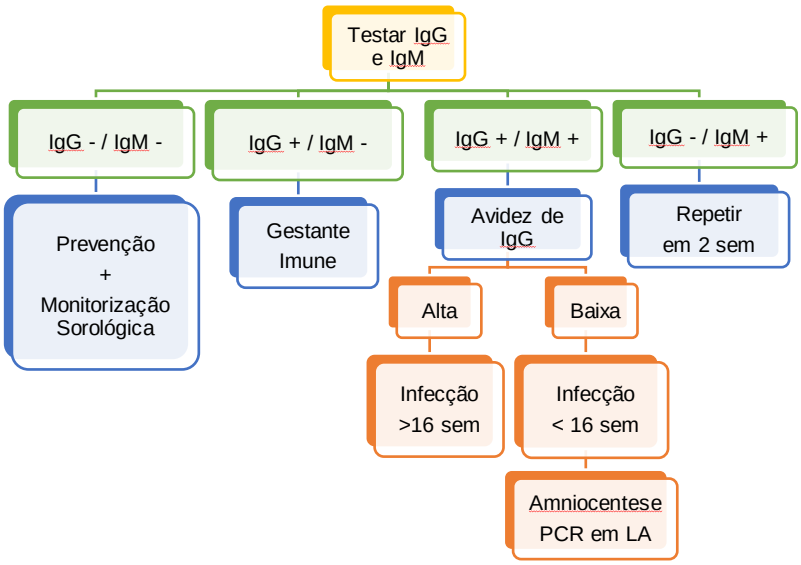


Figura 1: Fluxograma de diagnóstico da toxoplasmose em gestantes.

7.1 qPCR

Os testes moleculares permitiram precisão e agilidade diagnóstica[48]. A identificação do material genético de um agente etiológico oferece vantagens como identificação precoce de surtos, de cepas emergentes e de microorganismos resistentes[48]. Além disso, a quantificação desses agentes, ocasionalmente permite associação com a gravidade dos casos e contribui em decisões clínicas e terapêuticas[48].

Em 1989 foi publicado por Burg *et al.*, o primeiro protocolo qualitativo de PCR para *T. gondii* sendo descrita a amplificação de uma sequência do seu gene B1, repetida 35 vezes[9]. Desde então, diversos protocolos qualitativos já foram desenvolvidos para detecção de diferentes alvos na sequência de DNA do *T. gondii*[9]. Entretanto, isso proporcionou uma grande diversidade entre testes[9]. Posteriormente, o advento de protocolos quantitativos reduziu essas diferenças, além de permitir quantificar a carga parasitária[9]. O gene B1 repetido 35 vezes possui boa sensibilidade e ainda é muito utilizado, mas outra sequência REP-529, mais recentemente descrita, sendo repetida de 200 a 300 vezes leva a uma melhor detecção de cargas parasitárias e comparativamente ao gene B1 demostrou superioridade no diagnóstico da toxoplasmose[49].

A qPCR é o método diagnóstico de escolha por muitos laboratórios[50]. Essa tecnologia combina a química da reação em cadeia da polimerase com moléculas repórter fluorescentes para monitorar a formação de produtos de amplificação de material genético durante cada ciclo da reação[50]. Sua excelente sensibilidade e especificidade, facilidade de reprodução, baixo risco de contaminação e tempo reduzido de execução, tornou essa tecnologia uma alternativa atraente à PCR convencional[50].

A sensibilidade e especificidade da PCR no líquido amniótico é respectivamente, 87% e 99%, permitindo o diagnóstico ainda intraútero da toxoplasmose congênita e integrando este exame a rotina de atendimento a gestantes com toxoplasmose em centros de referência[9]. Resultados falso-negativos estão relacionados ao retardo da passagem do parasita por via transplacentária, baixa carga parasitária e efeitos da terapêutica[8,51].

Outras amostras biológicas também já foram avaliadas pela PCR, como exemplo temos o sangue periférico, placenta, sangue de cordão umbilical, líquido cefalorraquidiano (LCR) e urina[8]. A coleta dessas amostras ao nascimento e sua análise por meio da PCR seria de interesse, visto que permitiria o diagnóstico mais precoce da toxoplasmose congênita quando comparado ao acompanhamento sorológico[8]. No entanto, o valor diagnóstico dessas outras amostras biológicas ainda é questionável[8].

A parasitemia pelo *T. gondii* pode ser avaliada por meio da PCR em amostras de soro, plasma, sangue total e concentrado leucocitário (*buffy coat*), sendo que o concentrado leucocitário parece ser superior as outras amostras[52]. Em pacientes portadores do vírus HIV e imunossuprimidos com neurotoxoplasmose, a sensibilidade da PCR no sangue total foi de apenas 25% e a especificidade de 100%[53]. Pacientes imunocompetentes e com toxoplasmose aguda adquirida no Rio de Janeiro apresentaram resultado de PCR negativo em concentrado leucocitário, mesmo em casos mais graves da doença ou naqueles em que a coleta de sangue ocorreu muito próxima ao início dos sintomas[40]. Já em estudo realizado em Minas Gerais, 48% dos recém-nascidos com toxoplasmose congênita apresentaram amostras de sangue total positivas para PCR[54].

Amostras de placenta podem auxiliar no diagnóstico da toxoplasmose congênita tanto pela sua análise histopatológica quanto pela PCR[55]. Este órgão tem a importante função de prevenir a passagem de agentes infecciosos para o feto, sendo mais efetiva no início da gestação do que ao final[56]. A infecção da placenta pelo *T. gondii* pode resultar em placentite e levar à infecção das células do trofoblasto podendo deixar passar este parasita ao feto[56]. Apesar de sua análise histopatológica ser utilizada para auxiliar no diagnóstico da toxoplasmose congênita, essa abordagem ainda é controversa[56]. Caso similar observa-se no valor diagnóstico da placenta pela PCR que segue discutível. *Filisetti et al.* encontraram baixa sensibilidade (25%) do exame e *Sardarian et al.* apontam que em caso de resultado positivo não necessariamente há associação com a infecção fetal[57,58]. Em contrapartida, outros estudos sugerem melhor *performance* da PCR em análise de placentas, com sensibilidade que varia de 71% a 79,5% e especificidade de 92% a 97%[8].

Em recém-nascidos com achados clínicos e sorológicos sugestivos de toxoplasmose congênita de mães não tratadas durante a gestação, a análise do LCR demonstra potencial diagnóstico, com sensibilidade de 46,5% e especificidade de 100%[59]. Resultado similar observa-se na análise do sangue de cordão umbilical que apresenta especificidade de 100%, porém atrelada a uma baixa sensibilidade de 21,2%[8].

Amostras de urina são convenientes pela praticidade da coleta e por isso o interesse no seu uso[60]. O *T. gondii* já foi identificado em amostras de urina de recém-nascidos com diagnóstico de toxoplasmose congênita, no entanto são necessários mais estudos para compreender melhor sua contribuição nesse contexto diagnóstico[61].

O diagnóstico molecular no líquido amniótico implicou em mudanças profundas no manejo pré e pós-natal da toxoplasmose congênita[8]. No entanto, em alguns casos o acompanhamento irregular das gestantes durante o pré-natal e a recusa materna da amniocentese quando necessária, levou à busca por novas possibilidades diagnósticas como a análise por meio da PCR em outras espécimes biológicas[8]. Além disso, a análise dessas outras amostras clínicas pode vir a beneficiar o diagnóstico da toxoplasmose congênita em locais onde o rastreio e o tratamento pré-natal não foram implementados[7].

8. Tratamento

A transmissão materno-fetal da toxoplasmose varia entre 50 a 60% em gestantes não tratadas, reduzindo para 25 a 30% naquelas sistematicamente rastreadas e tratadas[33].

Basicamente o arsenal terapêutico contra o *T. gondii* na gestação é baseado no uso de espiramicina e a associação de sulfadiazina, pirimetamina e ácido folínico[62].

