

Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS  
MESTRADO PROFISSIONAL EM PESQUISA CLÍNICA

CHRISTIANNE TERRA DE OLIVEIRA AZEVEDO

**DESEMPENHO DA REAÇÃO EM CADEIA DA  
POLIMERASE NO LÍQUIDO AMNIÓTICO PARA  
DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA.  
REVISÃO SISTEMÁTICA E METANÁLISE.**

Rio de Janeiro

2013

DESEMPENHO DA REAÇÃO EM CADEIA DA  
POLIMERASE NO LÍQUIDO AMNIÓTICO PARA  
DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA.  
REVISÃO SISTEMÁTICA E METANÁLISE

CHRISTIANNE TERRA DE OLIVEIRA AZEVEDO

Dissertação apresentada ao Mestrado Profissional em Pesquisa Clínica do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de mestre em pesquisa clínica.

Orientadores: Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Elizabeth Lopes Moreira.

Prof. Dr. Pedro Emmanuel Alvarenga Americano do Brasil.

Rio de Janeiro

2013

## AGRADECIMENTOS

A Deus , por me conceder sabedoria nas escolhas dos melhores caminhos, coragem para acreditar, força para não desistir e proteção para me amparar.

A Oscar meu amor de todas as vidas, pelo apoio incondicional, pela ajuda, paciência e por ter sempre uma palavra consoladora nos momentos difíceis.

A Pedro e Juliana, os maiores presentes da minha vida. Vocês foram incríveis compreendendo e me apoiando nessa jornada.

A Pedro Emmanuel, meu orientador, um agradecimento mais que especial. Obrigado pelos ensinamentos tão preciosos, eles foram transformadores.

A Bebeth, minha orientadora, obrigado pela oportunidade e pelo exemplo de profissional que sempre foi para mim.

A Letícia Guida, por ter aceitado o desafio e compartilhar comigo seus conhecimentos. Obrigado por tudo.

Às minhas queridas amigas Bárbara, Vanilla, Carina, Renata e Dani, vocês tornaram tudo mais leve.

Aos meus irmãos e compadres Eliane e Elgson, prometo que vamos compensar o tempo ausente.

Ao meu colega e amigo Beto Bhering, pelas dicas, opinião sincera e compreensão com minha ausência no trabalho.

Aos meus colegas do mestrado, a convivência com vocês me proporcionou momentos maravilhosos.

À coordenação e professores do mestrado profissional em pesquisa clínica pela dedicação e empenho pelo sucesso dessa pós-graduação.

A minha amiga e colega Paola e seu marido Sérgio, vocês foram anjos em um momento de desespero. Obrigado.

A todos os meus colegas do departamento de neonatologia do Instituto Fernandes Figueira, pelo apoio e aprendizado.

Às funcionárias da administração da Probaby- UTI neonatal e Pediátrica, principalmente Gil e Isabella pelo socorro nos difíceis caminhos da informática.

A todos que me ajudaram a chegar até aqui, meu muito obrigado.



AZEVEDO, C. T. O. **Desempenho da Reação em Cadeia da Polimerase no Líquido Amniótico para Diagnóstico da Toxoplasmose Congênita. Revisão Sistemática e Metanálise.** [Dissertação de Mestrado Profissional em Pesquisa Clínica]. Rio de Janeiro. Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

## RESUMO

A toxoplasmose é uma zoonose endêmica em todo o mundo causada pelo *Toxoplasma gondii*. Embora a maioria das infecções sejam subclínicas e assintomáticas, tem uma grande importância em hospedeiros imunocomprometidos e em recém-nascidos com infecção congênita. A infecção causada pelo *Toxoplasma gondii* durante a gestação pode causar graves lesões ao feto. A realização de exames laboratoriais para investigação diagnóstica da toxoplasmose congênita durante o prenatal é imprescindível para o tratamento correto da gestante e melhor prognóstico das crianças infectadas. O grande avanço no diagnóstico prenatal da infecção fetal pelo *Toxoplasma gondii* foi o uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) no líquido amniótico. O objetivo da investigação é avaliar o desempenho diagnóstico da PCR para identificação da toxoplasmose fetal em gestantes com diagnóstico sorológico de toxoplasmose recente, através de uma revisão sistemática da literatura. Nessa revisão a sensibilidade global do teste da PCR foi de 77% e a especificidade de 98,3%, alcançando sensibilidade de 87% e especificidade de 99% quando realizado até cinco semanas após o diagnóstico materno. No entanto o desempenho do teste pode variar de acordo com o trimestre da gravidez. Pode ser recomendado para uso nas primeiras cinco semanas após o diagnóstico materno quando há suspeita de toxoplasmose fetal.

**Palavras chave:** toxoplasmose congênita, diagnóstico prenatal, reação em cadeia da polimerase, revisão sistemática.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>7</b>
1.1	BREVE HISTÓRICO	7
1.2	BIOLOGIA E TRANSMISSÃO	8
1.3	TOXOPLASMOSE CONGÊNITA	9
1.3.1	TRATAMENTO	11
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVO</b>	<b>14</b>
<b>4</b>	<b>ARTIGO – DESEMPENHO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE NO LÍQUIDO AMNIÓTICO PARA DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA. REVISÃO SISTEMÁTICA E METANÁLISE</b>	<b>15</b>
<b>5</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA DISSERTAÇÃO</b>	<b>55</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>58</b>
	FORMULÁRIO PARA EXTRAÇÃO DE DADOS – REVISÃO SISTEMÁTICA DO DESEMPENHO DA PCR NO LÍQUIDO AMNIÓTICO PARA DIAGNÓSTICO DE TOXOPLASMOSE CONGÊNITA	59

# 1. INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma zoonose endêmica em todo o mundo causada pelo *Toxoplasma gondii*, um protozoário intracelular obrigatório, da ordem Coccidia, filo Apicomplexa. (1) Tem como hospedeiro definitivo o gato, mas é capaz de infectar um grande número de hospedeiros intermediários como, por exemplo, mamíferos (inclusive aquáticos como os golfinhos), aves e o homem. (2) É uma das mais prevalentes doenças parasitárias em humanos. Embora a maioria das infecções sejam subclínicas e assintomáticas, tem uma grande importância em hospedeiros imunocomprometidos e em recém-nascidos com infecção congênita.(3)

## 1.1 BREVE HISTÓRICO

Os primeiros relatos da identificação do *Toxoplasma gondii* são de 1908, quando Nicolle and Manceaux observaram o parasita em tecidos de roedores africanos que estavam sendo usados em pesquisas da leishmaniose.(4) Ao mesmo tempo, no Brasil, Splendore descobriu o mesmo parasita em tecidos de um coelho que havia morrido com paralisia.(5) O primeiro caso de toxoplasmose humana foi descrito 15 anos após sua descoberta, quando Janku, um oftalmologista em Praga, encontrou cistos do parasita na retina de uma criança de 11 meses com hidrocefalia congênita e microftalmia.(6)

No entanto, somente em 1937 o reconhecimento da toxoplasmose como uma doença em seres humanos teve um impacto real na medicina, quando Wolf e Cowen identificaram infecção por *Toxoplasma* em uma criança de três dias de vida com encefalomielite,(7)(8) sendo que cinco anos mais tarde comprovou-se sua transmissão vertical em humanos. (9)

## 1.2 BIOLOGIA E TRANSMISSÃO

Aproximadamente 60 anos após sua descoberta, o *Toxoplasma gondii* teve seu ciclo de vida completo elucidado. Foi possível assim explicar sua ampla difusão em animais de sangue quente, incluindo humanos.(8) O *Toxoplasma* pode ser encontrado em três estágios distintos: taquizoítos, bradizoítos (em cistos teciduais) e esporozoítos (em oocistos). (10)(11)(4)(12)

A forma mais comum de adquirir a infecção é pela ingestão de cistos teciduais contidos nos tecidos de hospedeiros intermediários cronicamente infectados, ou pela ingestão de oocistos esporulados em alimentos ou água contaminados com fezes do gato.(8) Esses oocistos são o produto de um ciclo sexuado que ocorre no intestino do hospedeiro definitivo, que são infectados após consumo de hospedeiro intermediário com *Toxoplasma*. São eliminados pelas fezes do gato, e é no meio ambiente que vão esporular (aumento de volume do parasita e formação de esporozoítos em seu interior), o que pode demorar entre 1 a 5 dias, dependendo das condições ambientais. Após a esporulação, tornam-se infecciosos.(4)(12) Após a ingestão do oocisto e cistos teciduais pelo hospedeiro intermediário, ele se rompe no intestino, liberando os esporozoítos e os bradizoítos que invadem os enterócitos diferenciando-se em taquizoítos, que se dividem rapidamente dentro da célula hospedeira levando à sua ruptura, em seguida esses taquizoítos invadem células contíguas ou são fagocitados.(10)(13)(14) Os taquizoítos são responsáveis pela parasitemia e infecção sistêmica. Com a resposta imune do hospedeiro, os taquizoítos diferenciam-se em formas bradizoítas e formação de cistos, caracterizando a fase crônica ou latente da infecção. Cistos teciduais podem persistir indefinidamente durante a vida do hospedeiro, se um indivíduo se torna imunocomprometido estes cistos vão servir como um reservatório a partir do qual infecções locais ou disseminadas podem ocorrer. Os cistos teciduais têm predileção por tecido nervoso e muscular, assim como o olho em seres humanos.(14)

### 1.3 TOXOPLASMOSE CONGÊNITA

A toxoplasmose congênita ocorre quando a gestante suscetível adquire a infecção primária durante a gestação, o *Toxoplasma gondii* pode ser transmitido para o feto e causar lesões inflamatórias que podem resultar em perda visual, auditiva, retardo mental e psicomotor, convulsões, alterações hematológicas, hepatoesplenomegalia ou morte, sendo que a maioria não apresenta sinais ou sintomas.(15)(16) A reativação da infecção latente pelo *T. gondii* durante a gravidez também pode resultar em transmissão do parasita para o feto em mulheres imunologicamente comprometidas. (17) A infecção congênita pode se apresentar como doença neonatal, doença nos primeiros meses de vida, sequelas ou recaída de uma infecção não diagnosticada durante a infância, ou infecção subclínica. As manifestações clínicas dependem de quando a infecção foi adquirida intra-útero.(17)

A incidência da infecção congênita quando a gestante adquire a toxoplasmose durante o primeiro trimestre é bem pequena (4,5%) e aumenta nos últimos dois trimestres (17,3% no segundo e 74% no terceiro trimestre). A gravidade da forma congênita é inversamente proporcional a idade gestacional em que a infecção aguda materna ocorre, estando a infecção no início da gestação associada a aborto ou sequelas graves. A infecção tardia, embora mais frequente, leva a sequelas menos graves, os recém nascidos podem parecer saudáveis ao nascimento, porém as sequelas podem aparecer meses ou anos mais tarde. (18)(19)

Em humanos, a prevalência de testes sorológicos positivos para toxoplasmose aumenta com a idade, indicando exposição passada. A prevalência varia em todo o mundo entre os diferentes países e entre regiões de um mesmo país. Em um estudo feito em população de gestantes, a prevalência de teste positivo para toxoplasmose variou de 22 a 87%.(20) Hábitos culturais, principalmente alimentares, são provavelmente a maior causa de diferentes frequências de infecção pelo *Toxoplasma gondii* de um país para outro e entre regiões de um mesmo país.(17) Nível sócio-econômico, hábitos de higiene e condições ambientais também são fatores envolvidos.(21)(22)

Estudos de triagem neonatal nos Estados Unidos mostram uma incidência de toxoplasmose congênita de 1 para cada 10.000 nascimentos. (17) No Brasil, estudos de

triagem neonatal estimam 3,3 a 19,6 recém nascidos infectados para cada 10.000 nascidos vivos.(23)(24)

Considerando-se que tanto as gestantes quanto os recém nascidos são usualmente assintomáticos, a realização de exames laboratoriais torna-se imprescindível para investigação diagnóstica. Os testes sorológicos, IgM e IgG específicos, são de escolha para o diagnóstico da infecção materna porém de interpretação difícil, sendo frequente a realização de múltiplos testes (17) O teste de avididade de IgG permite uma estimativa do tempo que a infecção aguda ocorreu, mas baixa avididade ou resultados duvidosos podem permanecer por muitos meses ou anos após a infecção primária, não devendo portanto ser usado isoladamente para determinar se a infecção foi recentemente adquirida.(25)(26)

O diagnóstico fetal pode ser feito usando testes indiretos: detecção de IgM e IgA específicas em amostras de sangue fetal, ou testes diretos : amplificação da sequência de ácido nucleico pela reação em cadeia da polimerase (PCR) no líquido amniótico, ou isolamento do parasita no líquido amniótico ou sangue fetal. (27) O diagnóstico de toxoplasmose congênita é, por vezes, impreciso. A cinética de aparecimento e transmissão transplacentária de anticorpos tornam a interpretação da sorologia do feto e do recém nascido complicada, além da baixa sensibilidade da detecção de IgM e IgA em sangue fetal ( entre 21% e 47% para IgM, e 38% para IgA).(28)(29) A inoculação de líquido amniótico em camundongos apesar de melhor sensibilidade e elevada especificidade (chegando a 100%), requer de três a seis semanas e manutenção de animais em biotérios (30)(31).

O grande avanço no diagnóstico pré-natal da infecção fetal pelo *T. gondii* foi o uso da PCR no líquido amniótico sem ter que recorrer à amostra de sangue de cordão umbilical. (17) Considerada uma técnica de biologia molecular revolucionária, a reação em cadeia da polimerase (PCR) foi desenvolvida por Kary Banks Mullis na década de 80, e lhe propiciou o prêmio Nobel de Química em 1994.(32)(33) A PCR permite amplificar um gene de cópia única em milhões de cópias, a partir de uma pequena quantidade do DNA original (DNA molde). A técnica de PCR promove, por meio de etapas de variação de temperatura, a duplicação de cadeias de DNA *in vitro* utilizando-se basicamente de uma reação enzimática catalisada pela polimerase (enzima termoestável). Ocorre em três etapas: desnaturação, anelamento ou hibridização, e polimerização (extensão). Assim, é possível a obtenção de muitas cópias de uma sequência específica de ácido nucleico, a partir de uma fita molde. (17)(19)(34)

O primeiro protocolo de PCR qualitativo para *Toxoplasma* foi publicado em 1989 por Burg et al.(35) Ele descreveu a amplificação de uma sequência pertencente ao gene alvo B1, repetido 35 vezes no genoma do parasita. Desde então, muitas equipes têm desenvolvido protocolos de PCR para detecção de diferentes sequências alvo do DNA do parasita. No entanto, a difusão de protocolos de PCR qualitativo levou a uma considerável heterogeneidade dos protocolos. O advento na década de 2000 da PCR quantitativa em tempo real promove, entre outras coisas, a padronização de técnicas. Além disso, permite a quantificação da carga do parasita numa amostra.(1)(36) A PCR quantitativa associa a metodologia de PCR a um sistema de detecção e quantificação de fluorescência produzida durante os ciclos de amplificação. A metodologia permite a amplificação, detecção e quantificação de DNA em uma única etapa, diminuindo o tempo do resultado de 24 a 48 horas para menos de 4 horas, minimizando o risco decorrente de possíveis contaminações.(37)

### 1.3.1 TRATAMENTO

Não há consenso sobre os benefícios do tratamento intraútero e o melhor tipo de tratamento da toxoplasmose adquirida durante a gestação, diversos protocolos de tratamento são propostos.(38)(39) A conduta atualmente adotada pelo departamento de obstetrícia do Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira (IFF) para toxoplasmose durante a gestação, com base na literatura(39)(40) é a seguinte: paciente com suspeita de toxoplasmose aguda na gestação, iniciar Espiramicina 3g/dia, repetir sorologias IgM e IgG para confirmação diagnóstica e teste de avidéz. Caso o diagnóstico seja confirmado, é mantido o tratamento com Espiramicina e a paciente é encaminhada para a medicina fetal, onde será realizada ultrassonografia para pesquisa de sinais de infecção congênita. Na presença de alterações sugestivas de infecção fetal, em pacientes acima de 18 semanas de gestação, inicia-se o tratamento com Sulfadiazina 3g/dia, Pirimetamina 25 mg/dia e Ácido Fólico 10 mg/dia. Na ausência de alterações na ultrassonografia, é indicado amniocentese, para PCR no líquido amniótico, nas pacientes com soroconversão na gravidez, com teste de avidéz fraco ou com teste de avidéz forte acima de 20 semanas de gestação.

Estudos sugerem um efeito protetor do tratamento precoce na redução do risco de transmissão materno-fetal (39), e a redução da frequência e gravidade das sequelas entre os fetos infectados durante a gestação. (29) Diante desse cenário, métodos diagnósticos rápidos,

sensíveis e seguros são necessários para que o tratamento mais adequado seja prontamente instituído.



## **2. JUSTIFICATIVA**

O Instituto Nacional da Saúde da Mulher da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira possui excelência no cuidado de gestantes de alto risco, e possui uma estrutura de assistência capaz de prestar cuidados para casos de toxoplasmose aguda durante a gestação. Considerando-se a importância do diagnóstico oportuno e tratamento correto da gestante a fim de minimizar o acometimento fetal. Seria relevante organizar o conhecimento atual em relação ao diagnóstico molecular da toxoplasmose fetal e assim fundamentar um estudo com PCR em tempo real a ser desenvolvido.

### **3. OBJETIVO**

O objetivo desta investigação é revisar sistematicamente o desempenho diagnóstico da reação em cadeia da polimerase para a identificação de toxoplasmose fetal em gestantes com diagnóstico sorológico de toxoplasmose recente, quando comparado com o seguimento sorológico do feto durante o primeiro ano de vida.