A espiramicina apresenta boa concentração placentária reduzindo em até 60% a transmissão da infecção para o feto, mas como não ultrapassa a barreira transplacentária não é capaz de tratar o feto[33,63]. Por isso, seu uso está restrito a infecções que ocorrem antes de 16 semanas de gestação ou em caso de comprovação da ausência de infecção fetal por meio de resultado negativo da PCR no líquido amniótico[4].

O esquema composto por sulfadiazina, pirimetamina e ácido folínico ultrapassa a barreia transplacentária e permite o tratamento do feto[33]. Geralmente, seu uso está indicado a partir de 16 semanas de gestação e na

impossibilidade de realizar amniocentese ou em casos de confirmação da infecção fetal por meio da PCR no líquido amniótico[4].

O benefício do tratamento em reduzir a transmissão materno-fetal apresenta maior impacto quanto implementado em até 8 semanas após a soroconversão, idealmente nas primeiras 3 semanas[33]. Além disso, em caso de transmissão o tratamento reduz o desenvolvimento de formas graves da doença congênita[3]. No entanto, alguns autores ainda questionam os benefícios do tratamento durante a gestação[62,63]. A dificuldade na realização de ensaios clínicos em gestantes contribui para a escassez de conclusões definitivas em relação à eficácia do tratamento materno[10]. Até o momento, apenas um ensaio clínico foi publicado e comparou gestantes que fizeram uso apenas de espiramicina ao grupo que fez uso de sulfadiazina, pirimetamina e ácido folínico[63]. Neste estudo, observou-se que o uso do esquema com três drogas teve maior impacto principalmente em reduzir sequelas neurológicas[63]. A comparação com grupo placebo não é eticamente aceitável visto que diversos estudos observacionais já demonstraram alguma eficácia do tratamento[63].

O esquema com três drogas é bem menos tolerado quando comparado ao uso isolado de espiramicina[16]. Eventos adversos graves já foram verificados com uso de sufadiazina, pirimetamina e ácido folínico[16]. Clindamicina é uma opção a sulfadiazina, no entanto, são escassos estudos *in vivo* em gestantes e no Brasil essa droga não está disponibilizada no sistema público de saúde para gestantes com toxoplasmose[4,62]. A carência de inovações terapêuticas para toxoplasmose é uma dificuldade a ser enfrentada[62].

O tratamento do recém-nascido com doença congênita consiste no uso de sulfadiazina, pirimetamina e ácido folínico por um ano[33]. Recém-nascidos não

tratados apresentam risco de desenvolver principalmente lesões oculares ao longo da vida, além de outras sequelas tardias como retardo no neurodesenvolvimento[3]. A associação de corticosteróides é necessária em caso de proteinorraquia superior a 1g/dl ou em caso de lesões oculares próximas à mácula[33]. Nos casos graves com hidrocefalia, a derivação ventricular é indicada[33].

METODOLOGIA

1. Desenho de estudo

Estudo descritivo de gestantes com diagnóstico de toxoplasmose acompanhadas no ambulatório de doenças infecto-parasitárias no Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira (IFF/Fiocruz) no Rio de Janeiro, Brasil.

As participantes foram recrutadas no período de junho de 2019 a dezembro de 2021. Foram incluídas gestantes com diagnóstico sorológico de toxoplasmose especificado abaixo e excluídas gestantes sabidamente com o diagnóstico de infecção pelo vírus HIV, hepatites B e C e em uso de terapia imunossupressora.

O diagnóstico sorológico de toxoplasmose foi realizado pelo Laboratório de Imunologia do IFF/Fiocruz, por ensaio imunofluorométrico – ELFA (*VIDAS®, Biomérieux,* França) em alíquotas de soro, para identificação de imunoglobulinas específicas anti-*T. gondii* da classe IgM e IgG. Este teste sorológico é uma variação da técnica original do *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), sendo mais sensível, detectando inclusive IgM residuais[13]. Na presença das imunoglobulinas IgM e IgG foi realizado o teste de avidez de IgG pela mesma técnica e fabricante.

Definiu-se como caso de toxoplasmose gestantes que apresentaram soroconversão de anticorpos anti-*T. gondii* da classe IgG ou presença de anticorpos anti-*T. gondii* tanto da classe IgM quanto IgG, associada à baixa ou

moderada avidez de IgG ou à alta avidez de IgG se exame realizado com mais de 16 semanas de gestação.

O diagnóstico molecular pela técnica da qPCR, objeto de investigação desse estudo, foi realizado pelo Laboratório de Alta Complexidade do IFF/Fiocruz.

Das gestantes foram coletadas amostras de sangue periférico, líquido amniótico e placenta e dos recém-nascidos, amostras de sangue periférico. Em todas as amostras foi realizado o teste de qPCR pelo sistema *TaqMan*, utilizando iniciadores específicos para amplificar a sequência do *T. gondii* de 529 pares de bases.

O DNA genômico foi extraído das diferentes fontes usando *QIAamp® DNA Blood Mini Kit* (QIAGEN, Holanda) de acordo com as instruções dos fabricantes. A concentração de ácido nucleico foi estimada por espectrofotometria UV a 260 nm (Nanodrop 1000, ThermoFisher Scientific, EUA).

A detecção de *T. gondii* por PCR foi realizada conforme já descrito[64]. Aproximadamente 10 ng de DNA foram usados no PCR com o mix de primers (270F, 5'-AGAGACACCGGAATGCGATCT-3' e 318R, 5'-TTCGTCCAAGCCTCCGACT-3') e sonda TaqMan (310T: 5'-FAM-TCGTGGTGATGGCGGAGAGAATTGA-TAMRA-3 ′) para a sequência altamente repetitiva REP-529. As reações foram realizadas em triplicata em um sistema 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems®) em um volume final de 25 µl usando o PCR TaqMan Universal Master Mix (ThermoFisher Scientific) (FIGURA2).

Primers e sonda utilizados para PCR em tempo real
Primers
270F 5’- AGAGACACCGGAATGCGATCT -3’
318R 5’- TTCGTCCAAGCCTCCGACT – 3’
Sonda
FAM 5’ – TCGTGGTGATGGCGGAGAGAATTGA – 3’ TAMRA

Figura 2: Conjunto de iniciadores e sonda utilizados nas reações de PCR em tempo real.

As condições de ciclagem térmica incluíram uma etapa de dois minutos a 50 °C para atividade ideal de AmpliErase UNG e desnaturação a 95 °C por dez minutos, seguido por 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por um minuto. As curvas padrão foram estabelecidas com diluição seriada de dez vezes do DNA de *T. gondii* (10^6 até um parasita/ml). A eficiência da PCR foi superior a 92% e o coeficiente de correlação foi ≥ 0,99 em todos os ensaios. Amostras com Ct > 38 foram classificadas como indetectáveis.

A amplificação de RNaseP humana foi utilizada como controle para determinar a qualidade do DNA e a presença de inibidores de PCR, e foi realizada com X20 RNAseP Primer Probe (Applied Biosystems). O controle positivo consistiu em uma pequena quantidade (1-10 cópias/ml) de DNA genômico do parasita (FIGURA 3).

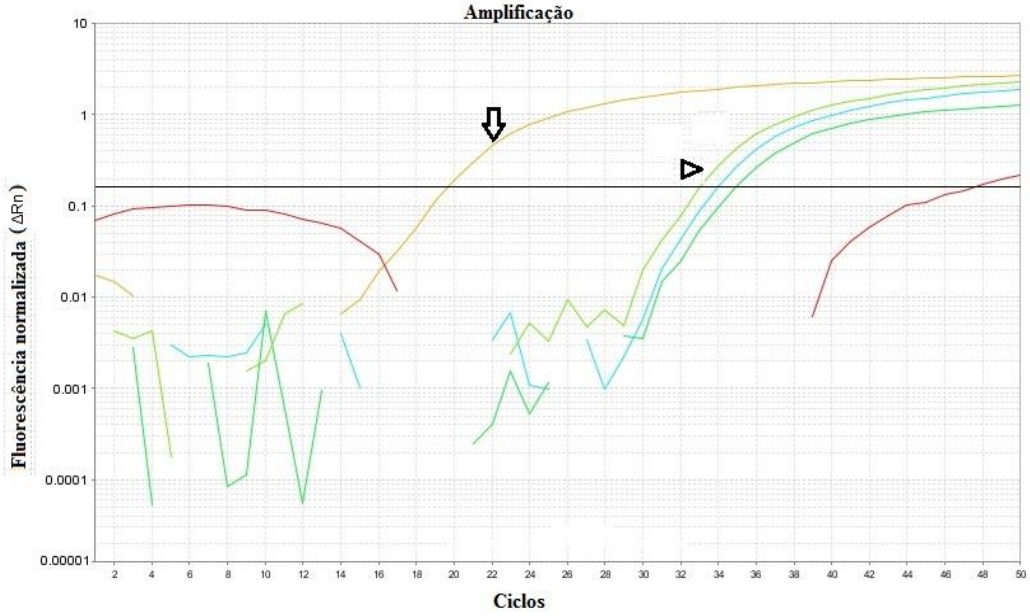


Figura 3: Gráfico de amplificação da amostra de DNA extraído do líquido amniótico gerado através do *Applied Biosystem 7500 Real-Time PCR Software*. Eixo x - ciclos; eixo y – valores de fluorescência normalizada (∆Rn). A seta indica a curva de amplificação do controle, e a ponta de seta indica as curvas referentes à triplicata da amostra.

Os recém-nascidos foram rastreados para infecção congênita por meio dos seguintes exames: ultrassonografia transfontanela, exame de fundo de olho e sorologia para toxoplasmose com identificação de anticorpos específicos anti-*T. gondii* da classe IgM e IgG a partir do quinto dia de vida. O critério para o diagnóstico de toxoplasmose congênita nos recém-nascidos foi: PCR no líquido amniótico positivo e/ou presença de alterações nos exames de rastreio ao nascimento já descritas[41]. As placentas também foram encaminhadas para análise histopatológica.

A partir dos resultados obtidos com a análise por meio da qPCR de cada amostra coletada descrevemos sua positividade ou negatividade em sangue periférico, líquido amniótico e placenta da gestante e sua positividade ou negatividade no sangue periférico dos recém-nascidos. Além disso, foi feita a

comparação do resultado positivo ou negativo na placenta, a sua análise histopatológica e por fim, avaliamos aassociação entre o resultado positivo ou negativo da qPCR nessas amostras biológicas e a ocorrência ou não de infecção congênita.

2. Estatística e análise de dados

Inicialmente o tamanho amostral foi calculado com base na sensibilidade da qPCR em cada uma das espécimes clínicas que seriam analisadas: (1) líquido amniótico (Sensibilidade 86,3%/N=76), placenta (Sensibilidade 79,5%/N=105) e sangue periférico (Sensibilidade 21,2%%/N=108), considerando uma prevalência da toxoplasmose em gestante de 77,5% no Brasil[65], com confiança de 95%, erro de 10%, acrescido de perda de 30%. No entanto, para as amostras de placenta e sangue periférico do recém-nascido não foi possível alcançar o tamanho amostral inicialmente calculado, pois algumas pacientes tiveram seus partos em outras maternidades, além de ocorrer perdas internas de amostras. O período em que foi realizado o estudo englobou o ápice da pandemia pelo vírus Sars-CoV-2, o que reduziu de forma expressiva o número de atendimentos em nosso ambulatório e por consequência, reduziu o recrutamento de pacientes para o estudo.

Os dados foram coletados em ficha específica (APÊNDICE I) e armazenados e analisados no programa Epiinfo versão 7.2.4.0. A análise exploratória dos dados foi feita com a descrição das variáveis categóricas como frequências absolutas e relativas e as variáveis numéricas como médias.

As variáveis numéricas analisadas foram: idade materna, idade gestacional, peso, perímetro cefálico e APGAR. As variáveis categóricas foram: escolaridade

materna, local do pré-natal de origem (público/privado/demanda espontânea), resultados sorológicos (reagente/não reagente/ avidez alta, baixa ou moderada), resultados da qPCR (positivo/negativo) no sangue periférico, líquido amniótico e placenta, alterações ultrassonográficas (presente/ausente), alterações no exame de fundo de olho (presente/ausente) e alterações histopatológicas (presente/ausente).

3. Questões éticas

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IFF/Fiocruz (CAAE: 14832713.7.0000.5268 / Número do parecer: 3.587.173). Todas as gestantes foram orientadas verbalmente durante consulta médica sobre o estudo e a utilização dos dados em prontuário e resultados de exames. As participantes que concordaram em contribuir com o estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE II) e as menores de 18 anos assinaram o Termo de Assentimento (APÊNDICE III) junto aos seus responsáveis.

RESULTADOS

Foram estudadas 116 gestantes com diagnóstico de toxoplasmose com idade média de 25,8 anos (Mínimo 14 e Máximo 43). A maioria (97/83,6%) foi encaminhada ao centro de referência pelo serviço público de saúde, seguido da rede privada (16/13,8%) e três (2,6%) procuraram atendimento por demanda espontânea. Sessenta (51,7%) mulheres residiam no município do Rio de Janeiro e 56 (48,3%) em municípios vizinhos. Cinquenta e duas (44,8%) gestantes não tinham completado o ensino básico e 18 (15,5%) cursaram ensino superior.

Sintomas sugestivos de toxoplasmose aguda adquirida foram relatados por 14 (12,1%) mulheres, enquanto 102 (87,9%) foram assintomáticas. Os sintomas descritos em ordem decrescente foram linfonodomegalias (8/6,9%), febre (7/6,0%), cefaléia (3/2,6%), dor de garganta (1/0,9%) e mialgia (1/0,9%). O tratamento não foi prescrito nas unidades de origem para 29 (25%) gestantes e em 15 (12,9%), prescrito de forma incorreta.

A qPCR foi realizada em 298 amostras biológicas: 116 (38,9%) de sangue periférico das gestantes, 85 (28,5%) de líquido amniótico, 44 (14,8%) de placenta e 53 (17,8%) de sangue periférico dos recém-nascidos (Figura 4). As quatro amostras foram obtidas em 33 (28,5%) casos; pelo menos três amostras em 20 (17,2%), pelo menos duas amostras em 45 (38,8%) e apenas uma amostra em 18 (15,5%).

Uma (0,9%) gestante apresentou qPCR positiva no sangue periférico, três (3,5%) no líquido amniótico, uma (2,3%) na placenta e nenhum recém-nascido

apresentou qPCR positiva no sangue periférico. Cada um desses resultados positivos ocorreu em casos distintos.

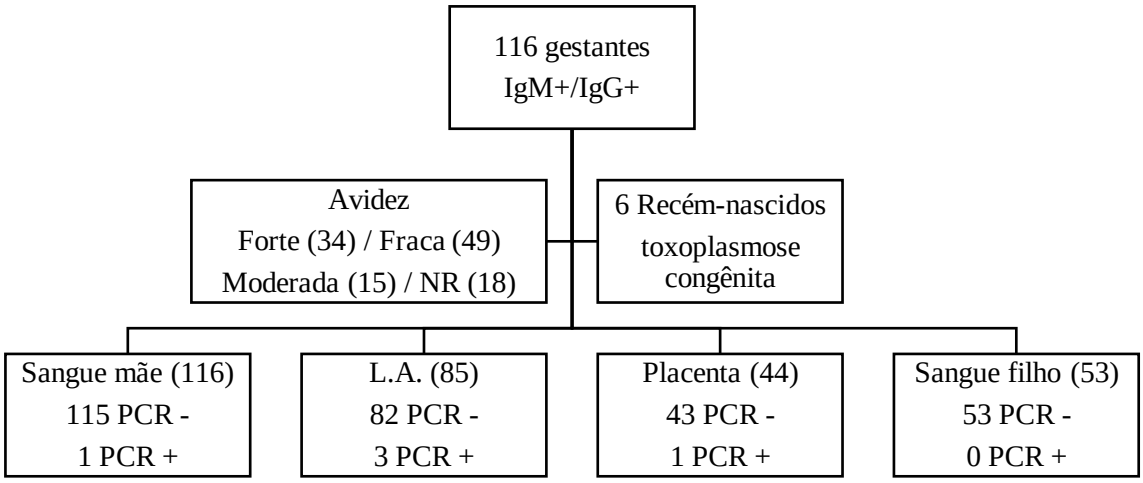


Figura 4: Fluxograma descritivo dos resultados da população estudada. L.A. (Líquido amniótico) / NR (Não realizado) / (+) Positivo / (-) Negativo.