#### **4. ARTIGO**

**DESEMPENHO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE  
NO LÍQUIDO AMNIÓTICO PARA DIAGNÓSTICO DA  
TOXOPLASMOSE CONGÊNITA. REVISÃO SISTEMÁTICA E  
METANÁLISE**

**AUTORES: Christianne Terra de Oliveira Azevedo**

**Pedro Emmanuel A. A. do Brasil**

**Maria Elizabeth Lopes Moreira**

**Letícia Cunha Guida**

AZEVEDO, C. T. O. **Desempenho da Reação em Cadeia da Polimerase no Líquido Amniótico para Diagnóstico da Toxoplasmose Congênita. Revisão Sistemática e Metanálise.** [Dissertação de Mestrado Profissional em Pesquisa Clínica]. Rio de Janeiro. Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

## RESUMO

**Introdução:** a infecção congênita causada pelo *Toxoplasma gondii* pode causar graves lesões que podem ser diagnosticadas intra-útero ou ao nascimento, embora a maioria das crianças seja assintomática ao nascimento. O diagnóstico prenatal da toxoplasmose congênita melhora consideravelmente o prognóstico e o desfecho das crianças infectadas. Por essa razão um ensaio para o diagnóstico rápido, sensível e seguro da toxoplasmose fetal é desejável. **Objetivo:** revisar sistematicamente o desempenho da reação em cadeia da polimerase (PCR) no líquido amniótico de gestantes com diagnóstico sorológico recente de toxoplasmose para o diagnóstico da toxoplasmose fetal. **Método:** foi realizada uma revisão sistemática da literatura, por meio de busca em bases de dados eletrônicas; a revisão da literatura incluiu estudos preliminares de acurácia diagnóstica da PCR em líquido amniótico de gestantes que soroconverteram durante a gestação. O teste da PCR foi comparado a um padrão-ouro para o diagnóstico. **Resultados:** um total de 833 resumos foram obtidos nas bases de dados eletrônicos e avaliados, e 17 estudos, que compreenderam 3.069 pacientes, preencheram os critérios de inclusão estabelecidos e foram incluídos na revisão. Os seguintes resultados foram obtidos: ensaios de PCR para toxoplasmose fetal geralmente são mal estudados; os relatórios do teste carecem de informações críticas; os protocolos variaram entre os estudos; a heterogeneidade entre os estudos se concentrou na sensibilidade do teste; houve evidência de que a sensibilidade do teste aumenta de acordo com o tempo representado pelos diferentes trimestres; e que houve mais heterogeneidade entre os estudos onde ocorreu maior tempo entre o diagnóstico materno e o teste fetal. A sensibilidade do método, se aplicado até cinco semanas após o diagnóstico materno, foi de 87% e especificidade de 99%. **Conclusão:** A sensibilidade global do teste da PCR nessa revisão foi de 77% e especificidade de 98,3%, embora essas medidas tenham sido altamente heterogêneas. Apesar das limitações deste ensaio, a evidência disponível sugere que o teste possui uma sensibilidade de 87% e especificidade de 99%, quando realizado até cinco semanas após o diagnóstico materno. No entanto, o desempenho no teste pode variar de acordo com o trimestre da gravidez. Portanto, o teste pode ser recomendado para o uso nas primeiras cinco semanas após o diagnóstico materno quando há suspeita de toxoplasmose fetal

**Palavras chave:** toxoplasmose congênita, diagnóstico pré-natal, reação em cadeia da polimerase, revisão sistemática.

AZEVEDO, C. T. O. **Performance of the polymerase chain reaction in amniotic fluid for congenital toxoplasmosis diagnosis. Systematic review and metanalysis.** [Dissertation of Professional Master's Degree in Clinical Research]. Clinical Research Institute Evandro Chagas.

### ABSTRACT

**Introduction:** Congenital infection caused by *Toxoplasma gondii* can cause serious damage that can be diagnosed *in utero* or at birth, although most infants are asymptomatic at birth. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis considerably improves the prognosis and outcome for infected infants. For this reason, an assay for the quick, sensitive, and safe diagnosis of fetal toxoplasmosis is desirable. **Goal:** To systematically review the performance of polymerase chain reaction (PCR) analysis of the amniotic fluid of pregnant women with recent serological toxoplasmosis diagnoses for the diagnosis of fetal toxoplasmosis. **Method:** A systematic literature review was conducted via a search of electronic databases; the literature included primary studies of the diagnostic accuracy of PCR analysis of amniotic fluid from pregnant women who seroconverted during pregnancy. The PCR test was compared to a gold standard for diagnosis. **Results:** A total of 833 summaries were obtained from the electronic database and reviewed, and 17 studies, comprising 3,069 patients, met the established inclusion criteria and were included in the review. The following results were obtained: PCR assays for fetal toxoplasmosis are generally poorly studied; reports of the tests' use lack critical information; the protocols varied among studies; the heterogeneity among studies was concentrated in the tests' sensitivity; there was evidence that the sensitivity of the tests increases with time, as represented by the trimester; and there was more heterogeneity among studies in which there was more time between maternal diagnosis and fetal testing. The sensitivity of the method, if performed up to five weeks after maternal diagnosis, was between 87% and 99%. **Conclusion:** The global sensitivity of the PCR test in this review was between 77% and 98.3%, although these measurements were highly heterogeneous. Despite this assay's limitations, the available evidence suggests it has between 87% and 99% specificity when performed up to five weeks after maternal diagnosis. However, the test performance may vary according to the pregnancy's trimester. Therefore, the test can be recommended for use in the first five weeks after maternal diagnosis when there is suspicion of fetal toxoplasmosis.

**Keywords:** congenital toxoplasmosis, prenatal diagnosis, polymerase chain reaction, systematic review.

## 4.1 INTRODUÇÃO

Toxoplasmose é uma doença endêmica em todo o mundo, causada pelo *Toxoplasma gondii*, um protozoário parasita intracelular obrigatório. No Brasil sua prevalência varia de 10 a 80% dependendo da área estudada, varia de acordo com hábitos culturais e de higiene. A infecção pode ser adquirida por meio da ingestão de alimentos contaminados com cistos ou oocistos, transfusão sanguínea, transplante de órgãos e transmissão congênita (1). A infecção por *Toxoplasma gondii* é geralmente leve ou subclínica em humanos saudáveis. No entanto, quando adquirida durante a gravidez, expõe o feto ao risco de infecção congênita com graves lesões diagnosticadas intra-útero ou ao nascimento (2).

O risco de transmissão aumenta durante a gestação, mas a gravidade da doença no feto diminui. Sinais clássicos como hidrocefalia, coriorretinite e calcificações intracranianas (tríade de Sabin) podem não estar presentes ao nascimento, podendo surgir sequelas da doença não diagnosticada, na adolescência ou na idade adulta. Pacientes não diagnosticados e não tratados desenvolverão lesões irreversíveis particularmente nos olhos e cérebro. (3) O risco de infecção fetal varia de acordo com a idade gestacional no momento da infecção materna. Quando ela ocorre entre 11-14 semanas de gestação, a incidência de infecção fetal é de 7,2%, chegando a 67% quando a infecção aguda materna ocorre entre 31 e 34 semanas de gestação, com uma taxa de infecção global de 7,4% .(4) Embora as vantagens do tratamento da gestante para prevenir a infecção congênita não sejam claras, ele pode reduzir o risco de lesões clínicas graves e danos neurológico e ocular.(2)

O diagnóstico pré-natal da toxoplasmose congênita melhorou consideravelmente o prognóstico e o desfecho das crianças infectadas. (5) A triagem sorológica materna para detecção da toxoplasmose durante o pré-natal é uma ferramenta importante que permite a adoção de medidas profiláticas e terapêuticas precocemente, reduzindo a taxa de transmissão vertical e danos ao desenvolvimento do feto.(6) Os programas de controle de toxoplasmose congênita variam em todo o mundo, não havendo consenso quanto ao benefício do rastreamento universal para toxoplasmose na gravidez.

Em alguns países europeus como na França, por exemplo, a triagem sorológica mensal de gestantes suscetíveis é feita desde 1992. Se o exame sorológico indicar infecção aguda,

inicia-se o tratamento materno com espiramicina, na tentativa de prevenir a transmissão para o feto, se a infecção fetal for confirmada pela PCR no líquido amniótico, ou na ausência da PCR houver suspeita de infecção fetal há a substituição da espiramicina pelo esquema de pirimetamina, sulfadiazina e ácido folínico. (7)

Estudo francês recente (8) que avalia o impacto da triagem sorológica mensal na diminuição da taxa de transmissão e melhora do resultado clínico aos três anos de idade, indica que as sequelas da toxoplasmose em filhos de mulheres cuja infecção é identificada e tratada oportunamente durante a gravidez são raramente graves, ressaltando os benefícios do rastreio pré-natal.

No Brasil, a triagem pré-natal é sugerida como política pública não obrigatória, com protocolos próprios que variam entre as diferentes regiões, sem uniformidade nas ações (6) A investigação fetal está indicada quando a soroconversão materna durante a gestação é confirmada, pode ser feito usando testes indiretos: detecção de IgM e IgA específicas em amostras de sangue fetal, ou testes diretos: amplificação da sequência de ácido nucleico pela reação em cadeia da polimerase (PCR) no líquido amniótico, ou isolamento do parasita no líquido amniótico ou sangue fetal. (9) A interpretação da investigação diagnóstica da toxoplasmose congênita com testes sorológicos não uma tarefa trivial dado a cinética de aparecimento e transmissão transplacentária de anticorpos ser muito variável. A baixa sensibilidade da detecção de IgM e IgA em sangue fetal ( entre 21% e 47% para IgM, e 38% para IgA) (10)(11) também não facilita essa tarefa. A inoculação de líquido amniótico em camundongos apesar de melhor sensibilidade e elevada especificidade, é operacionalmente difícil e requer de três a seis semanas para obtenção de resultados.(12)

O grande avanço no diagnóstico pré-natal da infecção fetal pelo *T. gondii* foi o uso da PCR no líquido amniótico.(13) De fato, a detecção do DNA do parasita não depende do estado imunológico do paciente, pode ser aplicado em uma grande variedade de amostras e permite um resultado diagnóstico relativamente rápido. O primeiro protocolo de PCR qualitativo para *Toxoplasma* foi publicado em 1989 por Burg et al.(14) Ele descreveu a amplificação de uma sequência pertencente ao gene B1, repetido 35 vezes no genoma do parasita. Desde então, muitas equipes têm desenvolvido protocolos de PCR para detecção de diferentes sequências alvo do DNA do parasita. No entanto, a proliferação de protocolos de PCR qualitativo levou a uma considerável heterogeneidade de execução dos testes. O advento na década de 2000 da PCR quantitativa promove, entre outras coisas, uma menor diversidade de protocolos. Além disso, permite a quantificação da carga do parasita numa amostra.(3)(15)

Diante desse cenário, da grande variabilidade técnica na execução da PCR, o objetivo dessa investigação é revisar sistematicamente a literatura sobre o desempenho da PCR no líquido amniótico para o diagnóstico da toxoplasmose congênita, explorar a heterogeneidade nessa literatura e sumarizar o desempenho diagnóstico da PCR.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODO

### 4.2.1 Critérios para Inclusão dos Estudos

Os estudos originais do desempenho diagnóstico da PCR para diagnóstico de toxoplasmose fetal foram identificados utilizando-se os seguintes critérios de inclusão: (a) estudos originais que incluíram gestantes com evidência de infecção aguda pelo *T. gondii* durante a gestação, (b) estudos que avaliaram o desempenho da PCR no líquido amniótico, (c) estudos que comparavam o resultado da PCR com um “padrão-ouro” qualquer, ou teste aceito como melhor evidência, (d) que apresentavam medidas de resultado como: sensibilidade e especificidade, ou que houvesse dados para calculá-las. Resumos em qualquer idioma foram aceitos para a classificação inicial. Para textos completos a inclusão foi restrita aos seguintes idiomas: Português, Francês, Inglês, Espanhol e Italiano. Não houve limite de data de divulgação do trabalho para inclusão.

### 4.2.2 Critérios para Exclusão dos Estudos

Foram aplicados os seguintes critérios de exclusão: (a) estudos que abordavam outra população (não gestantes) ou que a suspeita de toxoplasmose não fosse a doença fetal, (b) estudos de revisão, (c) editoriais, (d) consensos, protocolos e guias para a prática clínica, (e) relatos de casos ou série de casos, (f) resumos de congressos, (g) validação de método laboratorial, (h) dados da PCR somente como medida de desfecho de tratamento



### 4.2.3 Fontes de Informação

A estratégia de busca inicial foi conduzida nas seguintes bases de dados: PUBMED, EMBASE, SCOPUS, WEB OF SCIENCE e LILACS. Foi também conferida a bibliografia dos artigos selecionados para a leitura do texto completo e dos artigos de revisão para identificação de possíveis trabalhos relevantes que não tivessem sido encontrados por meio da busca eletrônica. Nossa primeira busca nas bases de dados foi em vinte e cinco de Janeiro de 2012, e a última em 30 de novembro do mesmo ano. Para definição inicial dos termos a serem utilizados, foi conduzida uma busca no MEDLINE com diferentes combinações de termos (palavras do título ou contidas no resumo e palavras chaves), que fossem capazes de encontrar artigos sobre o tema de interesse já em posse dos investigadores, os mesmos termos foram adaptados para busca nas demais bases. Os termos utilizados estão no Quadro 1.

Quadro 1 - Quadro de Termos de Busca nas Bases

PUBMED
(Diagnosis/Broad[filter]) AND ((*pcr*[All Fields]) OR "polymerase chain reaction"[All Fields] OR "polymerase chain reaction"[MeSH] OR (molecular AND test*) AND (toxoplasm* OR "toxoplasmosis" [MeSH]) AND (congenital OR fetal OR prenatal))
SCOPUS
((KEY ("sensitivity and specificity"))OR(TITLE-ABS-KEY(sensitiv*)) OR (TITLE-ABSKEY (diagnos*)) OR (KEY (diagnostic)) OR(KEY (diagnosis))) AND (TITLE-ABS-KEY(PCR)) OR (TITLE-ABS-KEY("polymerase chain reaction" )) OR TITLE-ABS-KEY (molecular AND test))) AND (TITLE-ABS-KEY (toxoplasm*)) AND (TITLE-ABS-KEY (congenital OR fetal OR prenatal)))
WEB OF KNOWLEDGE
((((TS=(diagnostic*)) OR (TS=(diagnosis)) OR (TS=(diagnosis)) OR (TS=("sensitivity and specificity")) OR TI=(sensitiv*)) AND ((TS=("molecular test") OR TS=("polymerase chain reaction") OR TS=(pcr)) AND (TS=(toxoplasmosis) OR TS=(toxoplasm*)) AND (TS=(prenatal) OR TS=(fetal) OR TS=(congenital))))
LILACS
("sensitivity and specificity" OR "sensibilidade e especificidade" OR sensi* R diagnostic* OR diagnos*) AND (pcr OR "teste molecular" OR "molecular test" OR "reação em cadeia da polimerase" OR "polymerase chain reaction") AND (toxoplasm*) AND (pre-natal OR prenatal OR "pre natal" OR congenito OR congenital OR fetal)

#### **4.2.4 Seleção de Estudos**

Após a aplicação das estratégias de busca em bases remotas, as referências e resumos encontrados foram armazenados em uma biblioteca de gerenciador de dados bibliográficos, EndNote, para exclusão das réplicas e organização dos resumos. Os resumos foram lidos de forma independente por dois revisores, que em reunião para resolução das discordâncias, selecionaram os textos a serem lidos na íntegra com extração dos dados. Essa última etapa foi realizada por três revisores de forma independente, sendo que um revisor leu todos os textos, e os outros dois partes não proporcionais dos textos. Em uma segunda reunião para resolução das discordâncias, respeitando os critérios de inclusão e exclusão, foram selecionados os textos incluídos na revisão.

#### **4.2.5 Apuração dos Dados**

Um formulário para captura de dados foi elaborado e testado especificamente para ser utilizado durante a leitura dos textos completos. O teste do formulário consistiu em uma extração de dados por cada um dos revisores com textos diferentes com pelo menos 2 rodadas de discussões sobre os itens contidos no formulário e sobre o fluxo de trabalho. Nesse formulário foram incluídas as perguntas contidas no QUADAS 2 (ferramenta para avaliação do risco de viés em revisões sistemáticas de estudos de acurácia diagnóstica).(18) O formulário (Anexo1) foi composto de 66 questões divididas em 5 seções: identificação do texto, elegibilidade do texto completo, avaliação do risco de viés pelo QUADAS 2, características do estudo ou da amostra e dados do teste.

#### 4.2.6 Itens Apurados

Para cada estudo foi avaliado a idade e a nacionalidade das gestantes da amostra, a idade gestacional ao diagnóstico da toxoplasmose aguda, o tempo entre o diagnóstico da infecção materna e a investigação diagnóstica para toxoplasmose no feto, proporção de gestantes que receberam tratamento para toxoplasmose antes da investigação fetal, tempo entre o início do tratamento e a investigação fetal, se houve evidência de que o tratamento prévio da gestante influenciou no resultado do teste índice.

O teste índice foi definido como o teste da PCR em líquido amniótico de gestantes agudamente infectadas pelo *Toxoplasma gondii* durante a gestação. A infecção aguda foi definida como soroconversão materna, caracterizada pelo aparecimento de anticorpos específicos das classes IgM, IgA ou IgG, sendo que a última amostra negativa foi obtida após o início da gravidez, ou pela presença de IgG específico na primeira amostra, em ascensão, associado com a persistência dos níveis de IgA e IgM.(16)(17)

O teste considerado referência padrão foi o seguimento clínico e sorológico da criança durante o primeiro ano de vida. O diagnóstico foi confirmado quando a sorologia específica (IgM, IgA ou síntese de IgG) foi demonstrada no sangue do recém nascido, e ausência de toxoplasmose foi definida por resultados de IgG específica negativa, na ausência de tratamento, aos 12 meses de idade.

#### 4.2.7 Risco de Viés

A avaliação do risco de viés dos textos completos incluídos na revisão foi conduzida pelos revisores de forma independente durante a extração de dados. O QUADAS-2 (Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies) (18) foi utilizado. Essa ferramenta é recomendada para uso em revisões sistemáticas de desempenho diagnóstico pela Agency for Healthcare Research and Quality, Cochrane Collaboration, e o U.K. National Institute for Health and Clinical Excellence. Compreende 4 domínios: seleção de pacientes, teste índice, referência padrão, fluxo e tempo (fluxo de pacientes através do estudo e calendário do teste

índice e da referência padrão). Cada domínio é avaliado em termos de risco de viés, sendo que os três primeiros são avaliados também no que diz respeito à aplicabilidade (seção 3 do anexo 1). Essa ferramenta permite uma classificação mais transparente do risco de viés e aplicabilidade dos estudos de precisão diagnóstica.

#### **4.2.8 Medida Resumo e Síntese dos Resultados**

Os dados foram analisados utilizando-se o programa estatístico R-project disponível no endereço eletrônico <http://www.r-project.org/> (19) com os pacotes mada e meta. A análise estatística consistiu em cálculo das estimativas de sensibilidade, especificidade e DOR (Diagnostic Odds Ratio), com intervalo de confiança de 95%, onde as medidas sumárias combinadas foram calculadas com os modelos de efeito fixo (para sensibilidade e especificidade) e de efeitos aleatórios pelo método de DerSimonian-Laird (para sensibilidade, especificidade e DOR). Ainda, estimou-se a sensibilidade e especificidade sumárias combinadas pelo modelo bivariado proposto por Reitsma, com seus respectivos intervalos de confiança. Curva ROC sumária (SROC) e sua AUC foram estimadas pelo método proposto por Rutter & Gatsonis. Todas essas análises foram conduzidas para dados correspondentes a investigação diagnóstica de toxoplasmose em cada trimestre separadamente e para dados de todos os trimestres em conjunto. A heterogeneidade foi explorada por meta-regressão com modelo linear misto onde os componentes da variância foram estimados por máxima verossimilhança restrita. As variáveis especificadas com antecedência para essa exploração foram os elementos utilizados na avaliação do risco de viés pelo QUADAS-2, características da amostra utilizada nos estudos originais, e características do teste índice utilizados nos estudos originais. No entanto, para todos os trimestres, cada trimestre individualmente e para os elementos programados com antecedência que eventualmente apresentassem significância nesta análise, foram demonstrados o  $I^2$  e o valor de p para o teste Q de Cochrane.

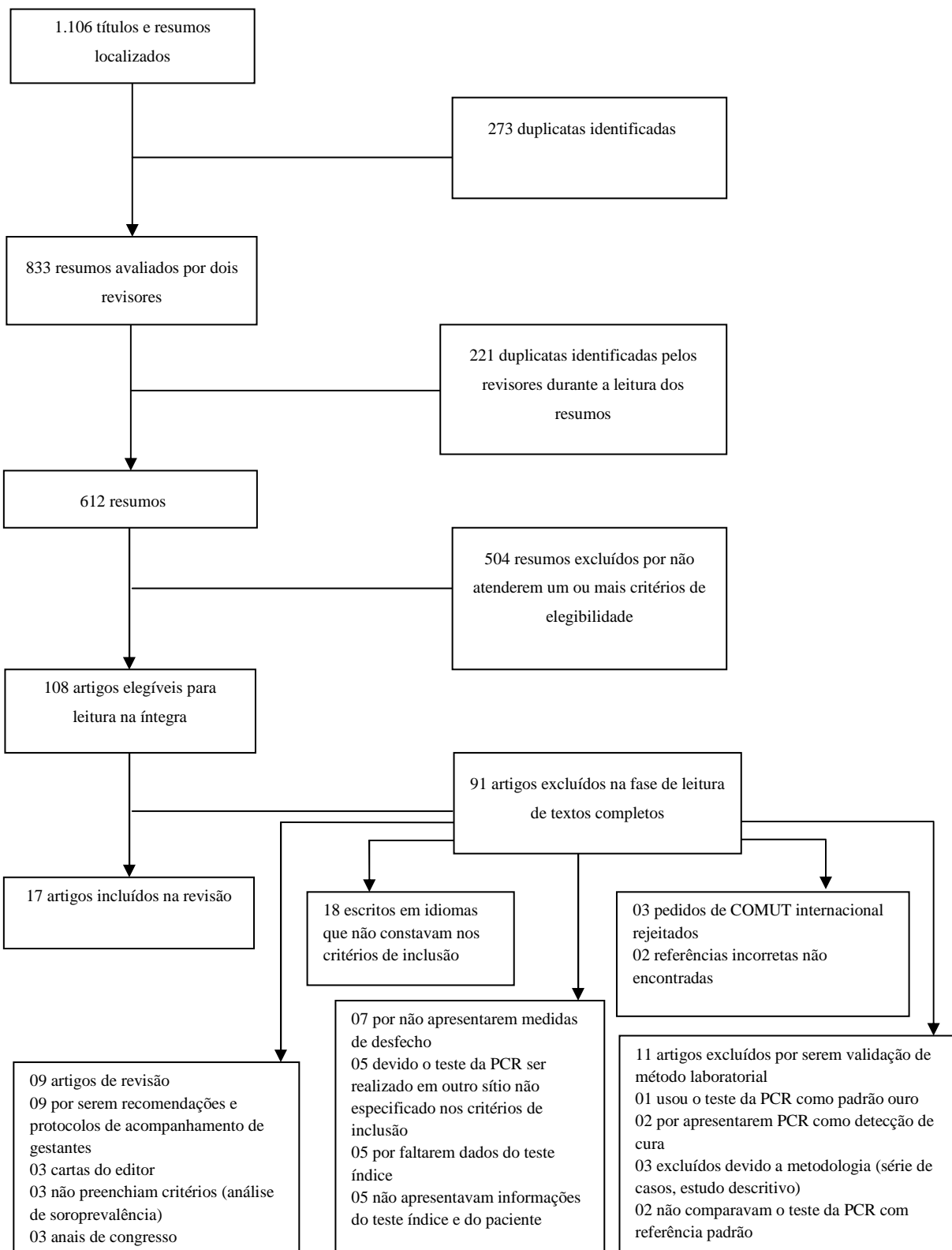
Para cada um dos grupos de dados formados pelo trimestre de gestação quando a investigação diagnóstica ocorreu, gráficos do tipo floresta (Forest plots) foram elaborados.

#### **4.2.9 Risco de Viés no Estudo**

O risco de viés de publicação (*reporting bias*) foi explorado por gráficos de funil e testes de *Begg*, para cada um dos grupos formados pelo de trimestres de gestação quando a investigação diagnóstico ocorreu, e para cada um dos grupos formados por variáveis significantes na exploração da heterogeneidade.

### 4.3 RESULTADOS

Figura 1 – FLUXOGRAMA dos resultados da busca



### **4.3.1 Seleção de Estudos**

Após a busca inicial foram encontrados 1.106 resumos e títulos, com a retirada das duplicatas restaram 612 resumos. Aplicando-se os critérios de inclusão e exclusão foram eleitos 108 resumos para que os textos completos fossem recuperados. Os textos na íntegra foram avaliados de forma independente por três revisores. Ao final dessa etapa 17 artigos foram incluídos na revisão (Figura 1).

### **4.3.2 Características dos Estudos Incluídos**

#### **4.3.2.1 Quanto a Amostra**

Os 17 trabalhos incluídos totalizaram 3.069 pacientes (tabela 1). Sete (41.1%) estudos incluídos foram multicêntricos e um (5,8%) estudo foi multicêntrico com sujeitos de pesquisa de várias nacionalidades incluindo França, Inglaterra, Itália, Kuwait, Áustria e Dinamarca. As nacionalidades dos demais estudos foram: dez (58.8%) estudos realizados na França, quatro (23.5%) no Brasil, um (5.8%) na Grécia, um (5.8%) na Noruega. Um dos estudos incluídos apresentou dados de dois testes da PCR para a mesma população com resultados idênticos. (17) Apenas três (17.6%) informaram a média de idade das gestantes da amostra que variou entre 19 e 25.5 anos. A idade gestacional média em que a infecção aguda materna ocorreu foi informada em três estudos (17.6%), e variou entre 15.6 e 19.6 semanas. O tempo em semanas entre o diagnóstico da infecção materna e a investigação fetal variou de 3.5 a 9.1 semanas, sendo que este dado foi apresentado em sete (41.1%) estudos. Não havia relato de gestantes HIV positiva na amostra dentre os estudos incluídos. Em 12 estudos (72.2%) não foi explícita a avaliação por um comitê de ética em pesquisa. Nos 17 estudos (100%) incluídos a amostra biológica utilizada foi líquido amniótico.

O desempenho do teste para cada trimestre da soroconversão materna foi apresentado em cinco estudos (29,4%), um deles (17) realizou dois testes, com a mesma população e mesmo

resultado. A população dos cinco estudos foi de 1.641 gestantes, sendo que 809 (49.3%) gestantes soroconverteram no primeiro trimestre, 611 (37.2%) gestantes no segundo trimestre e 221 (13.4%) gestantes no terceiro trimestre de gestação (tabela 1). Estes estudos foram os mais atuais.

O tratamento materno antes da investigação fetal foi informado em oito trabalhos em um total de 1.112 pacientes, 1.090 (98%) receberam tratamento. Não foram apresentados nestes estudos dados ou discussões suficientes a respeito da influência do tratamento materno na sensibilidade do teste da PCR no líquido amniótico.

Dois estudos propuseram um modelo para prever a probabilidade de infecção fetal com um teste que amplifica DNA de *T. gondii*. Em um estudo multicêntrico europeu (20), foi avaliado a probabilidade de recém nato estar com toxoplasmose congênita baseado no risco pré teste (baseado no período da gestação em que houve detecção de anticorpos maternos) e um resultado positivo ou negativo da PCR. Nesse estudo uma mulher que soroconverteu no primeiro trimestre de gestação, um teste de PCR positivo aumentaria seu risco de ter um feto infectado de 9% (pré-teste) para 84% (pós-teste), ao passo que um resultado de PCR negativo reduziria seu risco para 3%. Se a soroconversão ocorre com 36 semanas de idade gestacional, um teste de PCR positivo aumentaria seu risco de um feto infectado de 73% (pré-teste) para 99% (pós-teste), e um resultado negativo reduziria seu risco para 44%. Em outro estudo (21) foi estimado a razão de verossimilhança positiva (RVP) e negativa e a probabilidade de infecção congênita de acordo com a PCR no líquido amniótico, e resultados de IgM e IgA em sangue do neonato. Combinando a probabilidade pré-teste da transmissão vertical e a razão de verossimilhança, foi capaz de determinar o risco de infecção fetal.



**TABELA 1 – CARACTERÍSTICA DOS ESTUDOS INCLUÍDOS**

Autor/ano	Nacionalidade	Tamanho da amostra	Multicêntrico	Média de idade em anos das gestantes da amostra	Proporção no primeiro trimestre	Proporção no segundo trimestre	Proporção no terceiro trimestre	Idade gestacional média em semanas da infecção aguda materna	Tempo em semanas entre diagnóstico materno e investigação fetal	Evidência de que o tratamento prévio da gestante influenciou no teste índice	Proporção de gestantes que receberam tratamento antes da investigação fetal
CAZENAVE et al., 1992	França	80	não	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
DUPOUYCAMEt et al., 1992	França	44	não	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	100%
HOHLFELD et al., 1994	França	339	não	NI	NI	NI	NI	NI	4	NI	100%
JENUM et al., 1998	Noruega	67	sim	NI	NI	NI	NI	NI	NI	Não	81%
GANGNEUX et al., 1999	França	94	sim	NI	NI	NI	NI	NI	4	NI	100%
ANDRADE et al., 2001	Brasil	27	não	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
CASTRO et al., 2001	Brasil	37	não	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	100%
ROMAND et al., 2001	França	270	sim	NI	23,7%	47%	29,3%	18,3	7,3	Não	96,70%
ANTSAKLIS et al., 2002	Grécia	79	não	NI	NI	NI	NI	19,6	4	Não	NI
BESSIÈRES et al., 2002	França	261	não	NI	NI	NI	NI	NI	3,5	Não	100%
VIDIGAL et al., 2002	Brasil	86	sim	19-24	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
FIGUEIRÓ-FILHO et al., 2005	Brasil	45	não	23	NI	NI	NI	15,6	NI	NI	NI
ORDINAIRE et al. (a), 2005	França	30	não	NI	43,33%	26,60%	30%	NI	NI	NI	NI
ORDINAIRE et al. (b), 2005	França	30	não	NI	43,33%	26,60%	30%	NI	NI	NI	NI
THALIB et al., 2005	Kwait, França, Inglaterra, Áustria, Dinamarca	593	sim	NI	60,20%	33,70%	6%	NI	9,1	Não	NI
BESSIÈRES et al., 2009	França	276	sim	NI	34,78%	48,55%	16,66%	NI	3,5	NI	NI
RABILLOUD et al., 2010	França	481	não	NI	46,40%	28,40%	25,20%	NI	8	NI	NI
WALLLON et al., 2010	França	261	sim	NI	41,70%	33,40%	24,90%	NI	8,6	NI	NI

Espec- especificidade, NI- não informado, Sens- sensibilidade, VPN- valor preditivo negativo, VPP- valor preditivo positivo

### 4.3.2.2 Quanto ao Teste

Em 100% dos estudos o teste da PCR foi *in-house*, ou seja, não comercialmente disponível (tabela 2). Quanto ao tipo do teste três estudos (17,6%) usaram PCR quantitativa em tempo real, e 14 (82,3%) estudos realizaram PCR qualitativa. Não foi encontrado na revisão estudos com protocolos idênticos para realização do teste da PCR.

Entre os estudos incluídos, 13 (76,4%) amplificaram o DNA alvo do gene B1. Os iniciadores utilizados para o processo de amplificação gênica variaram entre os estudos.

**TABELA 2 – DESCRIÇÃO DAS INVESTIGAÇÕES ORIGINAIS INCLUÍDAS QUANTO A CARACTERÍSTICAS DO TESTE**

Estudo	Autor/ano	Teste in house	PCR quantitativo/qualitativo	Primer	Região amplificada	Amostra biológica utilizada
1	Cazenave et al., 1992	sim	qualitativo	TG 1, 2 e 3	R-DNA	LA
2	Dupouycamet et al., 1992	sim	qualitativo	418-700	P30	LA
3	Hohlfeld et al., 1994	sim	qualitativo	Toxo B22 e B23	gene B1	LA
4	Jenum et al., 1998	sim	qualitativo	NI	gene B1	LA
5	Gangneux et al., 1999	sim	qualitativo	*1	gene B1/TGR1E	LA
6	Andrade et al., 2001	sim	qualitativo	NI	gene B1	LA
7	Castro et al., 2001	sim	qualitativo	NI	gene B1	LA
8	Romand et al., 2001	sim	qualitativo	NI	gene B1	LA
9	Antsaklis et al., 2002	sim	qualitativo	NI	gene B1	LA
10	Bessières et al., 2002	sim	qualitativo	Toxo B22 e B23 (Hohlfeld et al. 1994)	gene B1	LA
11	Vidigal et al., 2002	sim	qualitativo	OUTER 1e4/INNER2 e 3	gene B1	LA
12	Figueiró-Filho et al., 2005	sim	qualitativo	NI	NI	LA
13a	Ordinaire et al., 2005	sim	quantitativo	*2	gene B1	LA
13b	Ordinaire et al., 2005	sim	qualitativo	694-887	gene B1	LA
14	Thalib et al., 2005	sim	qualitativo	NI	NI	LA
15	Bessières et al., 2009	sim	qualitativo/quantitativo	*3	B1 e RE sequence	LA
16	Rabilloud et al., 2010	sim	qualitativo	NI	gene B1	LA
17	Walllon et al., 2010	sim	quantitativo	Tox-9 e Tox-11	529pb	LA

NI- não informado; LA- líquido amniótico

\*1 sequência dos primers: B1 5'-CCGCCTCCTTCGTCGTCGTA e 5'-TGAAGAGGAAACAGGTGGTTCG TGR1E 5'-ATGGTCCGGCCGGTGTATGATATGCGAT e 5'-TCCCTACGTGGTGCCGCAGTTGCC

\*2 sequência dos primers 5'-CGGAAATAGAAAGCCATGAGGCACTCC e 5'-ACGGGCGAGTAGCACCTGAGGAGAT

\*3 primers descritos em outro artigo (dado como referência – Cassaing et AL. 2006) : B1 5'-GGAGGACTGGCAACCTGGTGTTCG e 5'-TTGTTTCACCCGGACCGTTTAGCAG RE 5'-AGGCGAGGGTGAGGATGA e 5'-TCGTCTCGTCTGGATCGAAT

Todos os estudos utilizaram o seguimento clínico e sorológico do recém-nato durante o primeiro ano de vida como referência. Alguns trabalhos utilizaram testes adicionais para composição da referência, tais como: inoculação de líquido amniótico em peritônio de camundongos (dez estudos ou 58,8%), isolamento do parasita em cultura de células (três estudos ou 17,6%), exame histopatológico da placenta (um estudo ou 5,8%).