O teste de avidez de IgG não foi realizado em 18 (15,5%) casos, por apresentarem IgG acima do limite superior recomendado em bula do fabricante (*VIDAS®, Biomérieux,* França). Trinta e quatro (29,3%) gestantes apresentaram alta avidez de IgG, 49 (42,3%) baixa e 15 (12,9%) moderada. Todas as gestantes com alta avidez de IgG estavam com idade gestacional superior a 16 semanas. As três gestantes com qPCR positiva no líquido amniótico e aquela com qPCR positiva na placenta apresentavam baixa avidez de IgG. No entanto, a única gestante com qPCR positiva no sangue periférico apresentava alta avidez.

Dados referentes aos recém-nascidos foram coletados em 63 casos (54,3%), uma vez que 53 (45,7%) partos ocorreram em outras maternidades. A idade gestacional média no parto foi de 38,6 semanas (Mínimo 30 e Máximo 42), peso ao nascer médio de 3,2 Kg (Mínimo 1,2 e Máximo 4,1) e o perímetro cefálico

médio de 34 cm (Mínimo 29 e Máximo 47). O APGAR médio no primeiro minuto foi oito (Mínimo 5 e Máximo 10) e no quinto minuto nove (Mínimo 7 e Máximo 10).

Três (4,8%) recém-nascidos apresentaram alterações sugestivas de infecção congênita à ultrassonografia transfontanela e dois (3,2%) ao exame de fundo de olho. Quanto ao resultado de sorologia para toxoplasmose, três (4,8%) apresentaram IgM anti-*T. gondii* positivo e 62 (98,4%) IgG positivo. Seis (5,2%) recém-nascidos foram diagnosticados com toxoplasmose congênita.

Os recém-nascidos com qPCR positiva no líquido amniótico tiveram o diagnóstico de toxoplasmose congênita confirmado, enquanto os recém-nascidos das gestantes com qPCR positiva no sangue periférico materno e na placenta, não tiveram essa confirmação diagnóstica (Tabela 1).

A análise histopatológica foi realizada em 49 placentas. Dessas, 24 (49,0%) apresentaram alterações sugestivas de infecção por toxoplasmose, 23 (46,9%) apresentaram alterações inespecíficas e apenas duas (4,1%) eram normais. Vale ressaltar, que em nenhuma amostra de placenta o *T. gondii* foi observado. As principais alterações observadas foram placentite hematogênica em atividade e cicatricial. A única placenta com qPCR positiva, também apresentava alterações histopatológicas sugestivas de toxoplasmose.

Tabela 1: Descrição dos casos de toxoplasmose congênita e dos com amostra de PCR positiva.

Participante	Avidez	PCR Sangue materno	PCR L.A.	PCR PLACENTA	PCR SANGUE FILHO	HISTOPATOLOGIA PLACENTA	Rastreio RN
5.	Baixa	-	+	-	-	NR	USTF e F.O. alterados Sorologia IgM-/IgG+
11.	Baixa	-	+	-	-	Placentite hematogênica cicatricial	USTF e F.O sem alterações Sorologia IgM-/IgG+
19. Soroconversão	Baixa	-	+	NR	-	Placentite hematogênica em atividade de alto grau	USTF alterado e F.O. sem alterações Sorologia IgM-/IgG+
32.	Alta	+	NR	-	-	Placentite hematogênica em atividade leve	USTF e F.O. sem alterações Sorologia IgM-/IgG+
40. Soroconversão	Baixa	-	NR	-	-	Outras alterações não sugestivas de toxoplasmose	USTF e F.O. sem alterações Sorologia IgM+/IgG+
47. Soroconversão	Baixa	-	NR	NR	NR	Placentite hematogênica em atividade leve	USTF e F.O. sem alterações Sorologia IgM+/IgG+
58. Soroconversão	NR	-	NR	NR	-	Placentite hematogênica em atividade leve	USTF e F.O. alterados Sorologia IgM+/IgG+
102.	Baixa	-	-	+	-	Placentite hematogênica em atividade de alto grau	USTF e F.O. sem alterações Sorologia IgM -/IgG+

**NR, Não realizado; (+), Positivo; (-) Negativo; L.A, Líquido amniótico; RN, Recém-nascido; USTF, Ultrassom transfontanela; F.O., Fundo de olho.*

DISCUSSÃO

A toxoplasmose no Brasil é associada a problemas sociais importantes como pobreza e baixa escolaridade[3]. Falhas no atendimento a gestantes com toxoplasmose, já foram observadas em estudos anteriores e com isso, a toxoplasmose congênita persiste como um grave problema de saúde no país[5,10,12].

O rastreio sorológico da infecção durante a gestação permite o seu diagnóstico, já que a maioria dos casos é totalmente assintomática[6], assim como foi observado sintomas em apenas 14 (12,1%) mulheres. Em caso de sintomas, geralmente a doença mimetiza a síndrome de *mononucleose-like*[40], semelhante aos sintomas mais descritos neste estudo: linfonodomegalia, febre, cefaléia, dor de garganta e mialgia.

Com o advento dos testes moleculares, surgiram novas possibilidades diagnósticas para toxoplasmose congênita, com maior agilidade e precisão[8]. A elevada acurácia da PCR no líquido amniótico levou à sua inclusão na rotina de atendimento às gestantes com toxoplasmose nos centros de referência e hoje o resultado positivo no líquido amniótico é um dos critérios definidores de doença congênita[17]. No presente estudo recém-nascidos com resultado positivo no líquido amniótico foram diagnosticados com toxoplasmose congênita, enquanto todos com PCR negativa tiveram o diagnóstico excluído.

A PCR no sangue periférico, já foi avaliada como alternativa para o diagnóstico de toxoplasmose[8]. A parasitemia pelo *T. gondii* pode ser avaliada por meio da PCR em amostras de soro, plasma, sangue total e concentrado leucocitário, sendo o concentrado leucocitário superior às outras amostras[8,52].

No entanto, a sensibilidade do exame em amostras de sangue total foi baixa (25%) em pacientes imunocomprometidos com encefalite por toxoplasmose[53]. Em estudo realizado em nosso laboratório com pacientes imunocompetentes com toxoplasmose aguda adquirida, nenhuma amostra de concentrado leucocitário foi positiva pela PCR, mesmo em casos mais graves da doença ou naqueles em que a coleta de sangue ocorreu muito próxima ao início dos sintomas[40]. Com isso, persiste a dúvida se há diferença expressiva na análise de amostras de concentrado leucocitário e sangue total.

A PCR em sangue materno até o momento, também não demonstrou ser promissora devido à sua baixa positividade e ausência de associação diagnóstica com a infecção[51]. Resultado semelhante foi observado entre as 116 amostras de sangue periférico materno analisadas por nós, sendo apenas uma (0,9%) positiva, apesar de todas as gestantes terem diagnóstico de toxoplasmose confirmado por sorologia.

Os testes sorológicos associados à avidez de IgG auxiliam no diagnóstico da toxoplasmose, mas apresentam limitações como falso-positivos ou imaturidade de IgG, que dificultam a sua definição[7]. A associação entre PCR positiva no líquido amniótico e baixa avidez de IgG, assim como alta avidez com PCR positiva em sangue periférico materno, já foi anteriormente descrita[51]. Essa observação, reforça a associação entre baixa avidez de IgG e PCR positiva no líquido amniótico e sugere limitações do uso da técnica com sangue periférico materno. A positividade da PCR no sangue materno pouco foi reportada e por isso, sua significância clínica ainda não está clara[51]. A identificação do DNA do *T. gondii* no sangue poderia representar infecção primária, o que não é comum em casos de alta avidez de IgG ou a reativação da infecção que é mais comum

em pacientes imunocomprometidas, que foi critério de exclusão para participação neste estudo.

T. gondii apresenta tropismo pela placenta, assim como pelo sistema nervoso central e ocular[19]. Apesar desse tropismo, a placenta exerce uma importante função de barreira e proteção para o feto contra agentes infecciosos[56]. Portanto, a placenta é um material biológico com bom potencial para o diagnóstico de toxoplasmose congênita[56]. A infecção do tecido placentário pode resultar em placentite[56], sendo essa alteração a mais encontrada na análise histopatológica de todas as placentas que sugeriam diagnóstico por toxoplasmose. No entanto, a presença de alterações histopatológicas sugestivas de toxoplasmose em 24 (49,0%) placentas só esteve associada à infecção congênita em quatro (16,7%) casos. Assim como PCR positiva ocorreu em apenas uma amostra e o diagnóstico de doença congênita não foi confirmado no recém-nascido. Até o momento, os estudos ainda são controversos em relação ao papel da placenta no diagnóstico histopatológico e molecular da toxoplasmose congênita[8,56–58].

A PCR foi negativa em todas as amostras de sangue periférico dos recém-nascidos, inclusive naqueles com diagnóstico confirmado de toxoplasmose congênita, o que vai de encontro à alta positividade (48%) observada em outro estudo brasileiro com a mesma metodologia para o diagnóstico molecular[54]. Genótipos distintos do *T. gondii*, cepas mais virulentas e variações da parasitemia, podem explicar essa diferença de resultados[2,5] .

Níveis séricos dos antimicrobianos pode influenciar no resultado da PCR, como já observado em resultado negativo de líquido amniótico coletado de gestante em uso de esquema tríplice e feto diagnosticado com toxoplasmose

congênita[10]. Com isso, poderíamos justificar a elevada negatividade observada nas amostras biológicas analisadas nos casos que vinham em uso de alguma terapia. Entretanto, vale ressaltar que todas as gestantes realizaram a coleta do líquido amniótico em uso apenas de espiramicina que não ultrapassa a barreira transplacentária[56].

Perda de amostras, principalmente por partos ocorridos em outras maternidades implicando em descontinuidade no seguimento desses casos e a limitação do tempo de acompanhamento dos recém-nascidos, são limitações do estudo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Déficits no rastreio diagnóstico da toxoplasmose durante o pré-natal e dificuldades no diagnóstico pós-natal justificam a busca por novas possibilidades diagnósticas.

Compreender melhor o papel dos testes moleculares para auxiliar o diagnóstico da toxoplasmose congênita utilizando diversos exemplares biológicos contribui na perspectiva futura do seu diagnóstico.

Entretanto, neste estudo tanto as amostras de sangue materno quanto as de sangue dos recém-nascidos, assim como a placenta, não demonstraram ser promissoras no diagnóstico da toxoplasmose congênita.

Assim, novos estudos são necessários para avaliar o real papel do diagnóstico molecular em outros materiais biológicos que não o líquido amniótico.

REFERÊNCIAS BIBL IOGRÁFICAS

1. Wallon, M. & Peyron, F. Congenital toxoplasmosis: A plea for a neglected disease. *Pathogens* **7**, 1–9 (2018).

2. Dubey, J. P., Lago, E. G., Gennari, S. M., Su, C. & Jones, J. L. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology* **139**, 1375–1424 (2012).

3. Dubey, J. P., Murata, F. H. A., Cerqueira-Cézar, C. K., Kwok, O. C. H. & Villena, I. Congenital toxoplasmosis in humans: an update of worldwide rate of congenital infections. *Parasitology* **148**, 1406–1416 (2021).

4. Saúde, M. da. Nota Técnica que apresenta fluxograma de diretriz Nacional, para a condução clínica do diagnósco e tratamento da Toxoplasmose Gestacional e Congênita. *NOTA TÉCNICA Nº 14/2020-COSMU/CGCIVI/DAPES/SAPS/MS 1.* 1–6 https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2020/July/29/SEI-MS---0014746811---Nota-T--cnica--1-.pdf (2020).

5. Strang, A. G. G. F. *et al.* The congenital toxoplasmosis burden in Brazil: Systematic review and meta-analysis. *Acta Trop.* **211**, (2020).

6. Peyron, F. *et al.* Maternal and congenital toxoplasmosis: Diagnosis and treatment recommendations of a French multidisciplinary working group. *Pathogens* **8**, 1–15 (2019).

7. Pomares, C. & Montoya, J. G. Laboratory Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* **54**, 2448–2454 (2016).

8. Robert, M. G., Brenier-Pinchart, M. P., Garnaud, C., Fricker-Hidalgo, H. & Pelloux, H. Molecular diagnosis of toxoplasmosis: recent advances and a look to the future. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **19**, 1529–1542 (2021).

9. De Oliveira Azevedo, C. T., Do Brasil, P. E. A. A., Guida, L. & Moreira, M. E. L. Performance of Polymerase chain reaction analysis of the amniotic fluid of pregnant women for diagnosis of congenital toxoplasmosis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* **11**, 1–26 (2016).

10. De La Fuente Villar, B. B. *et al.* Toxoplasmosis in pregnancy: a clinical, diagnostic, and epidemiological study in a referral hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian J. Infect. Dis.* **24**, 517–523 (2020).

11. Ministério da Saúde Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, B. *Protocolo de Notificação e Investigação: Toxoplasmose gestacional e congênita [recurso eletrônico]/*. (2018).

12. Bueno, W. F. *et al.* Difficulties observed in a reference center in the diagnosis and management of pregnant women with toxoplasmosis. *Sci. Med. (Porto. Alegre).* **20**, 40 (2010).

13. Marques, B. A., Andrade, G. M. Q. de, Neves, S. P. F., Pereira, F. H. & Talim, M. C. T. Systematic review of serological methods used in prenatal screening of toxoplasmosis in pregnant women. *Rev. Médica Minas Gerais* **25**, S68–S81 (2015).

14. Prusa, A. R. *et al.* Amniocentesis for the detection of congenital toxoplasmosis: Results from the nationwide Austrian prenatal screening program. *Clin. Microbiol. Infect.* **21**, 191.e1-191.e8 (2015).

15. Montoya, J. G. & Remington, J. S. Management of Toxoplasma gondii infection during pregnancy. *Clinical Infectious Diseases* vol. 47 554–566 at https://doi.org/10.1086/590149 (2008).

16. Guaraldo, L. *et al.* Ocular toxoplasmosis: Adverse reactions to treatment in a Brazilian cohort. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **112**, 188–192 (2018).

17. Delhaes, L., Yera, H., Ache, S., Tsatsaris, V. & Houfflin-Debarge, V. Contribution of molecular diagnosis to congenital toxoplasmosis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **76**, 244–247 (2013).

18. Dubey, J. P. The history of Toxoplasma gondii--the first 100 years. *J. Eukaryot. Microbiol.* **55**, 467–475 (2008).

19. Montoya, J. G. & Liesenfeld, O. Toxoplasmosis. *Lancet (London, England)* **363**, 1965–1976 (2004).

20. Dubey, J. P., Lindsay, D. S. & Speer, C. A. Structures of Toxoplasma gondii tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**, 267–299 (1998).

21. Jones, J. L. & Dubey, J. P. Waterborne toxoplasmosis - Recent developments. *Exp. Parasitol.* **124**, 10–25 (2010).

22. Jones, J. L. & Dubey, J. P. Foodborne toxoplasmosis. *Clin. Infect. Dis.* **55**, 845–851 (2012).

23. Hosseini, S. A. *et al.* Human toxoplasmosis: a systematic review for genetic diversity of Toxoplasma gondii in clinical samples. *Epidemiol. Infect.* **147**, (2018).