### 4.3.3 Resultado da Avaliação da Qualidade Metodológica e Risco de Viés

**TABELA 3 - RISCO DE VIÉS PELO QUADAS 2**

Estudo	Risco de viés			Aplicabilidade			
	Seleção de pacientes	Teste índice	Teste referência	Fluxo e tempo	Seleção de pacientes	Teste índice	Teste referência
CAZENAVE J., 1992	?	?	?	?	?	?	?
DUPOUY CAMET J., 1992	?	?	?	?	☺	☺	☺
HOHLFELD, 1994	☺	☺	?	☺	☺	☺	☺
JENUM P A., 1998	☺	☺	☺	☺	☺	☺	☺
GANGNEUX F. R., 1999	☺	☺	?	☺	☺	☺	☺
RUMAND S., 2001	☺	?	?	☺	☺	☺	☺
ANDRADE G. M. Q., 2001	?	?	☺	?	☺	?	☺
CASTRO F. C., 2001	☺	?	☺	☺	☺	☺	☺
ANTSAKLIS A., 2002	☺	?	?	☺	☺	☺	☺
BESSIERES M. H., 2002	☺	?	☺	⊗	☺	☺	☺
VIDIGAL P. U. T., 2002	?	☺	?	?	☺	☺	☺
FILHO E. A. F., 2005	☺	☺	☺	?	☺	☺	☺
ORDINAIRE, (a) 2005	?	?	☺	?	☺	☺	☺
ORDINAIRE, (b) 2005	?	?	☺	?	☺	☺	☺
THALIB L., 2005	☺	⊗	⊗	⊗	☺	☺	☺
BESSIERES M. H., 2009	☺	⊗	⊗	⊗	☺	☺	☺
RABILLOUD M., 2010	?	?	?	?	☺	☺	?
WALLON M., 2010	⊗	?	?	☺	☺	☺	☺

Baixo risco de viés- ☺      Alto risco de viés- ⊗      Não está claro- ?

Maior risco de viés ocorreu entre as dimensões de condução e relatório do que na dimensão da aplicabilidade do teste (Tabela 3). O fluxo de pacientes através do estudo (descreve se todos os pacientes receberam o teste índice e o teste de referência, se o intervalo de tempo entre os testes foi apropriado, e se este fluxo pode levar a viés no estudo) (18), foi em geral a dimensão mais suscetível a viés, seguida pela realização do teste índice e do teste de referência (figura 2). O maior índice de respostas “não está claro” foi em relação ao teste

índice, seguido pelo teste de referência (figura 2), o que demonstra suscetibilidade a viés dos estudos de acurácia diagnóstica, com ausência de informações, relatórios precários, tornando difícil a avaliação da condução dos estudos. Quanto a aplicabilidade o risco de viés foi menor, e semelhante nos três domínios (figura 3).

Ainda, não foi encontrada correlação entre a taxa de falso positivo e a sensibilidade em qualquer das análises de subgrupos, indicando ausência do efeito do limite de decisão como fonte de heterogeneidade (tabela 4).

Figura 2 – QUADAS risco de viés

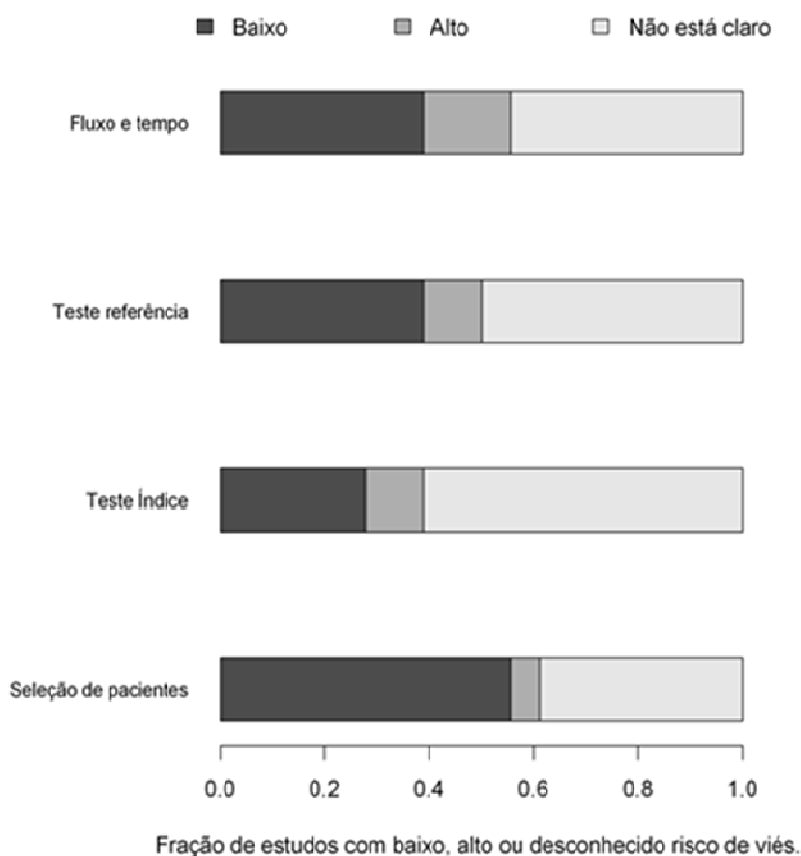
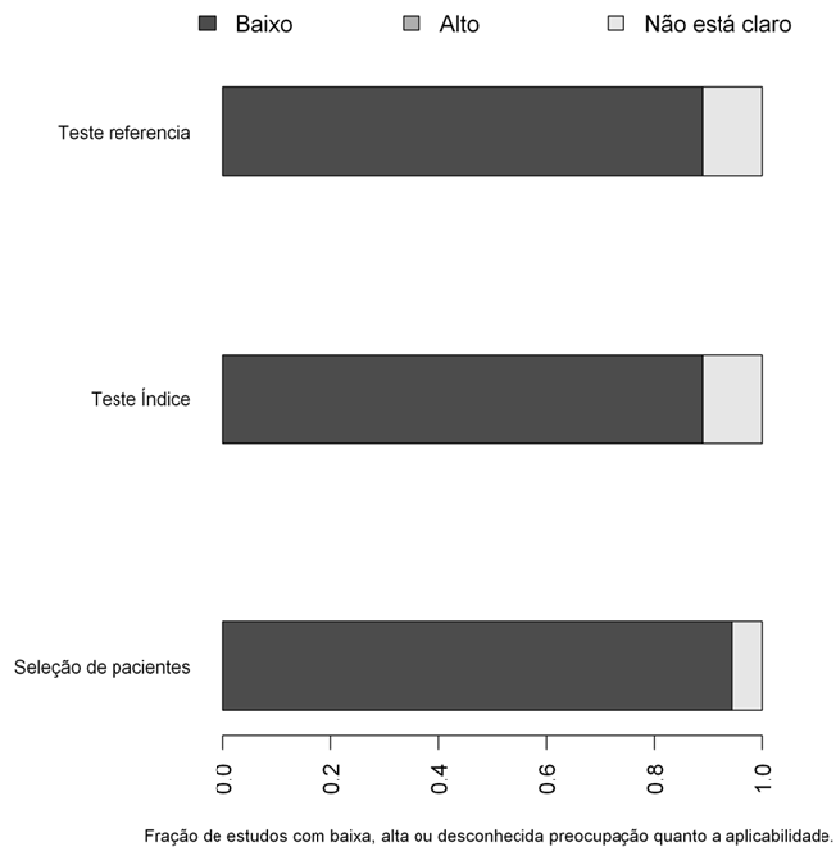


Figura 3 - QUADAS aplicabilidade



#### 4.3.4 Resultados de Estudos Individuais e Síntese dos Resultados para Todos os Trimestres em que ocorreu a viragem sorológica

**TABELA 4 - Desempenho da PCR para Diagnóstico de Toxoplasmose Fetal para Todos os Trimestres e Cada Trimestre da Gestação**

	Modelo	Estimativa	IC inf	IC sup	I <sup>2</sup>	IC inf	IC sup
<b>Todos(n=17)</b>							
Se	Bivariado	0,771	0,695	0,833	0,795	0,682	0,867
Sp	Bivariado	0,983	0,964	0,992	0,346	0,000	0,629
DOR	DL	270,985	99,216	740,130	0,466	0,074	0,692
Correlação		0,042	-0,420	0,487			
<b>1º Trim(n=6)</b>							
Se	Bivariado	0,569	0,395	0,727	0,413	0,000	0,768
Sp	Bivariado	0,992	0,982	0,997	0,000	0,000	0,000
DOR	DL	305,289	66,950	1392,102	0,000	0,000	0,214
Correlação		0,325	-0,567	0,866			
<b>2º Trim(n=6)</b>							
Se	Bivariado	0,788	0,656	0,878	0,719	0,349	0,878
Sp	Bivariado	0,973	0,952	0,986	0,191	0,000	0,638
DOR	DL	168,593	74,261	382,751	0,000	0,000	0,708
Correlação		-0,083	-0,787	0,715			
<b>3º Trim(n=6)</b>							
Se	Bivariado	0,756	0,660	0,831	0,815	0,604	0,913
Sp	Bivariado	0,912	0,802	0,963	0,000	0,000	0,349
DOR	DL	55,552	9,890	312,037	0,000	0,000	0,727
Correlação		0,339	-0,556	0,870			

DOR- razão de chance diagnóstica, I<sup>2</sup>- grau de heterogeneidade, IC inf.- limite inferior do Intervalo de confiança de 95%, IC sup.- intervalo de confiança superior, n- número de estudos que continham a informação, Se- sensibilidade, Sp- especificidade.

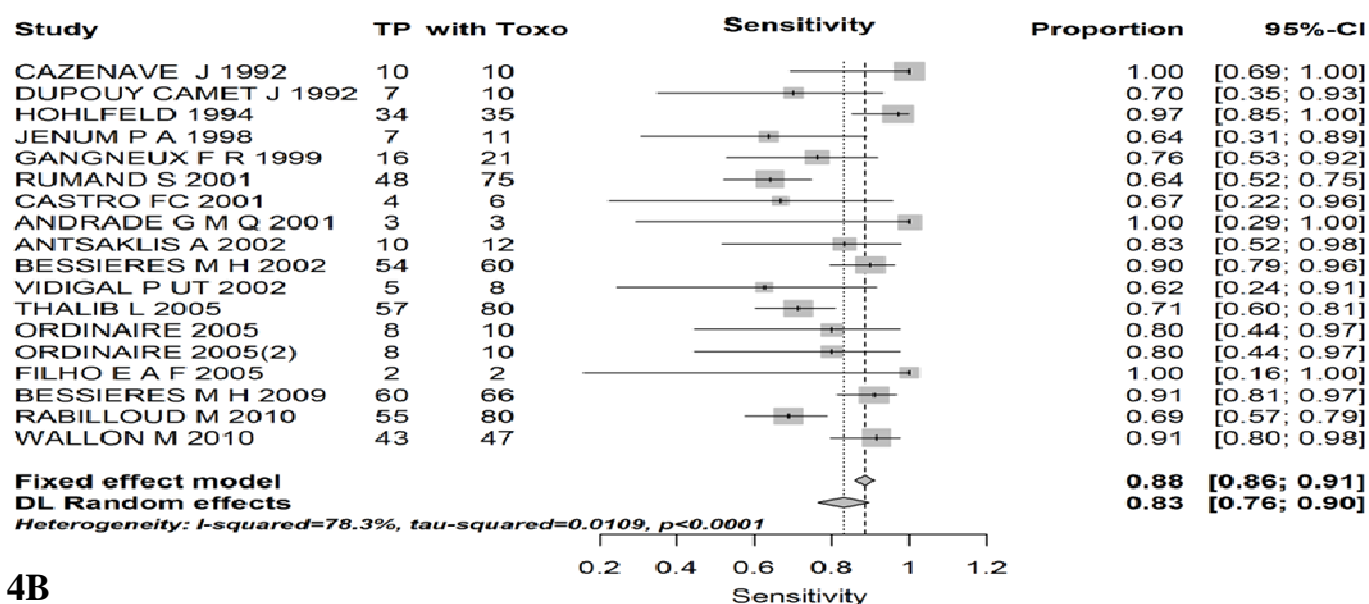
**TABELA 5 – Desempenho da PCR para Diagnóstico de Toxoplasmose Fetal para os Diferentes Tempos entre a Investigação Materna e Fetal**

	<b>Modelo</b>	<b>Estimativa</b>	<b>ICinf</b>	<b>ICsup</b>	<b>I<sup>2</sup></b>	<b>ICinf</b>	<b>ICsup</b>
<b>&gt;5 semanas (n=4)</b>							
<b>Se</b>	Bivariado	0,738	0,599	0,841	0,863	0,668	0,944
<b>Sp</b>	Bivariado	0,990	0,980	0,995	0,668	0,031	0,886
<b>DOR</b>	DL	281,232	84,803	932,649	39,200		
<b>Correlação</b>		-0,308	-0,979	0,928			
<b>&lt;=5 semanas (n=5)</b>							
<b>Se</b>	Bivariado	0,874	0,799	0,924	0,440	0,000	0,794
<b>Sp</b>	Bivariado	0,992	0,980	0,995	0,000	0,000	0,560
<b>DOR</b>	DL	1498,629	360,571	6228,703	0,000		
<b>Correlação</b>		-0,287	-0,933	0,797			

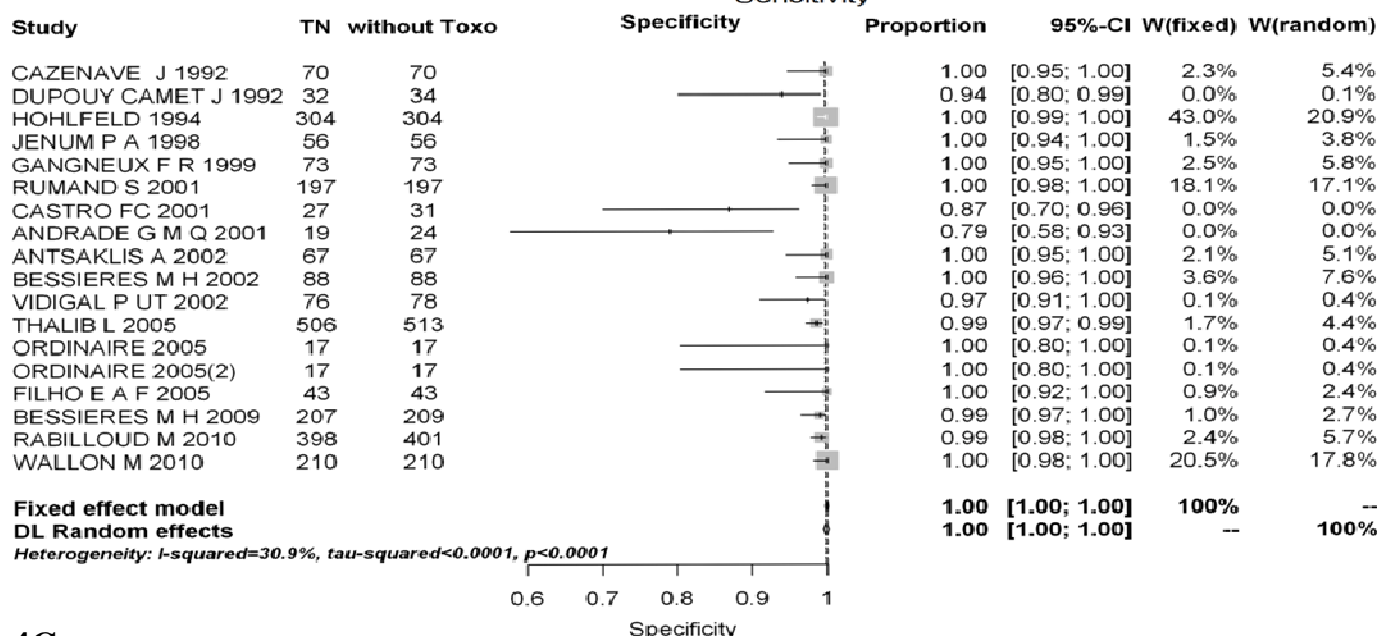
DOR- razão de chance diagnóstica, DL- DerSimonian- Laird, I<sup>2</sup>= grau de heterogeneidade, IC inf- limite inferior do intervalo de confiança de 95%, IC sup- limite superior do intervalo de confiança, Sp- especificidade, Se- sensibilidade, n= número de estudos.