24. Robert-Gangneux, F. It is not only the cat that did it: How to prevent and treat congenital toxoplasmosis. *J. Infect.* **68**, S125–S133 (2014).

25. Giugno, S. *et al.* Congenital toxoplasmotic chorioretinitis following reinfection. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **251**, 263–265 (2020).

26. Garcia Bahia-Oliveira, L. M. *et al.* Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in North Rio de Janeiro State, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **9**, 55–62 (2003).

27. Minuzzi, C. E. *et al.* Contaminated water confirmed as source of infection by bioassay in an outbreak of toxoplasmosis in South Brazil. *Transbound. Emerg. Dis.* **68**, 767–772 (2021).

28. Balbino, L. S. *et al.* Epidemiological study of toxoplasmosis outbreaks in Brazil. *Transbound. Emerg. Dis.* **69**, (2022).

29. Aguirre, A. A. *et al.* The One Health Approach to Toxoplasmosis: Epidemiology, Control, and Prevention Strategies. *Ecohealth* **16**, 378–390 (2019).

30. Minuzzi, C. E. *et al.* Isolation and molecular characterization of Toxoplasma gondii from placental tissues of pregnant women who received

toxoplasmosis treatment during an outbreak in southern Brazil. *PLoS One* **15**, (2020).

31. Villard, O. *et al.* Serological diagnosis of Toxoplasma gondii infection. Recommendations from the French National Reference Center for Toxoplasmosis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **84**, 22–33 (2016).

32. Peyron, F. *et al.* Congenital Toxoplasmosis in France and the United States: One Parasite, Two Diverging Approaches. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **11**, (2017).

33. Moncada, P. A. & Montoya, J. G. Toxoplasmosis in the fetus and newborn: an update on prevalence, diagnosis and treatment. Expert. Rev. Anti. Infect. Ther. **10**, 815–828 (2014).

34. Bhopale, G. M. Pathogenesis of toxoplasmosis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **26**, 213–222 (2003).

35. Torgerson, P. R. & Mastroiacovo, P. The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review. *Bull. World Health Organ.* **91**, 501–508 (2013).

36. Marra, C. M. Central nervous system infection with Toxoplasma gondii. *Handb. Clin. Neurol.* **152**, 117–122 (2018).

37. Minkus, C. L., Bispo, P. J. M., Papaliodis, G. N. & Sobrin, L. Real-Time Multiplex PCR Analysis in Infectious Uveitis. *Semin. Ophthalmol.* **34**, 252–255 (2019).

38. Kalogeropoulos, D. *et al.* Ocular toxoplasmosis: a review of the current diagnostic and therapeutic approaches. *Int. Ophthalmol.* **42**, 295–321 (2022).

39. Dubey, J. P., Murata, F. H. A., Cerqueira-Cézar, C. K., Kwok, O. C. H. & Villena, I. Congenital toxoplasmosis in humans: an update of worldwide rate of congenital infections. *Parasitology* **148**, (2021).

40. Neves, E. S. *et al.* PCR-based diagnosis is not always useful in the acute acquired toxoplasmosis in immunocompetent individuals. *Parasitol. Res.* **120**, 763–767 (2021).

41. Maldonado, Y. A. *et al.* Diagnosis, treatment, and prevention of congenital toxoplasmosis in the United States. *Pediatrics* **139**, (2017).

42. Khan, K. & Khan, W. Congenital toxoplasmosis: An overview of the neurological and ocular manifestations. *Parasitol. Int.* **67**, 715–721 (2018).

43. Stillwaggon, E., Carrier, C. S., Sautter, M. & McLeod, R. Maternal serologic screening to prevent congenital toxoplasmosis: A decision-analytic economic model. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **5**, (2011).

44. Wallon, M. *et al.* Congenital toxoplasma infection: Monthly prenatal screening decreases transmission rate and improves clinical outcome at age 3 years. *Clin. Infect. Dis.* **56**, 1223–1231 (2013).

45. Yamada, H. *et al.* A cohort study of maternal screening for congenital Toxoplasma gondii infection: 12 years' experience. *J. Infect. Chemother.* **25**, 427–430 (2019).

46. Sensini, A. Toxoplasma gondii infection in pregnancy: Opportunities and pitfalls of serological diagnosis. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**, 504–512 (2006).

47. Jummaat, F., Ahmad, S. & Mohamed Ismail, N. A. 5-Year review on amniocentesis and its maternal fetal complications. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* **40**, (2019).

48. Emmadi, R. *et al.* Molecular methods and platforms for infectious diseases testing a review of FDA-approved and cleared assays. *J. Mol. Diagn.* **13**, 583–604 (2011).

49. Edvinsson, B. *et al.* Real-time PCR targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**, 131–136 (2006).

50. Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castaño, M. J. & Solera, J. Real-time PCR detection chemistry. *Clin. Chim. Acta* **439**, 231–250 (2015).

51. Yamada, H. *et al.* Prospective study of congenital toxoplasmosis screening with use of IgG avidity and multiplex nested PCR methods. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 2552–2556 (2011).

52. Brenier-Pinchart, M. P. *et al.* Molecular diagnosis of toxoplasmosis: value of the buffy coat for the detection of circulating Toxoplasma gondii. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **82**, 289–291 (2015).

53. Ajzenberg, D. *et al.* Performance Testing of PCR Assay in Blood Samples for the Diagnosis of Toxoplasmic Encephalitis in AIDS Patients from the French Departments of America and Genetic Diversity of Toxoplasma gondii: A Prospective and Multicentric Study. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, (2016).

54. Costa, J. G. L. *et al.* Real-time PCR as a prognostic tool for human congenital toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* **51**, 2766–2768 (2013).

55. Robert-Gangneux, F. *et al.* Clinical relevance of placenta examination for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **29**, 33–38 (2010).

56. Robert-Gangneux, F. *et al.* The placenta: a main role in congenital toxoplasmosis? *Trends Parasitol.* **27**, 530–536 (2011).

57. Filisetti, D., Cocquerelle, V., Pfaff, A., Villard, O. & Candolfi, E. Placental testing for toxoplasma gondii is not useful to diagnose congenital toxoplasmosis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **29**, 665–667 (2010).

58. Sardarian, K. *et al.* Detection of Toxoplasma gondii B1 gene in placenta does not prove congenital toxoplasmosis. *Hum. Antibodies* **27**, 31–35 (2018).

59. Olariu, T. R., Remington, J. S. & Montoya, J. G. Polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **33**, 566–570 (2014).

60. Eskandarian, A. A. Improving Urine Sample Efficacy as a Convenient Alternative for Invasive Samples in Molecular Diagnosis of Toxoplasmosis.

8, 177–181 (2013).

61. Fuentes, I. *et al.* Urine sample used for congenital toxoplasmosis diagnosis by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 2368 (1996).

62. Dunay, I. R., Gajurel, K., Dhakal, R., Liesenfeld, O. & Montoya, J. G. Treatment of Toxoplasmosis : Historical Perspective , Animal. *Clin. Microbiol. Infect.* **31**, 1–33 (2018).

63. Mandelbrot, L. *et al.* Prenatal therapy with pyrimethamine + sulfadiazine vs spiramycin to reduce placental transmission of toxoplasmosis: a multicenter, randomized trial. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **219**, 386.e1-386.e9 (2018).

64. Patrat-Delon, S. *et al.* Correlation of parasite load determined by quantitative PCR to clinical outcome in a heart transplant patient with disseminated toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 2541–2545 (2010).

65. Sterkers, Y. *et al.* Novel interpretation of molecular diagnosis of congenital toxoplasmosis according to gestational age at the time of maternal infection. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 3944–3951 (2012).