## 4A

Figura 4 - Figuras 4 A, B e C - Forest Se, Sp e DOR todos os trimestres



## 4B



## 4C

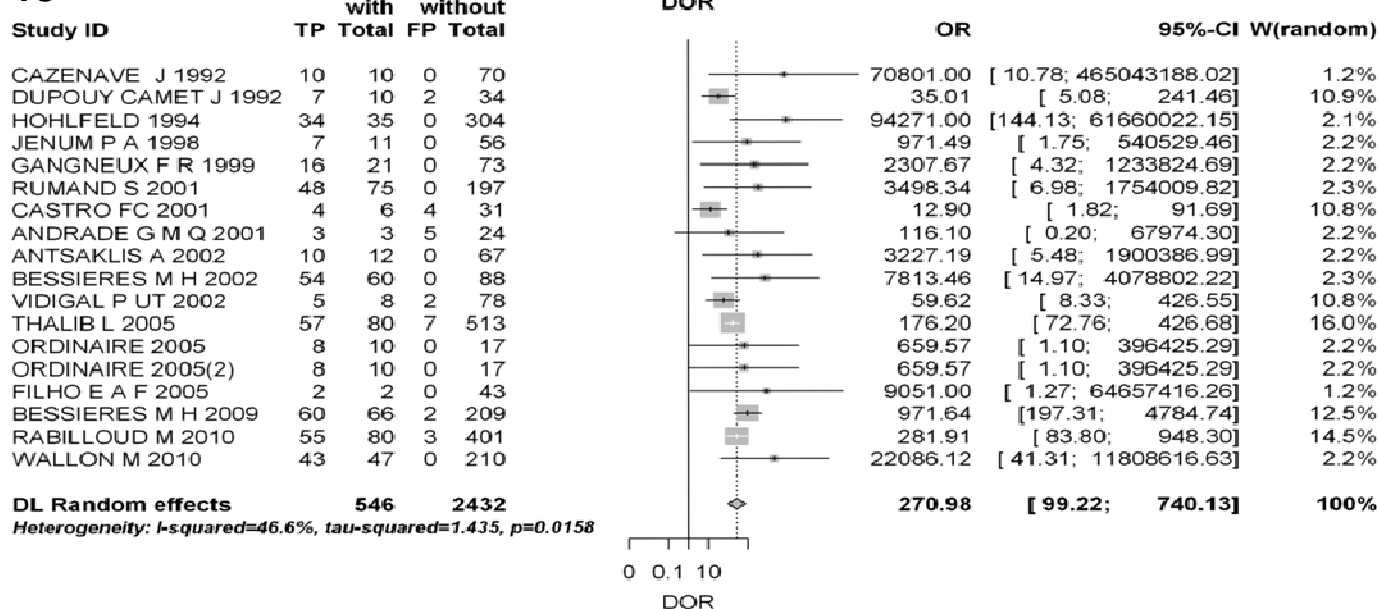
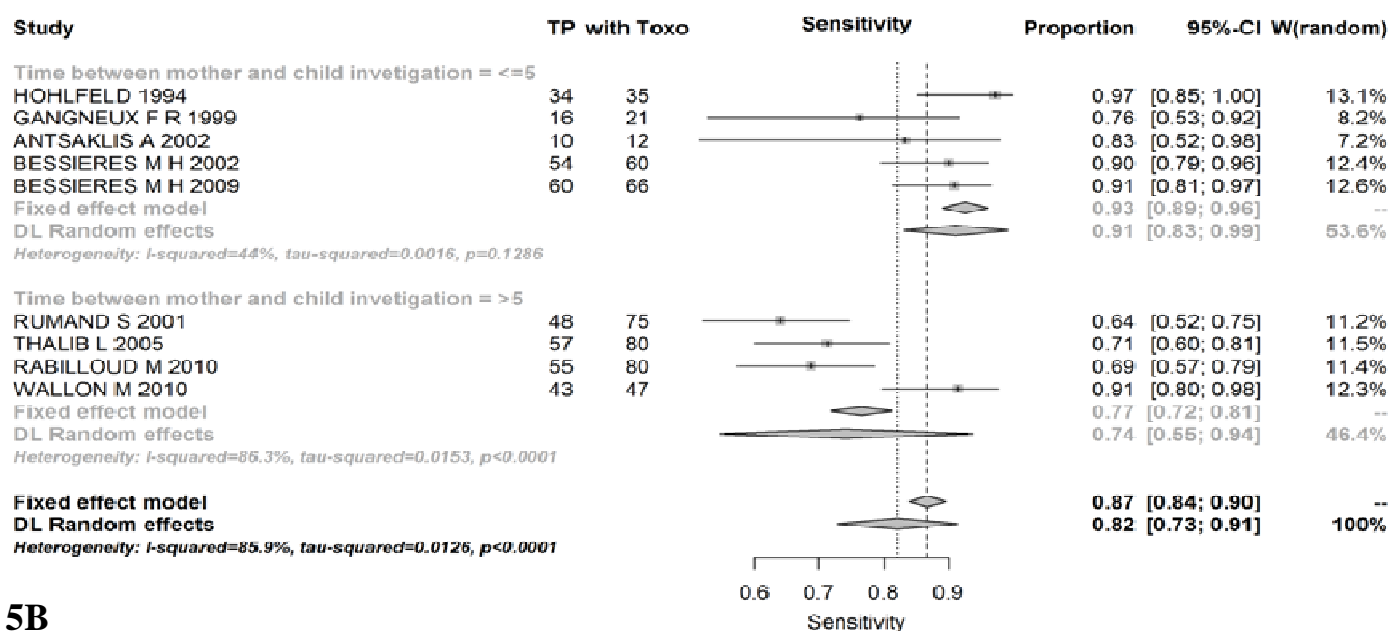


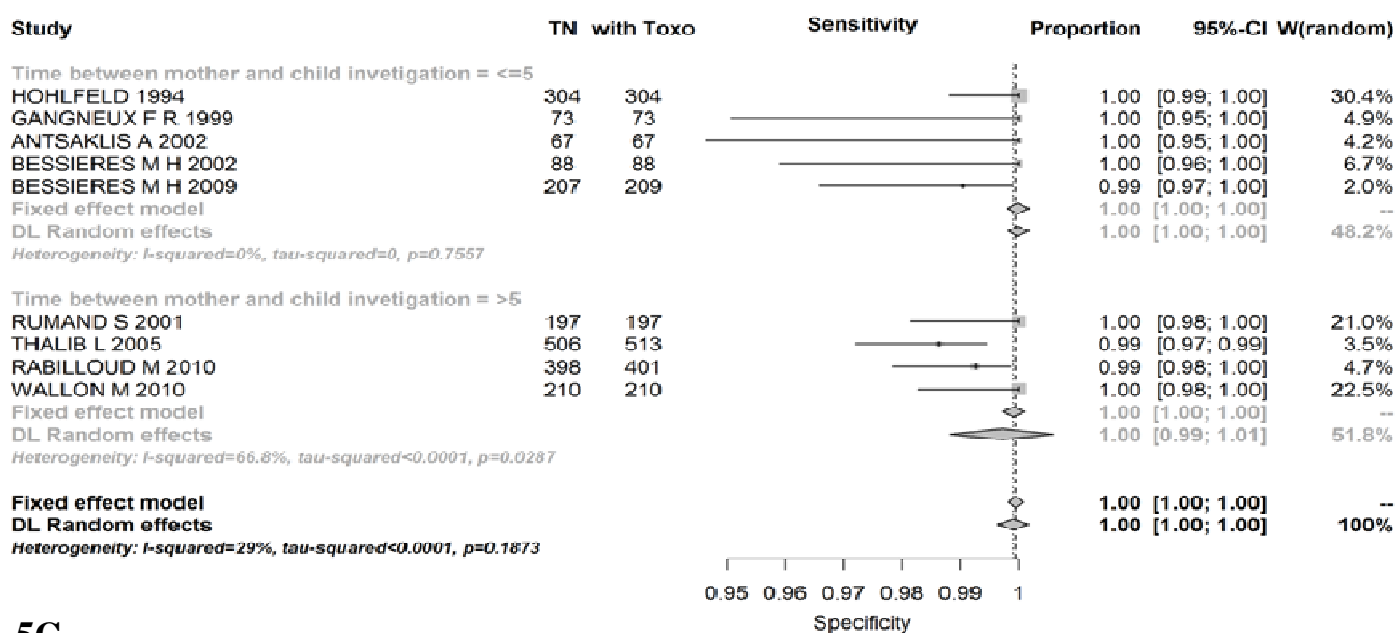


Figura 5 – 5 A, B e C- Forest Se, Sp e DOR todos os trimestres para tempo de investigação

## 5A



## 5B



## 5C

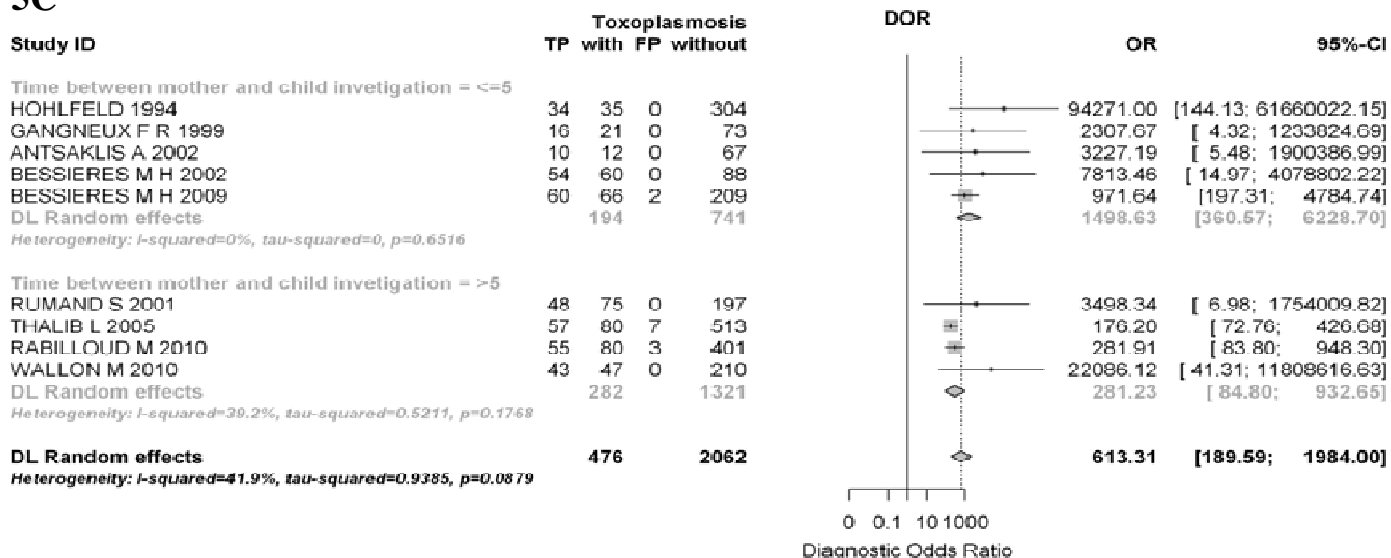


Figura 6 - Figuras 6 A, B e C- Forest Se, Sp e DOR 1° trimestre

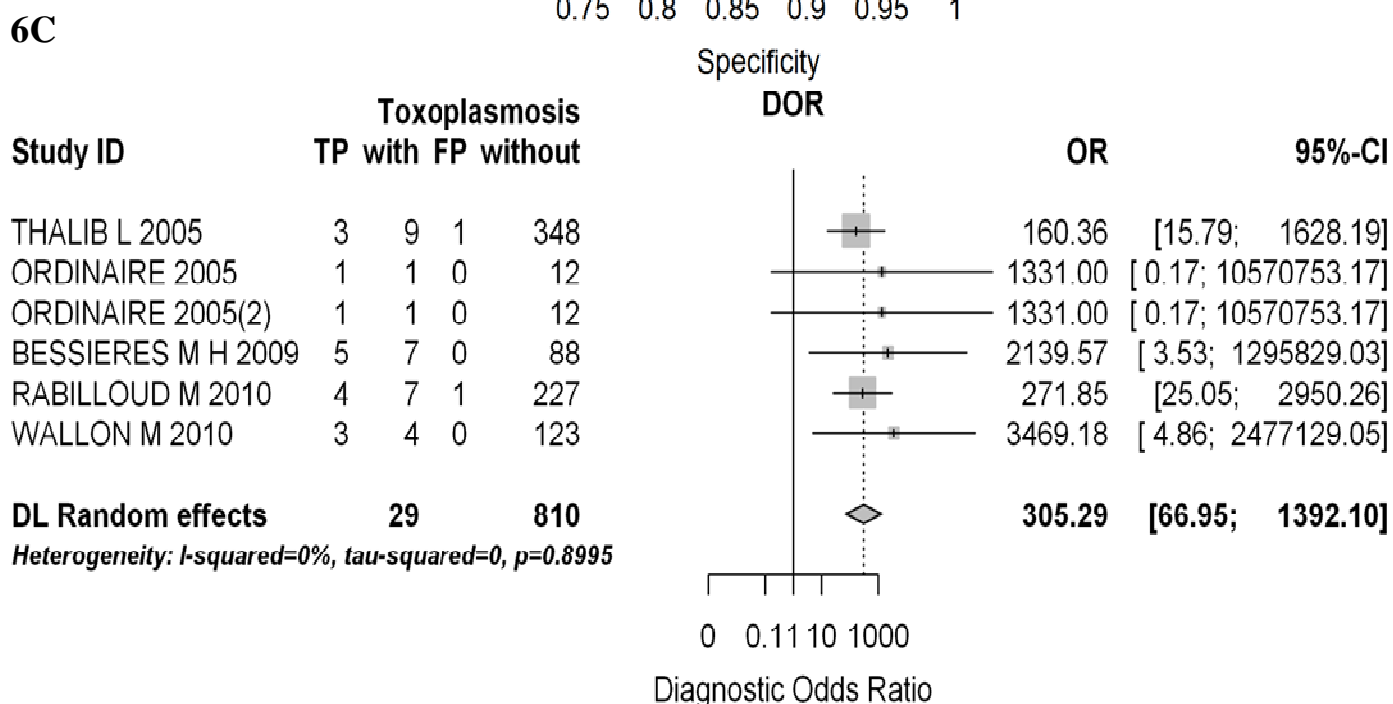
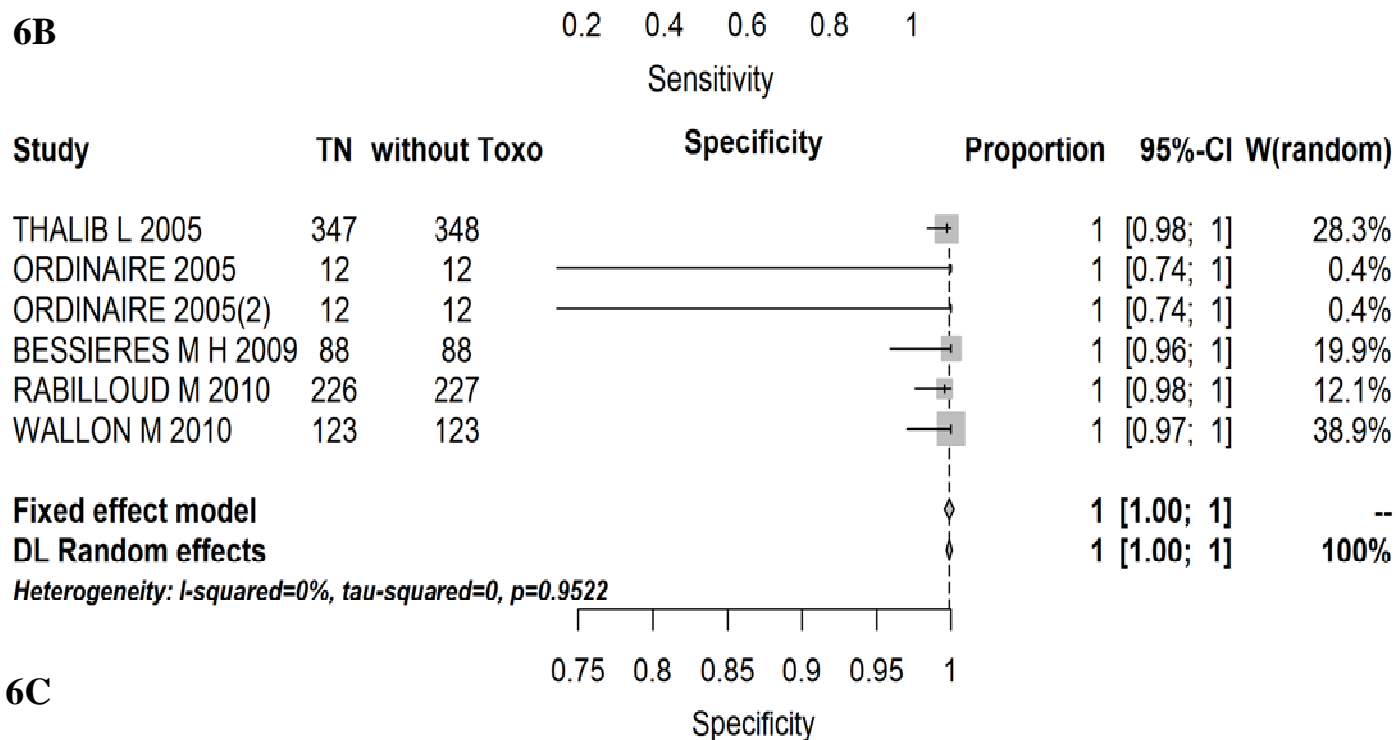
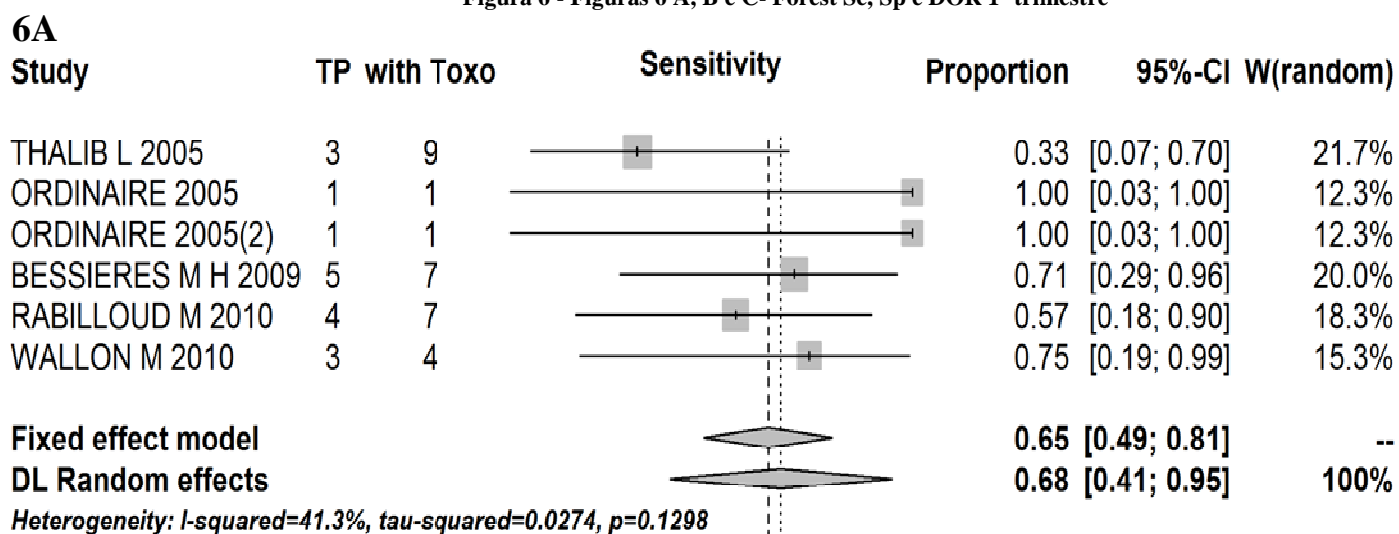


Figura 7 - Figuras 6 A, B e C- Forest Se, Sp e DOR 2º trimestre

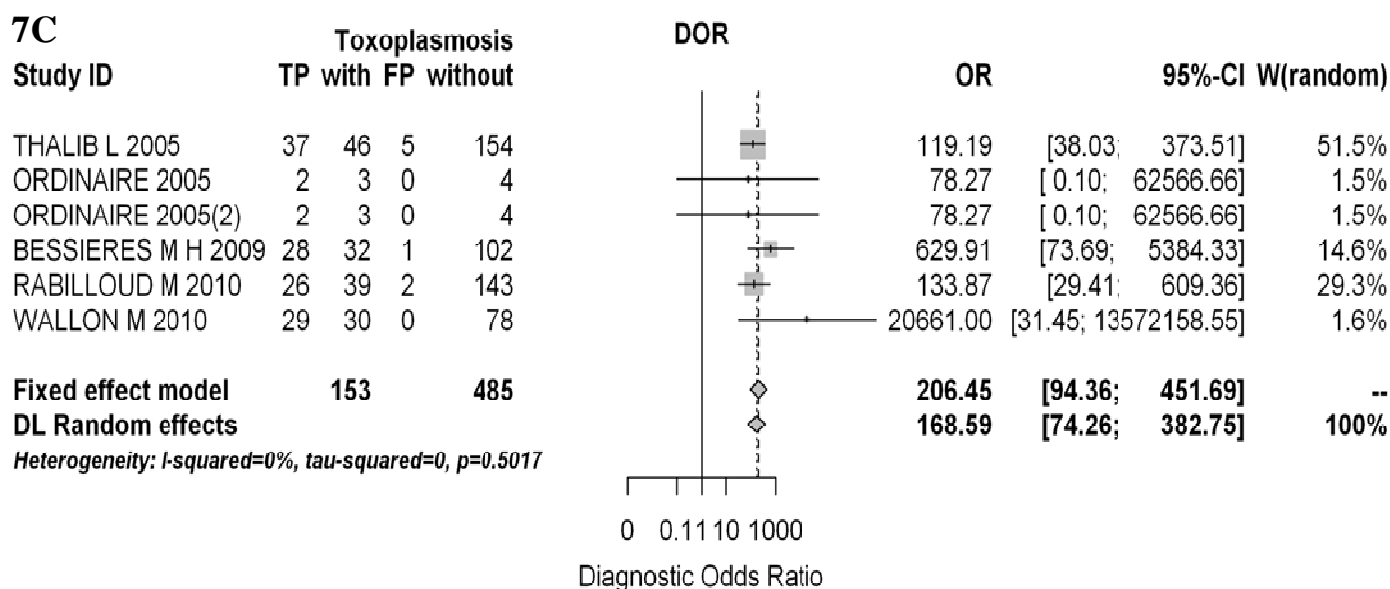
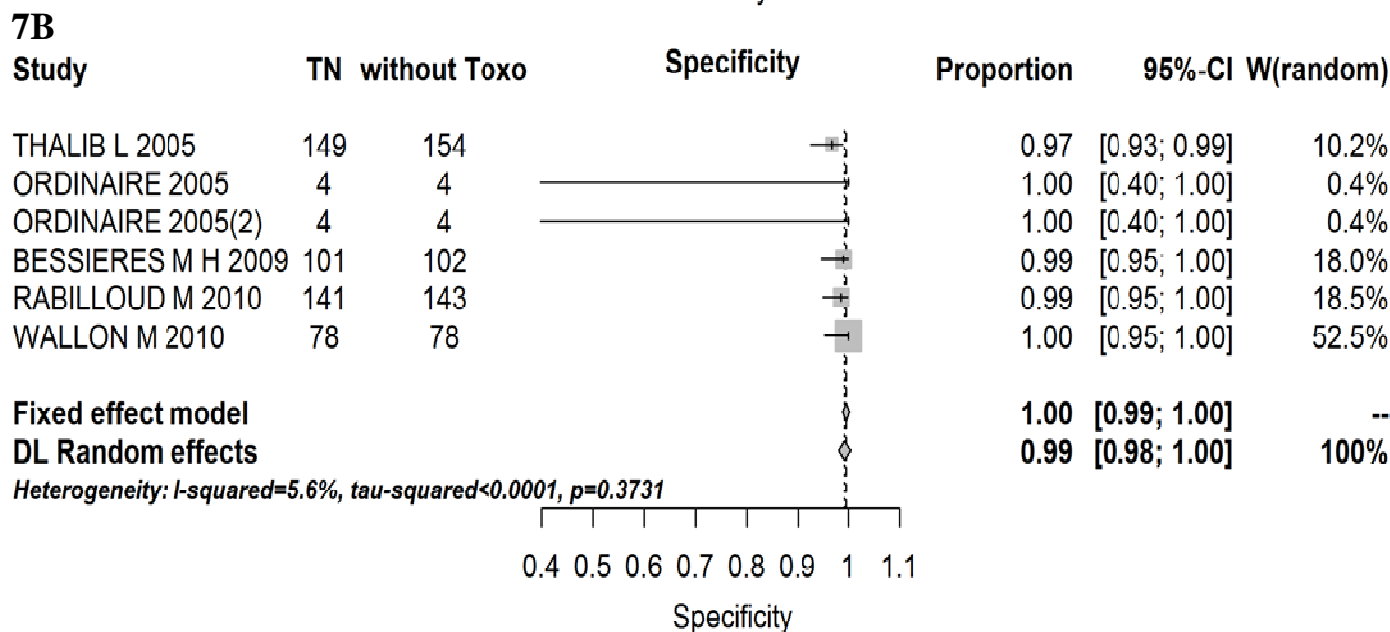
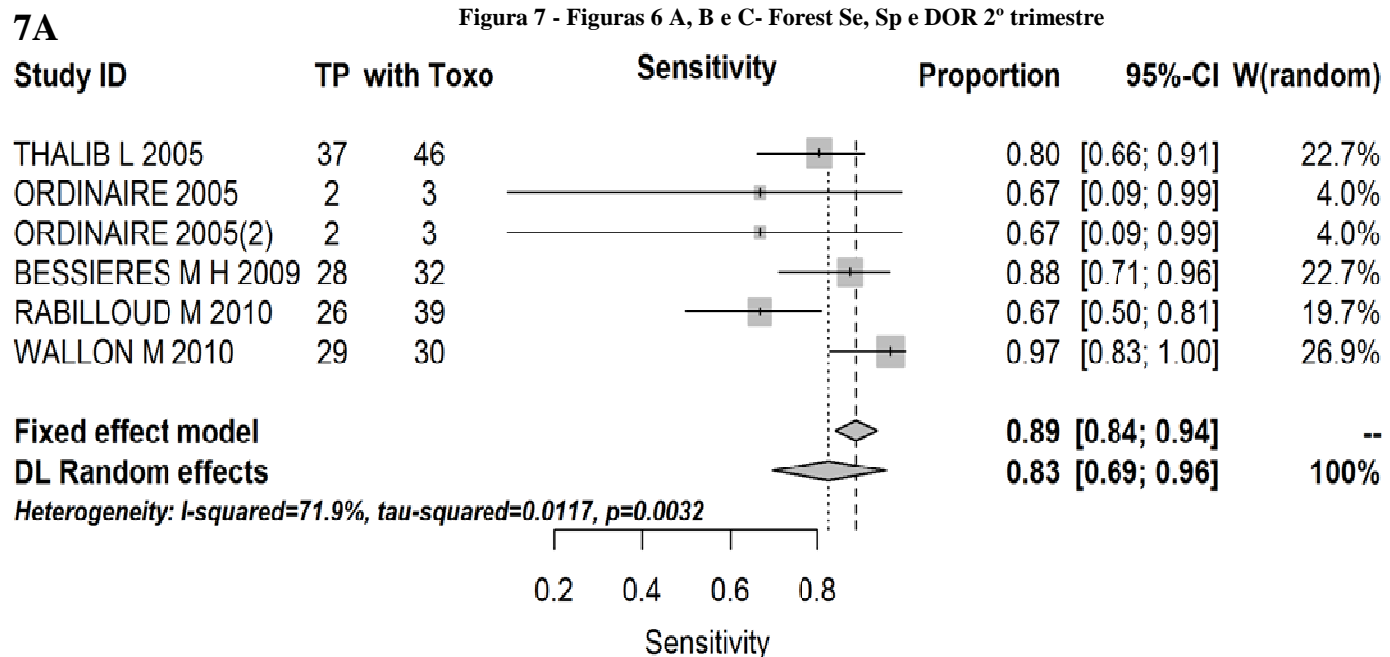
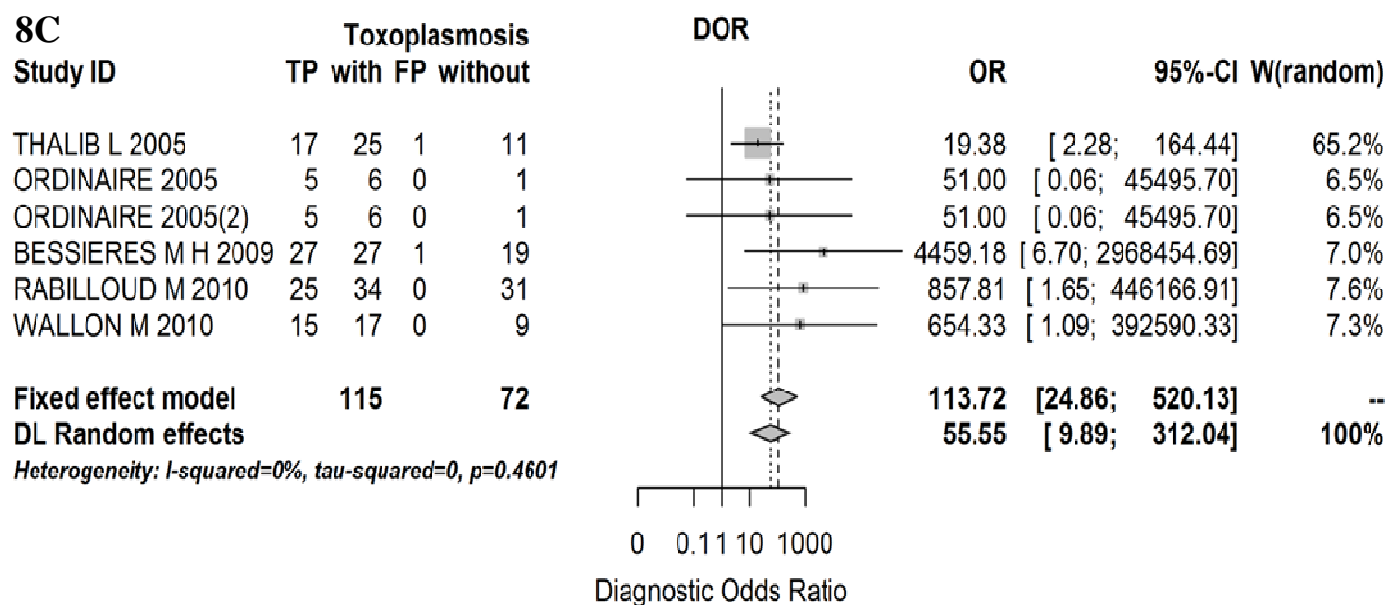
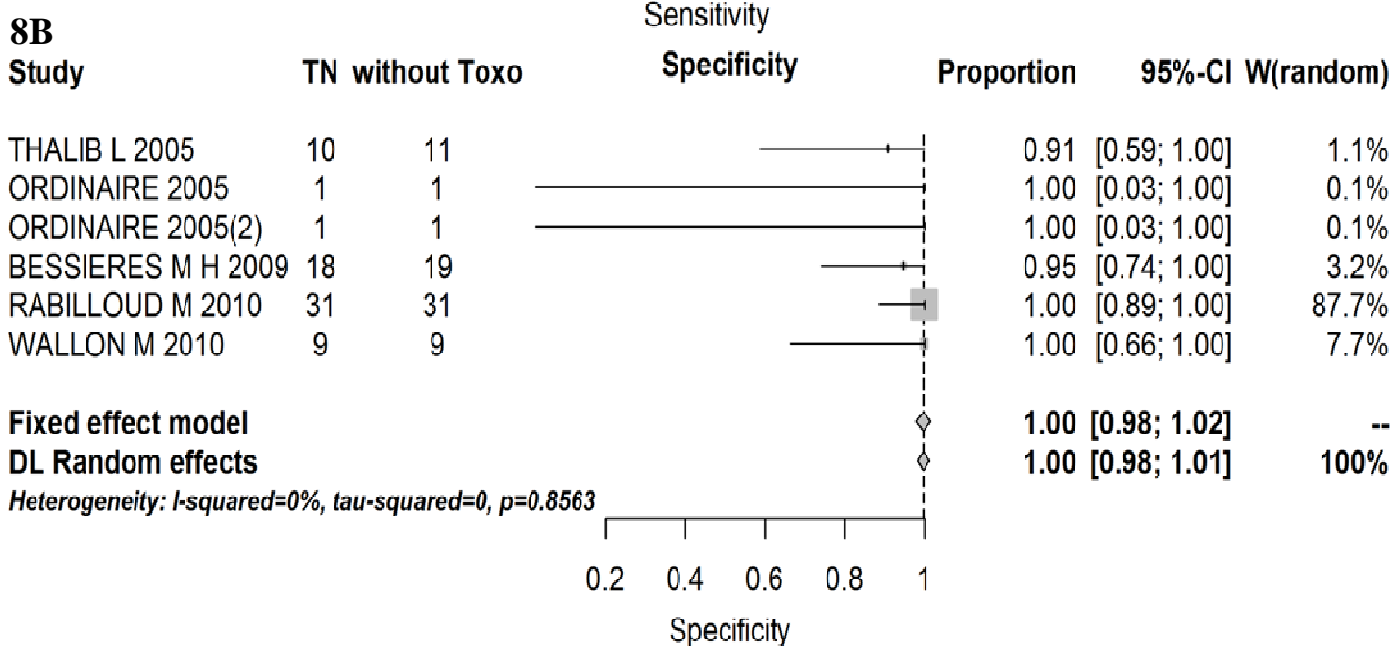
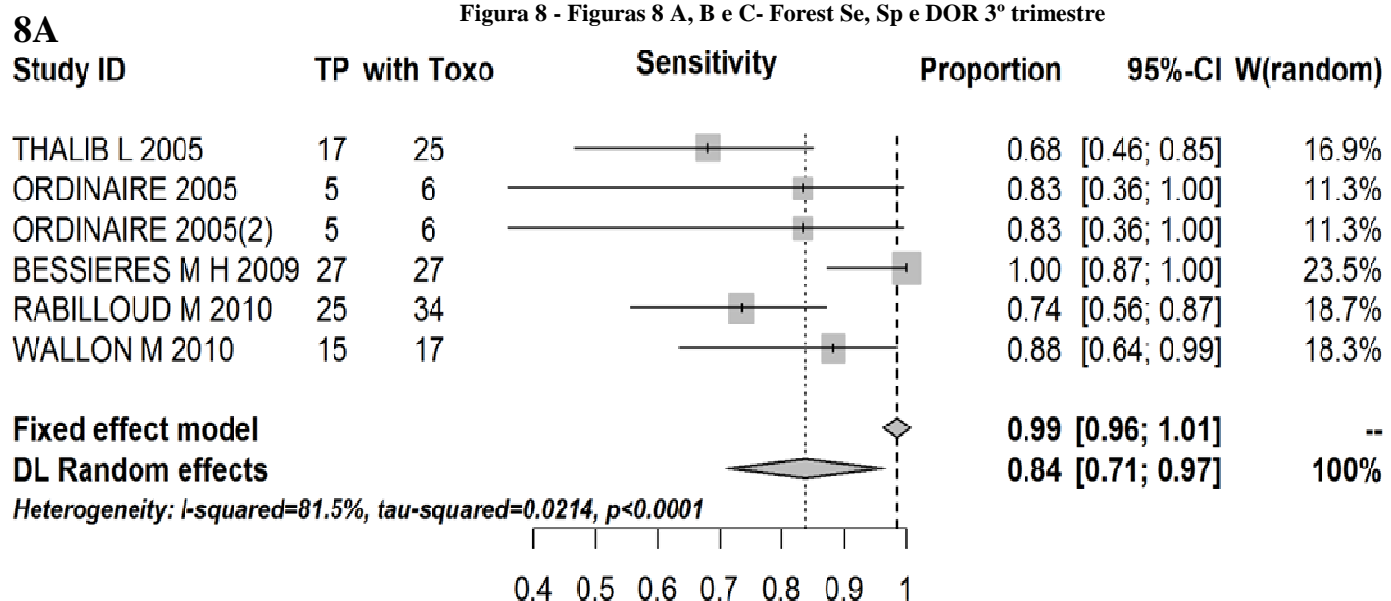


Figura 8 - Figuras 8 A, B e C- Forest Se, Sp e DOR 3º trimestre



#### 4.3.4.1 Heterogeneidade e Desempenho para Todos os Trimestres

Há alta evidência de heterogeneidade nesta metanálise, no entanto esta está concentrada na sensibilidade do teste (Tabela 4). Não houve evidência de que estratificando o desempenho do teste por trimestre de gestação reduzisse a heterogeneidade encontrada na sensibilidade, no entanto a pouca heterogeneidade encontrada na especificidade e na DOR foram reduzidas substancialmente nestes estratos, porém o reduzido número de testes estratificados por trimestres pode prejudicar a interpretação deste resultado. Dentre outras características que foram planejadas com antecedência para exploração de heterogeneidade, o tempo entre a investigação materna e a investigação do feto mostrou reduzir a heterogeneidade (Tabela 5). No entanto esta característica foi explorada somente para os dados disponíveis para todos os trimestres de gestação e não para cada um dos trimestres individualmente, dado que não há estudos suficientes nos diferentes estratos.