APÊNDICE I

Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

IFF
INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE DA MULHER, DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE | FERNANDES FIGUEIRA

Protocolo estudo: PCR EM TEMPO REAL NO DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA

Identificação:_____
Prontuário:_____
Idade:_____(anos)
Município/Estado:_____
Escolaridade: ( ) Analfabetismo
( ) Ensino fundamental ( ) completo ( ) incompleto: _____
( ) Ensino médio ( ) completo ( ) incompleto:_____
( ) Ensino superior ( ) completo ( ) incompleto:_____

Serviço de origem: ( ) Público ( ) Privado ( ) Demanda espontânea
Contato telefônico: ( ) _____
( ) _____

Idade Gestacional 1° atendimento: _____(semanas)
Gesta ( ) Para ( ) Abortos ( )
DUM: _____/_____/_____ ( ) Desconhece
Data provável do parto: _____/_____/_____
Sintomas: ( ) Febre ( ) Linfonodomegalia ( ) Cefaléia ( ) Mialgia
( ) Astenia ( ) Dor de garganta ( )
Outros_____
( ) Sem sintomas

Sorologias Toxoplasmose prévia a gestação atual: ( ) Sim ( ) Não
Laboratório: _____
Técnica: ( ) ELFA ( ) Quimioluminescência ( ) Outras
IgM ( ) Reagente ( ) Não reagente ( ) Não realizada
Data:_____/_____/_____
IgG ( ) Reagente ( ) Não reagente ( ) Não realizada
Data:_____/_____/_____
Laboratório:_____
Avidez de IgG ( ) Fraca ( ) Moderada ( ) Forte ( ) Não realizada
Data: _____/_____/_____

Sorologias Toxoplasmose da origem atual: ( ) Sim ( ) Não
Laboratório: _____
Técnica: ( ) ELFA ( ) Quimioluminescência ( ) Outras
IgM ( ) Reagente ( ) Não reagente ( ) Não realizada
Data:_____/_____/_____
IgG ( ) Reagente ( ) Não reagente ( ) Não realizada
Data:_____/_____/_____
Laboratório:_____
Avidez de IgG ( ) Fraca ( ) Moderada ( ) Forte ( ) Não realizada
Data: _____/_____/_____

Ultrassonoografia obstétrica de fora: ( ) Sim ( ) Não
( ) Normal
( ) Alterada
Descrever alterações:
_____
_____
_____
_____

Ultrassonoografia morfológica de fora: ( ) Sim ( ) Não
( ) Normal
( ) Alterada
Descrever alterações:
_____
_____
_____
_____

Tratamento prescrito pelo serviço de origem: ( ) Sim ( ) Não
( ) Espiramicina: ( ) dose correta ( ) dose incorreta
( ) Sulfadiazina+Pirimetamina+Ác. Folínico: ( ) dose correta ( ) dose incoorreta
( ) Clindamicina+Pirimetamina+ác. Folínico: ( ) dose correta ( ) dose incorreta
( ) Outro esquema terapêutico

Sorologia Toxoplasmose IFF: ( ) Sim ( ) Não
Data: _____/_____/_____
Técnica: ( ) ELFA ( ) Quimioluminescência ( ) Outra
IgM ( ) Reagente ( ) Não reagente ( ) Não reallizado
IgG ( ) Reagente ( ) Não reagente ( ) Não realizado
Avidez de IgG ( ) Fraca ( ) Moderada ( ) Forte ( ) Não realizado

PCR no IFF sangue periférico da gestante: ( ) Sim ( ) Não
Data: _____/_____/_____ Idade Gestacional: _____(semanas)

( ) Positiva ( ) Negativa

Amniocentese - PCR no IFF líquido amniótico: ( ) Sim ( ) Não
Data: _____/_____/_____ Idade Gestacional: _____(semanas)
( ) Positiva ( ) Negativa

Ultrassonografia Mofológica IFF: ( ) Sim ( ) Não
Data:_____/_____/_____ Idade Gestacional:_____(semanas)
( ) Normal
( ) Alterada
Descrever alterações:
_____
_____
_____
_____

Tratamento prescrito IFF no primeiro atendimento: ( ) Sim ( ) Não
Data: _____/_____/_____
( ) Espiramicina
( ) Sulfadiazina+Pirimetamina+Ác. Folínico
( ) Clindamicina+Pirimetamina+ác. Folínico

Tratamento prescrito IFF pós-amniocentese (caso tenha sido realizada):
Data: _____/_____/_____
( ) Espiramicina
( ) Sulfadiazina+Pirimetamina+Ác. Folínico
( ) Clindamicina+Pirimetamina+ác. Folínico

Placenta: ( ) Sim ( ) Não
Data: _____/_____/_____
PCR ( ) Positiva ( ) Negativa

Histopatológico da placenta: ( ) Sim ( ) Não
Data: _____/_____/_____
( ) Normal
( ) Sugestivo de infecção por Toxoplasmose
( ) Outras alterações
Descrever alterações:
_____
_____
_____
_____

Recém-nascido:
Data de Nascimento: _____/_____/_____ IG: _____ (SEMANAS)

Peso: _____ (Kg) Apgar 1' _____ 5 _____ PC: _____ (cm)

Ultrassonografia transfontanela: ( ) Sim ( ) Não
( ) Normal
( ) Alterada
Descrever alterações:
_____
_____
_____
_____

Exame de fundo de olho: ( ) Sim ( ) Não
( ) Normal
( ) Alterado
Descrever alterações:
_____
_____
_____
_____

Sorologia Toxoplasmose (5º dia de vida): ( ) Sim ( ) Não
Data: _____/_____/_____
Técnica: ( ) ELFA ( ) Quimioluminescência ( ) Outra
IgM ( ) Reagente ( ) Não reagente
IgG ( ) Reagente ( ) Não reagente

PCR sangue periférico: ( ) Sim ( ) Não
Data: _____/_____/_____
( ) Positiva ( ) Negativa

APÊNDICE II

Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

IFF
INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE DA MULHER, DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE | FERNANDES FIGUEIRA

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

PROJETO DE PESQUISA – **DIAGNÓSTICO PRÉ-NATAL DA TOXOPLASMOSE ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES**

Pesquisadores responsáveis: Bianca Balzano De La Fuente Vilar
Letícia da Cunha Guida
Endereço: Av. Rui Barbosa, 716 – Flamengo - Rio de Janeiro - RJ - CEP: 22250-020
Telefones: (21) 2554-1700 / (21) 2554-1919 / (21) 99506-4984
Email: balzano.bianca@gmail.com
leticia@iff.fiocruz.br

Nome:_____ Prontuário: _____

Você está sendo convidada a participar do projeto de pesquisa intitulado **"DIAGNÓSTICO PRÉ-NATAL DA TOXOPLASMOSE ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES", pois você está grávida e tem o diagnóstico de toxoplasmose**. Seu consentimento deve ser obtido de forma livre por sua decisão e em nenhum momento o pesquisador deverá influenciar de qualquer maneira para consegui-lo.

Explicação do Estudo:

Você está sendo convidada a participar do presente estudo que irá avaliar uma técnica diagnóstica que permite identificar o DNA do agente causador da toxoplasmose. Os benefícios esperados com esse estudo serão melhorar o diagnóstico da toxoplasmose e com isso, talvez reduzir possíveis danos fetais pelo início mais cedo do tratamento.

Gostaríamos de solicitar sua autorização para utilizar na pesquisa os dados que estão no prontuário e os resultados de exames seu e do seu bebê, já realizados de rotina durante seu acompanhamento em nossa instituição.

Além disso, gostaríamos da sua autorização para colher uma amostra de sangue sua e do seu bebê, além das já coletados de rotina, para que possamos fazer o teste que irá identificar o DNA do agente causador da toxoplasmose. Esses exames serão feitos junto com os exames de rotina para evitar uma nova coleta.

Também estamos solicitando sua autorização para utilizar o resultado do exame microscópico da sua placenta, chamado "exame histopatológico", que também é realizado de rotina em todas as placentas na Maternidade do IFF/Fiocruz, e pedir sua autorização para que possamos analisar um fragmento da sua placenta por meio da técnica que identifica o DNA do agente causador da toxoplasmose.