A sensibilidade global do teste da PCR foi de 77%, apresenta elevado grau de heterogeneidade. A especificidade global do teste foi de 98,2%. A razão de chance diagnóstica para todos os trimestres em conjunto foi 270,985 com moderada evidência de heterogeneidade (tabela 4).

#### 4.3.4.2 Sensibilidade, Especificidade e DOR em Todos os Trimestres de Acordo com o Tempo entre Diagnóstico Materno e Investigação Fetal:

A especificidade do teste variou pouco entre os estudos que realizaram a investigação fetal com mais de cinco semanas do diagnóstico materno ou menos de cinco semanas. Porém, a sensibilidade parece maior quanto menor o tempo entre o diagnóstico materno e a investigação fetal (tabela 5).

Há indício de que a sensibilidade do teste varia de acordo com o tempo representado pelos diferentes trimestres, sendo incrementada do primeiro para o último trimestre de

gestação. Há também uma redução progressiva da especificidade da DOR do primeiro para o último trimestre, numa magnitude bem menor do que a que ocorre na sensibilidade. No entanto, essas observações carecem de sustentação quanto a significância estatística e provavelmente sofrem de limitações devida a presença de heterogeneidade.

A sensibilidade sumária do teste para o primeiro trimestre de gestação foi de 56,9%. A especificidade sumária no primeiro trimestre foi de 99,2%. A estimativa da DOR para o primeiro trimestre foi de 305,2. A estimativa de sensibilidade para o segundo trimestre tende a ser maior que no trimestre anterior, 78,7%. A especificidade para o segundo trimestre foi de 97,3%. A DOR para este trimestre foi de 168,6. A estimativa de sensibilidade para o terceiro trimestre foi de 75,5%. A estimativa de especificidade no terceiro trimestre foi de 91,1%, ligeira queda em relação aos dois trimestres anteriores. A estimativa da DOR para o terceiro trimestre foi de 55,6.

As análises de viés de publicação não indicaram a sua presença, e quando houve indício de viés de publicação, este ocorreu em análises em grupo com menos de 10 estudos e com evidência considerável de heterogeneidade presente o que torna esse resultado pouco interpretável.

## 4.4 DISCUSSÃO

O diagnóstico da toxoplasmose congênita pode ser uma tarefa difícil. Os testes comumente utilizados, sorológicos e parasitológicos, possuem limitações que dificultam suas interpretações e por sua vez o diagnóstico oportuno, essencial para instituir tratamento e melhorar o prognóstico da doença.

Embora não haja consenso sobre a eficácia do tratamento prenatal,(35) um estudo observou que o tratamento prenatal dentro de quatro semanas da soroconversão reduziu o risco de lesões intracranianas comparado com o não tratamento (23), e outro mostrou que demora maior que oito semanas entre a soroconversão materna e o início do tratamento foi associado com aumento do risco de retinocoroidite durante os primeiros dois anos de vida em crianças infectadas.(24) Em uma revisão sistemática(25) conduzida para avaliar a eficácia do tratamento para toxoplasmose congênita durante a gestação, foi evidenciado uma associação entre o tratamento precoce e redução de risco de toxoplasmose congênita, sem, no entanto, reduzir os riscos de manifestações clínicas. Mesmo com o efeito do tratamento não sendo claro, há recomendações de conduzir o tratamento com antimicrobianos nas situações de infecção materna e fetal. (8) Dessa forma, é fundamental o diagnóstico com um desempenho capaz de discriminar de forma razoável os casos que merecem tratamento.

Os principais resultados a serem discutidos são: (a) os testes em geral são mal estudados, em seus relatórios a ausência de informações dificultam a interpretação dos resultados; (b) os protocolos variaram entre os estudos, não havendo entre eles protocolos iguais; (c) a heterogeneidade encontrada se concentra na sensibilidade; (d) há indício de que a sensibilidade do teste incrementa de acordo com o tempo representado pelos diferentes trimestres; (e) há indício de que a heterogeneidade se concentra nos estudos onde ocorreu maior tempo entre o diagnóstico materno e a investigação fetal.

Em nossa revisão a avaliação pelo QUADAS 2 mostrou que o risco de viés concentrou-se preferencialmente na condução dos estudos, sobretudo no que se refere ao teste índice e ao teste de referência. Observamos que não houve redução evidente do risco de viés

com o tempo de publicação, o risco foi semelhante entre os estudos mais antigos e os mais recentes, demonstrando a ausência de avanços significativos em aspectos relacionados à condução das investigações e elaboração dos relatórios nessa área, apesar de iniciativas como STARD statement (Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy). (26)

Foi observada uma variação nos protocolos dos estudos primários, desde diferentes métodos de extração do DNA, diferentes alvos de amplificação e variabilidade dos iniciadores da reação para realização da PCR. Tais diferenças podem ser fonte de variação interlaboratorial no desempenho do ensaio, dificultando qualquer comparação de dados entre as unidades que executam esse teste.

Através de um inquérito de práticas laboratoriais foi observada semelhante diversidade de protocolos de execução do teste da PCR para toxoplasmose anteriormente. (5) A discussão de como as diferenças entre os protocolos influenciam nos diferentes desempenhos do teste não é recente, porém infelizmente pode não ser somente uma questão de qualidade ou proficiência dos laboratórios. Como não há dados disponíveis a respeito de confiabilidade para esses testes a variação do desempenho pode ser devida a uma variação intrínseca das metodologias ou dependência do operador, ou seja, uma reprodutibilidade ruim. Tais problemas não são exclusivos para o diagnóstico de toxoplasmose, mas de qualquer teste molecular para parasito, bactéria ou outro agente infeccioso que não possui um teste molecular comercialmente disponível.

Possivelmente a existência de diversos protocolos passa por dois aspectos fundamentais: (a) uma questão de adaptações de um protocolo original a situações que se modificam ao longo do tempo e em diferentes localidades de acordo com os recursos disponíveis; (b) a percepção de que os testes podem ser aperfeiçoados através de modificações do protocolo.

Observamos que a heterogeneidade encontrada se concentra na sensibilidade, o que significa que as sensibilidades são tão diferentes, que muito provavelmente não representam o mesmo teste. Essa heterogeneidade que é uma medida estatística, pode representar diferenças do teste, das amostras estudadas, ou de procedimentos da investigação.

Muito se discute que a heterogeneidade é justificada pelas variações dos protocolos do teste, decorrentes da falta de padronização universal do método. Comenta-se a experiência e



habilidade técnica dentro de cada laboratório, bem como controle de qualidade e proficiência como elementos fundamentais para contornar esse problema. (5)

Apesar de nesta investigação a heterogeneidade não ter sido totalmente explicada, houve uma redução considerável da heterogeneidade na sensibilidade quando os resultados foram estratificados pelo tempo entre o diagnóstico materno e a investigação fetal. Isso indica que mais do que as diferenças entre os protocolos do teste, os protocolos clínicos e o comportamento da doença nesse período, podem ser os principais responsáveis pela diferença observada no desempenho do teste.

Eventos relevantes que podem ocorrer entre o diagnóstico materno e a investigação fetal são, por exemplo, a variação da parasitemia em diferentes períodos após a infecção inicial. É razoável imaginar uma crescente parasitemia inicial seguida de um pico e um período de parasitemia decrescente seguida de um patamar. No entanto esse comportamento é especulativo, baseado em analogias, não havendo até o momento evidência a seu respeito. Testes realizados em amostras coletadas nesses diferentes tempos da infecção podem facilitar ou dificultar a amplificação de DNA do parasito dado as diferentes quantidades iniciais desse na amostra. Ainda, em condições desfavoráveis pode ocorrer encistamento dos parasitas, o que por sua vez dificultaria a identificação de seu DNA.

Já foi sugerido que o tratamento seja instituído até três semanas após a soroconversão materna, com a intenção de reduzir a transmissão da infecção materna para o feto. (25) Ainda, alguns esquemas terapêuticos utilizados para tratar a infecção materna também possuiriam efeito na infecção fetal. Do ponto de vista clínico o início do tratamento da infecção fetal antes da investigação diagnóstica fetal pode interferir no desempenho do teste. Mas essa interferência seria homogênea se os tratamentos propostos fossem todos semelhantes ou equivalentes. Como não há informação a respeito do tratamento na maioria das investigações incluídas nessa revisão, especula-se que os tempos de início dos esquemas terapêuticos e suas posologias também são heterogêneos. Dessa forma é razoável que os diferentes esquemas terapêuticos possam interferir com diferentes intensidades na capacidade do teste em identificar sujeitos com infecção.

Nossa revisão mostrou indícios de que a sensibilidade do teste aumenta com o trimestre da gestação, apesar de carecer de significância estatística. Essa observação está de acordo com dados da literatura. (21) A menor sensibilidade do teste no primeiro trimestre

poderia ser justificada pela baixa concentração de célula fetal no líquido amniótico durante o primeiro trimestre de gestação, ou infecções com baixa carga parasitária no líquido amniótico (3)(20)(5) provavelmente pela menor permeabilidade da placenta no primeiro trimestre.

Mesmo que as possíveis explicações para esse achado sejam apenas especulações, se confirmado esse achado possui uma implicação relevante na prática da investigação diagnóstica da toxoplasmose fetal. Desta forma resultados semelhantes de testes conduzidos em diferentes tempos da gestação poderiam ter diferentes interpretações.

Outros resultados de nossa revisão foram os indícios de que a heterogeneidade se concentrou nos estudos onde a tendência central do tempo entre o diagnóstico materno e a investigação fetal era maior. O desempenho do teste foi melhor para as investigações realizadas em média até cinco semanas após o diagnóstico da infecção aguda materna em relação às investigações ocorridas em média após esse período.

Apesar de faltarem evidências suficientes avaliando o efeito do tratamento na infecção fetal, uma possível interpretação é que pode haver um efeito do tratamento materno no desempenho do teste, ou seja, quando o tratamento é instituído antes da condução da investigação diagnóstica, a carga parasitária poderia ser reduzida de tal forma a atrapalhar a identificação da presença do parasito. Raramente autores discutem uma possível interferência do tratamento no teste quando instituído antes da investigação diagnóstica e os poucos autores que comentam sobre esse assunto não observam este efeito. (11)(16) De qualquer forma, seria difícil justificar, do ponto de vista clínico, o atraso da instituição do tratamento aguardando uma investigação diagnóstica dado as potenciais consequências. Assim todos os testes realizados na prática sofrerão interferência do efeito do tratamento, cabendo agora como estudar a magnitude dessa interferência.

Uma hipótese pertinente levantada anteriormente (20) é de que as respostas imunitárias fetais e maternas possam reduzir a quantidade de parasita livre ao longo do tempo, diminuindo a sensibilidade do teste da PCR com o aumento do intervalo entre a soroconversão materna e amniocentese.

Uma limitação do estudo foi a exclusão de 17 artigos disponíveis em idiomas inacessíveis aos revisores(37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53) e três artigos não incluídos por terem seu pedido rejeitados na comutação dos textos completos por estarem

arquivados em bibliotecas internacionais, não sendo permitido cópias.(44,45,46) a ausência desses estudos poderia modificar a sensibilidade e especificidade sumárias estimadas neste trabalho. No entanto, através da leitura dos resumos, há uma expectativa de que a ausência desses trabalhos tenham pouca influência dado que a maioria incluiu amostras de poucas dezenas. Ainda é improvável que a heterogeneidade na sensibilidade seja reduzida com a inclusão desses trabalhos.

Mesmo sendo exaustivamente comentada ao longo da discussão, a heterogeneidade não totalmente explicada é uma limitação deste trabalho. A presença da heterogeneidade significa que a sensibilidade estimada não representa todos os testes incluídos, o que torna a sensibilidade geral do teste desconhecida. Apesar de identificarmos que a heterogeneidade diminui no grupo dos trabalhos que tinham a média de tempo entre o diagnóstico materno e a investigação fetal menor do que cinco semanas, esse dado não estava disponível para muitos dos estudos incluídos e há necessidade de considerar que essa informação é um dado agregado de cada estudo e não individual de cada paciente.

Foi possível verificar nesta revisão, que nenhum dos testes diagnósticos incluídos relatou uma medida de reprodutibilidade. Em geral, testes diagnósticos não comerciais ou que são muito operadores dependentes possuem maior variabilidade nas suas medidas, ou seja, uma menor reprodutibilidade. Uma questão fundamental da reprodutibilidade, é o quão variável as medidas podem ser para que os testes sejam considerados reprodutíveis. Esse conceito não é diretamente conectado com a validade do teste, mas interfere diretamente na interpretação de seus resultados. Alguns autores adotaram procedimentos mais automatizados (17,47,2) e argumentaram que a menor dependência de operadores melhora a confiabilidade do teste, no entanto sem referir que confiabilidade seria essa. Todas as revisões sistemáticas sofrem das virtudes e dos vícios da qualidade dos estudos originais incluídos. Quando estudos com qualidade aquém do desejado são incluídos, as conclusões são limitadas. Por outro lado, essa é uma evidência relevante pois, demonstra que as práticas assistenciais de pesquisas atuais são baseadas em evidências que carecem de aperfeiçoamento, e os caminhos desse aperfeiçoamento ficam mais evidentes.

Apesar das limitações de resultados em relação ao desempenho diagnóstico da PCR no líquido amniótico, há vantagens operacionais em relação aos demais métodos, quais sejam: inoculação em cobaia e cultura. Este é o método mais rápido (permitindo resultado em até quatro horas), seguro (com uma taxa de perda fetal atribuída a amniocentese de 0,13%).

Apesar dos problemas da sensibilidade da PCR identificados nesta investigação, este teste ainda é mais sensível para o diagnóstico da toxoplasmose congênita durante o pré-natal quando comparado à cultura, inoculação em combaia e sorologia em sangue fetal (9).

O seguimento clínico e sorológico da criança é a forma mais aceita e utilizada de verificar o diagnóstico definitivo de toxoplasmose congênita e descartar um diagnóstico molecular falsamente negativo ou positivo em estudos clínicos. No entanto, é razoável considerar que este pode sofrer o efeito do tratamento anti-parasitário fazendo que uma identificação correta do parasita seguida do tratamento possa incorrer em ausência de anticorpos no final do tratamento, se o mesmo de fato funcionar, incorrendo numa má classificação pelo teste de referência. Aparentemente, os autores dos textos incluídos não se preocuparam em discutir esse ponto como uma possível limitação, que em teoria reduziria tanto a sensibilidade quanto a especificidade do teste. Infelizmente, essa é uma possível limitação de qualquer estudo que utilize o seguimento como referência.

Apesar das limitações, é possível concluir com as evidências disponíveis no momento que o teste possui uma sensibilidade de 87% e especificidade de 99%, considerando se for aplicado até cinco semanas após o diagnóstico materno. Ainda, que é possível que o desempenho do teste possa ser diferenciado de acordo com o trimestre da gestação. Desta forma é possível recomendar o teste nesse período quando houver suspeita de toxoplasmose fetal. No entanto, a ausência de um teste comercial obrigará os profissionais de saúde referenciar essas pacientes para uma unidade de pesquisa capaz de executar o teste ou de tratar empiricamente sem a investigação diagnóstica.

Para futuras investigações de desempenho da PCR para toxoplasmose fetal, os seguintes aspectos deveriam ser aperfeiçoados: (a) adesão de formato dos relatórios de pesquisa a padrões recomendados, (b) discussão do quanto esquemas terapêuticos administrados antes da investigação diagnóstica impactam no desempenho do teste, (c) estimativa de confiabilidade mesmo com a utilização de métodos mais automatizados, (d) exploração de novos alvos para amplificação que sejam mais repetitivos no DNA do toxoplasma, (e) explorar como os resultados dos testes moleculares podem ser combinados com outras informações clínicas, principalmente com o tempo de gestação em que a infecção materna ocorreu.