_____ Rubrica participante

_____ Rubrica pesquisador

Os possíveis riscos pertinentes à coleta de sangue como ocorrência de hematomas e inchaços locais podem ser evitados. Os cuidados para impedir que eventuais problemas ocorram durante essas coletas serão tomados, pois será realizada por profissional treinado e utilizando procedimentos padrões de coleta.
A qualquer momento do estudo, você poderá tirar o seu consentimento, sem prejuízo para você ou seu bebê. As informações são confidenciais e não serão identificadas. Em qualquer etapa do estudo você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento das dúvidas.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, pois todas suas etapas serão realizadas apenas nos dias que você deverá comparecer para suas consultas regulares do pré-natal. Também não há compensação financeira relacionada a sua participação.

Você receberá uma via idêntica deste documento assinada pelo pesquisador do estudo. É garantido o direito a indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa. Os possíveis riscos decorrentes da pesquisa como quebra de sigilo e confidencialidade poderão ser evitados utilizando códigos que não permitirão a identificação do paciente.

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira (IFF/Fiocruz) encontra-se à disposição para eventuais esclarecimentos éticos e outras providências que se façam necessárias (E-mail: cepiff@iff.fiocruz.br; Telefone: 2554-1730; Fax: 2552-8491).

Eu,_____, acredito ter sido suficiente esclarecida a respeito das informações e concordo voluntariamente em participar desse estudo.

Declaro que li e entendi todo o conteúdo deste documento.

Assinatura do paciente:_____
Data: _____/_____/_____
Telefone: _____

Nome da testemunha _____
Documento: _____
Endereço/Telefone:_____
_____
Assintura:
_____
Data: _____/_____/_____

Investigador que obteve o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Nome: _____
Assinatura: _____

_____ _____
Rubrica participante Rubrica pesquisador

APÊNDICE III

Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

IFF
INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE DA MULHER, DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE | FERNANDES FIGUEIRA

Termo de Assentimento informado – crianças/ adolescentes entre 12 e 18 anos

PROJETO DE PESQUISA – **DIAGNÓSTICO PRÉ-NATAL DA TOXOPLASMOSE ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES**
Instituição: Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira
Pesquisadores responsáveis: Bianca Balzano De La Fuente Vilar
Letícia da Cunha Guida

Assentimento informado para _____

Você que tem toxoplasmose, está sendo convidada a participar de uma pesquisa que irá avaliar uma técnica diagnóstica que permite identificar o DNA do agente causador da toxoplasmose.

Estamos convidando você e todas as crianças e adolescentes entre 12 e 18 anos grávidas que tem toxoplasmose para participar desta pesquisa. Discutimos esta pesquisa com seus pais ou responsáveis e eles sabem que também estamos conversando com você para ver se você concorda em participar da pesquisa. Seus pais ou responsáveis também irão assinar um documento como este.

Você pode discutir qualquer coisa deste documento com seus pais, amigos ou qualquer um com quem você se sentir à vontade de conversar. Pode haver algumas palavras que não entenda ou coisas que você queira que eu explique mais detalhadamente porque você ficou interessado ou preocupado. Por favor, peça a qualquer momento e eu explicarei.

Durante a pesquisa, deverá fazer consultas médicas, exames de sangue, exames de ultrassonografia e exame de amniocentese, como já é feito de rotina no pré-natal de gestantes com toxoplasmose. Além disso, gostaríamos de solicitar seu assentimento para realizar esse exame que identifica o DNA do agente causador da toxoplasmose na sua placenta e no sangue do seu bebê.

Não falaremos para outras pessoas que você está nesta pesquisa e também não daremos nenhuma informação sobre você para qualquer um que não trabalhe na pesquisa. Os resultados dos seus exames estarão no seu prontuário.

_____ Rubrica participante

_____ Rubrica pesquisador

Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

IFF
INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE DA MULHER, DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE | FERNANDES FIGUEIRA

As informações sobre você serão coletadas na pesquisa e ninguém, exceto os investigadores poderão ter acesso a elas. Qualquer informação sobre você terá um número ao invés de seu nome. Só os investigadores saberão qual é o seu número e manteremos em sigilo.

Quando terminarmos a pesquisa, nós sentaremos com você e seus pais e falaremos sobre o que aprendemos com a pesquisa e como ela pode ajudar você. Eu também lhe darei um papel com os resultados por escrito. Depois, iremos falar com mais cientistas e outros profissionais, sobre a pesquisa. Faremos isto escrevendo e compartilhando relatórios e indo para as reuniões com pessoas que estão interessadas no trabalho que fazemos.

Este documento será emitido em duas vias, uma para o pesquisador e outra para você.

Eu entendi que a pesquisa é sobre diagnóstico molecular da toxoplasmose na gestação, e concordo em participar.

Eu entendi que farei (procedimentos/exames/consulta médica).

Assinatura da criança/adolescente:_____

Assinatura dos pais/responsáveis:_____

Ass. Pesquisador:_____

Dia/mês/ano:_____

_____ Rubrica participante

_____ Rubrica pesquisador

ANEXO I

INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA - IFF/ FIOCRUZ - RJ/ MS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Diagnóstico Pré-natal da Toxoplasmose através de Técnicas Moleculares
Pesquisador: Leticia da Cunha Guida
Área Temática:
Versão: 8
CAAE: 14832713.7.0000.5269
Instituição Proponente: Instituto Fernandes Figueira - IFF/ FIOCRUZ - RJ/ MS
Patrocinador Principal: Instituto Fernandes Figueira - IFF/ FIOCRUZ - RJ/ MS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.587.173

Apresentação do Projeto:
Emenda.

Objetivo da Pesquisa:
Objetivo da emenda:
As informações referentes a emenda, foram obtidas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1350275_E3.pdf de 16/09/2019.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:
Não foi informado alterações nos riscos e benefícios nas Informações Básicas do Projeto da emenda.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:
Na presente submissão a pesquisadora vem responder as pendências do parecer 3.476.299 de 30/07/2019.
A pesquisadora não informou na emenda os riscos relativos à coleta dos novos espécimes, porém informou no novo TCLE anexado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:
Respostas às pendências:
novos espécimes que serão analisados - ok

Endereço: RUI BARBOSA, 716
Bairro: FLAMENGO **CEP:** 22.250-020
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2554-1730 **Fax:** (21)2552-8491 **E-mail:** cepiff@iff.fiocruz.br

INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA - IFF/ FIOCRUZ - RJ/ MS

que participantes terão os novos espécimes testados - ok

esclarecimentos no TCLE sobre os procedimentos assistenciais e da pesquisa - ok

garantia de ressarcimento no TCLE - ok

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as pendências do parecer 3.3476.299 foram atendidas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1350275_E3.pdf	16/09/2019 16:25:52		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	16/09/2019 16:18:32	Leticia da Cunha Guida	Aceito
Outros	respostaaoparecerdoCEP.doc	17/07/2019 15:36:43	Leticia da Cunha Guida	Aceito
Outros	Formulario_dados_prontuario.docx	08/12/2017 15:13:30	Leticia da Cunha Guida	Aceito
Outros	formulario_socio_demografico.docx	08/12/2017 15:11:13	Leticia da Cunha Guida	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto final 050813-2.doc	08/08/2013 14:23:04		Aceito
Outros	parecertoxovicepesquisa.pdf	29/04/2013 15:16:46		Aceito
Folha de Rosto	cep.pdf	18/04/2013 01:07:32		Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

Endereço: RUI BARBOSA, 716
Bairro: FLAMENGO **CEP:** 22.250-020
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2554-1730 **Fax:** (21)2552-8491 **E-mail:** cepiff@iff.fiocruz.br

INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA - IFF/ FIOCRUZ - RJ/ MS

Continuação do Parecer: 3.587.173

RIO DE JANEIRO, 19 de Setembro de 2019

Assinado por:
Ana Maria Aranha Magalhães Costa
(Coordenador(a))

Endereço: RUI BARBOSA, 716
Bairro: FLAMENGO **CEP:** 22.250-020
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2554-1730 **Fax:** (21)2552-8491 **E-mail:** cepiff@iff.fiocruz.br