Do ponto de vista de recurso para investigação da toxoplasmose fetal, ter a PCR como um instrumento compensa, pois as tecnologias moleculares estão progressivamente mais baratas e de simples execução, além de ser operacionalmente mais simples que os testes alternativos para o mesmo fim e em última instância seus resultados podem modificar as propostas terapêuticas das gestantes identificadas com infecção aguda.

## 4.5. CONCLUSÃO

A sensibilidade global do teste da PCR nessa revisão foi de 77% e especificidade de 98,3%, porém essas medidas apresentaram alta evidência de heterogeneidade. No subgrupo identificado com tempo médio entre a infecção materna e a investigação fetal até cinco semanas apresentou de moderada a baixa evidência de heterogeneidade com sensibilidade e especificidade de 87,4% e 99,2% respectivamente.

Pôde-se perceber que não há dois protocolos idênticos divulgados na literatura e que não há teste comercial disponível, bem como os principais pontos fracos e pontos fortes da literatura nesse tópico permitindo uma boa fundamentação para estudos com essa técnica e sua implantação na rotina clínica.

#### 4.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO ARTIGO

1. Vauloup-Fellous C, Bouthry E, Grangeot-Keros L. Infections transmitted from the mother to the fetus: diagnostic issues and management of pregnancy. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2013;71:5-18.
2. Wallon M, Franck J, Thulliez P, Huissoud C, Peyron F, Garcia-Meric P, et al. Accuracy of real-time polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid. *Obstet Gynecol*. 2010;115(4):727–33.
3. Bastien P. Molecular diagnosis of toxoplasmosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2002;96 Suppl 1:S205–215–S205–215.
4. Hohlfeld P, Daffos F, Costa JM, Thulliez P, Forestier F, Vidaud M. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase-chain-reaction test on amniotic fluid. *N Engl J Med*. 1994;331(11):695–9.
5. Sterkers Y, Varlet-Marie E, Marty P, Bastien P. Diversity and evolution of methods and practices for the molecular diagnosis of congenital toxoplasmosis in France: A 4-year survey. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(10):1594–602.
6. Lopes-Mori FM, Mitsuka-Breganó R, Capobiango JD, Inoue IT, Reiche EM, Morimoto HK, Casella AM, Bittencourt LH, Freire RL, Navarro IT. Programs for control of congenital toxoplasmosis. *Rev Assoc Med Bras*. 2011;57(5):594-9.
7. McLeod R, Kieffer F, Sautter M, Hosten T, Pelloux H. Why prevent, diagnose and treat congenital toxoplasmosis? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(2):320–44.
8. Wallon M, Peyron F, Cornu C, Vinault S, Abrahamowicz M, Kopp CB, Binquet C. Congenital toxoplasma infection: monthly prenatal screening decreases transmission rate and improves clinical outcome at age 3 years. *Clin Infect Dis*. 2013 May;56(9):1223-31.
9. Valériane Leroy, Jérôme Harambat, Paul Perez, Christoph Rudin, Eskild Petersen, for the Eurotox Group (Panel 3). Performances of tests involved in screening and diagnosing of acute maternal toxoplasmosis during pregnancy and congenital infection. A systematic review, 1985-2005 (The Scientific Secretariat of the Eurotox initiative 2005). Bordeaux (France): The Eurotox Group; 2006.74p.
10. Dupouycamet J, Bougnoux ME, Desouza SL, Thulliez P, Dommergues M, Mandelbrot L, et al. Comparative Value of Polymerase Chain-Reaction and Conventional Biological Tests for the Prenatal-Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis. *Ann Biol Clin (Paris)*. 1992;50(5):315–9.
11. Foulon W, Pinon JM, Stray-Pedersen B, Pollak A, Lappalainen M, Decoster A, et al. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: a multicenter evaluation of different diagnostic parameters. *Am J Obstet Gynecol*. 1999;181(4):843–7.
12. Kompalic-Cristo A, Nogueira SA, Guedes AL, Frota C, González LF, Brandão A, Amendoeira MR, Britto C, Fernandes O. Lack of technical specificity in the molecular diagnosis of toxoplasmosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2004;98(2):92-5.
13. Remington, JS.; McLeod, R.; Thulliez, P.; Desmonts, G. Toxoplasmosis. In: Remington, J.; Klein, G.; Wilson, C.; Baker, C., editors. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. Vol. 6th ed.. Philadelphia: WB Saunders; 2006. p. 947-1091.

14. Burg JL, Grover CM, Pouletty P, Boothroyd JC. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1989;27:1787–92.
15. Bastien P, Procop GW, Reischl U. Quantitative Real-Time PCR is Not More Sensitive than “Conventional” PCR. *J Clin Microbiol.* 2008;46(6):1897–900.
16. Romand S, Wallon M, Franck J, Thulliez P, Peyron F, Dumon H. Prenatal diagnosis using polymerase chain reaction on amniotic fluid for congenital toxoplasmosis. *Obstet Gynecol.* 2001;97(2):296–300.
17. Ordinaire I, Simon A, Fréalle E, Soula F, Valat AS, Rouland V, et al. Real-time quantitative PCR for toxoplasmosis diagnosis. *Ann Biol Clin (Paris).* 2005 Jan- Feb;63(1):67-73.
18. Whiting PF, Rutjes AW, Westwood ME, Mallett S, Deeks JJ, Reitsma JB, Leeflang MM, Sterne JA, Bossuyt PM; QUADAS-2 Group. QUADAS-2: a revised tool for the quality assessment of diagnostic accuracy studies. *Ann Intern Med.* 2011 Oct18;155(8):529-36.
19. The R Project for Statistical Computing [homepage internet, access in May 29th, 2013]. Available in : <http://www.r-project.org>.
20. Thalib L, Gras L, Romand S, Prusa A, Bessieres MH, Petersen E, Gilbert RE. Prediction of congenital toxoplasmosis by polymerase chain reaction analysis of amniotic fluid. *BJOG Int J Obstet Gynaecol.* 2005;112(5):567-74.
21. Rabilloud M, Wallon M, Peyron F. In utero and at birth diagnosis of congenital toxoplasmosis: use of likelihood ratios for clinical management. *Pediatr Infect J.* 2010;29(5):421–5
22. Andrade GMQ, Carvalho AL, Carvalho IR, Mello BF, Tibúrcio FR, Castro FC. Toxoplasmosis in pregnant and newborn infant – A study of 86 mother-infant pairs attended from 1996 to 1999 at the ambulatory of pediatric infectology of HC-UFMG. *Ver. Med Minas Gerais* 2001;11(4):202-207.
23. Antsaklis A, Daskalakis G, Papantoniou N, Mentis A, Michalakis S. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Prenatal Diagnosis* 2002; 22:1107-1111.
24. Bessières MH, Cassaing S, et al. Value of polymerase chain reaction test on amniotic fluid for the prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Immuno-analyse and biologie* 2002;17(6):358-362.
25. Bessieres MH, Berrebi A, Cassaing S, Fillaux J, Cambus JP, Berry A, et al. Diagnosis of congenital toxoplasmosis: prenatal and neonatal evaluation of methods used in Toulouse University Hospital and incidence of congenital toxoplasmosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104(2):389–92.
26. Castro FC, Castro MJ, Cabral AC, Filho GB, Vitor RW, Lana AM, Andrade GM. A comparison between methods for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Ver Bras Ginecol Obstet.* 2001; 23(5):277-282.
27. Cazenave J, Forestier F, Bessieres MH, Broussin B, Begueret J. Contribution of a new PCR assay to the prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Prenatal Diagnosis* 1992;12:119-127.
28. Figueiró-Filho EA, Lopes AH, Senefonte FR, Junior VG, Botelho CA, Figueiredo MS, Duarte G. Acute toxoplasmosis: study of the frequency, vertical transmission rate and the



relationship between maternal-fetal diagnostic tests during pregnancy in a Central-Western state of Brazil. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2005;27(8):442-9.

29. Gangneux FR, Gavinet MF, Ancelle T, Raymond J, Touerte-Schaefer C, Dupoy-Camet J. Value of prenatal diagnosis and early postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: retrospective study of 110 cases. *Journal of Clinical Microbiology.* 1999;37(9):2893-2898.

30. Jenum PA, Holberg-Petersen M, Melby KK, Stray-Pedersen B. Diagnosis of congenital *Toxoplasma gondii* infection by polymerase chain reaction (PCR) on amniotic fluid samples. *APMIS.* 1998;106(7):680-686.

31. Vidigal PV, Santos DV, Castro FC, Couto JC, Vitor RW, Filho GB. Prenatal toxoplasmosis diagnosis from amniotic fluid by PCR. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2002;35(1):1-6.

32. Baquero-Artigao F, Castillo Martín F, Corripio FI, Mellgren AG, Guasch CF, Fernández-Miranda MC, et al. Guia de La Sociedad Española de Infectología Pediátrica para el diagnóstico y tratamiento de La toxoplasmosis congénita. *An Pediatría.* 2013;79(2):116.e1–116.e16.

33. Gras L WM, Pollak A, Cortina-Borja M, Evengard B, Hayde M, Petersen E, Gilbert R; European Multicenter Study on Congenital Toxoplasmosis. Association between prenatal treatment and clinical manifestations of congenital toxoplasmosis in infancy: a cohort study in 13 European centres. *Acta Paediatr.* 2005;94(12):1721–31.

34. Kieffer F, Wallon M, Garcia P, Thulliez P, Peyron F, Franck J. Risk factors for retinochoroiditis during the first 2 years of life in infants with treated congenital toxoplasmosis. *Pediatr Infect Dis J.* 2008 Jan;27(1):27-32.

35. Thiébaud R LS, Chêne G, Gilbert R. Effectiveness of prenatal treatment for congenital toxoplasmosis: a meta-analysis of individual patients' data. *Lancet.* 2007;369(9556):115–22.

36. Bossuyt PM RJ, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig LM, Moher D, Rennie D, de Vet HC, Lijmer JG; The STARD statement for reporting studies of diagnostic accuracy: explanation and elaboration. *Clin Chem.* 2003;49(1):7–18.

37. Cao Y, Qiu L, Zhang Q. Study on the relationship between the history of abnormal pregnancy and TORCH infection in pregnant woman. *Zhonghua Fu Chan KeZaZhi.* 1999;34(9):517–20.

38. Cermakova Z, Pliskova L, Prasil P, Ryskova O. Method of polymerase chain reaction in toxoplasmosis diagnosis. *Acta Medica Hradec Kralove Suppl.* 2004;47(2):71–3.

39. Czuba B, Pendzich J, Gola J, Mazurek U, Sławska H, Kamiński K, Wilczok T. Prenatal diagnostics of *Toxoplasma gondii* invasion by quantitative method of PCR- TaqMann. *Wiad Parazytol.* 2001;47 Suppl 1:91-7.

40. Geerts I, Van Ranst M, Lagrou K. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: Role of PCR on amniotic fluid. *Prenat Diagn Van Congenitale Toxoplasmosse Rol Van PCR Op Amnionvocht.* 2008;64(18):920–6.

41. Gołab E, Nowakowska D, Waloch M, Dzbeński TH, Szaflik K, Wilczyński J. Detection of congenital toxoplasmosis in utero with a polymerase chain reaction on amniotic fluid]. *Wiad Parazytol.* 2002;48(3):311-5.

42. Gola J, Czuba B, Mazurek U, Sławska H, Kamiński K, Wilczok T. Usefulness of quantitative assessment of *Toxoplasma gondii* genome using PCR-TaqMan in amniotic fluid,

maternal and neonatal blood in selected complications in pregnancy. *Ginekol Pol.* 2000 Sep;71(9):954-8.

43. Golab E. Use of polymerase chain reaction (PCR) for diagnosis of toxoplasmosis]. *Med Dosw Mikrobiol.* 1996;48(3-4):189-96.

44. Knerer B, Hayde M, Gratzl R, Strobl W, Pollak A. Direct detection of *Toxoplasma gondii* with polymerase chain reaction in diagnosis of fetal toxoplasma infection]. *Wien Klin Wochenschr.* 1995;107(4):137-40.

45. Li S, Ding Z, Liang Y. A preliminary study on the antenatal diagnosis and prevention of the fetus toxoplasmosis infection. *Zhonghua Fu Chan KeZaZhi.* 1995;30(4):200-2.

46. Ma YY, Mu RL, Wang LY, Jiang S. Study on prenatal diagnosis using fluorescence quantitative polymerase chain reaction for congenital toxoplasmosis . *Zhonghua Fu Chan KeZaZhi.* 2003;38(1):8-10.

47. Nagy B, Bán Z, Beke A, Csaba A, Joó JG, Váradi J, et al. Detection of *Toxoplasma gondii* from amniotic fluid by fluorescent PCR and DNA fragment analysis. *Magyar Noorvosok Lapja.* 2005;68(2):95-100.

48. Sławska H, Pendzich J, Czuba B, Mazurek U, Gola J, Wilczok T, Kamiński K. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA by PCR in mother's blood, amniotic fluid and child's blood in selected cases of pathological pregnancy. *Wiad Parazytol.* 2001;47 Suppl 1:99-105.

49. Sławska H, Czuba B, Gola J, Mazurek U, Wloch A, Wilczok T, et al. Diagnostic difficulties of *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women. Is it possible to explain doubts by polymerase chain reaction? *Ginekol Pol.* 2005;76(7):536-42.

50. Szenborn L. Significance of diagnostics and treatment in preventing congenital infections with *Toxoplasma gondii* (Tg), cytomegalovirus (CMV) and parvovirus B19 (PVB19)]. *PrzegLek.* 2010;67(1):54-7.

51. Tuma W, Weber E, Hassl A, Bungler G, Niebecker A, Maass G, et al. Detection of *Toxoplasma gondii* nucleic acid in pregnancy. *Journal of Laboratory Medicine.* 1994;18(11):512-6.

52. Xia AD, Wang KM, Dong TZ, Zhang HM, Wu ZP, Yang HZ, et al. Diagnosis of toxoplasmosis by polymerase chain reaction. *Zhongguo Ji Sheng Chong XueYu Ji Sheng Chong Bing ZaZhi.* 1992;10(3):171-5.

53. Prášil P, Čermáková Z, Plíšek S. The significance of the dynamics of serological and PCR diagnostic data for the likelihood of congenital toxoplasmosis in children born to toxoplasma seropositive mothers. *Czech-Slovak Pediatrics.* 2010;65(7- 8):432-40.

54. Favero A, Marchetti D, Tasca A, Ghirardelli M. Second level laboratory diagnosis for toxoplasma infection during pregnancy. *Diagn Lab Secondo Livello Infez Toxoplasmica Gravidanza.* 1997;12(3):459-64.

55. Eida OM, Eida MM, Ahmed AB. Evaluation of polymerase chain reaction on amniotic fluid for diagnosis of congenital toxoplasmosis. *J Egypt Soc Parasitol.* 2009;39(2):541- 50.

56. Nagaty IM, Ibrahim KM, Abdel-Tawab AH, Hassan AE. Diagnosis of *Toxoplasma gondii* by ELISA and PCR in mothers and their infants. *J Egypt Soc Parasitol.* 2009;39(2):625-32.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA DISSERTAÇÃO

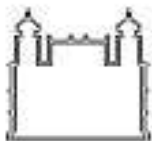
1. Bastien P. Molecular diagnosis of toxoplasmosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96 Suppl 1:S205–215–S205–215.
2. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* 2000; 30(12-13):1217-58.
3. Abdul-Ghani R. Polymerase chain reaction in the diagnosis of congenital toxoplasmosis: more than two decades of development and evaluation. *Parasitol Res* 2011; 108:505-512.
4. Dubey JP. The History of *Toxoplasma gondii* – The first 100 years. *J Eucaryot Microbiol* 2008; 55(6):467-475.
5. SPLENDORE, A. Un nuovo protozoa parassita dei conigli incontrato nelle lesione anatomiche d'una malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo. Nota preliminare. *Revista da Sociedade Scientifica de São Paulo* 1908; 3: 109 –112.
6. Peyron F. When are we going to celebrate the centenary of the Discovery of efficient treatment for congenital toxoplasmosis? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104(2):316-319.
7. Wolf A, Cowen D. Granulomatous encephalomyelitis due to an encephalitozoon (encephalitozic encephalomyelitis): a new protozoan disease of man. *Bull Neurol Inst NY* 1937; 6:306-335
8. Ferguson DJP. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104(2):133-148.
9. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* 2000; 30: 1217-1258.
10. Dubey JP, Miller NL, Frenkel JK. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. *J Exp Med* 1970; 132: 636-662.
11. Dubey, J. P. Toxoplasmosis – A Waterborne Zoonosis. *Veterinary Parasitology* 2004; 126: 57 – 72.
12. Montoya, J. G. & Liesenfeld, O. Toxoplasmosis. *Lancet* 2004; 363: 1965 – 1976.
13. Lund E, Lycke E, Sourander P. A cinematographic study of *Toxoplasma gondii* in cell cultures. *Br J Exp Pathol* 1961; 42: 357-362.
14. Dubey, J. P. & SU, C. Population biology of *Toxoplasma gondii* : what's out and where did they come from. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2009; 104(2), 190 – 195.
15. Petersen E. Toxoplasmosis. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* 2007; 12:214-223.

16. Goldstein EJC, Montoya JG, Remington JS. Management of *Toxoplasma Gondi* Infection During Pregnancy. *Clin Infect Dis* 2008; 47(4):554–66.
17. Remington, JS, McLeod R, Thulliez P, Desmonts G. Toxoplasmosis. In: Remington, J.; Klein, G.; Wilson, C.; Baker, C., editors. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. Vol. 6th ed.. Philadelphia: WB Saunders; 2006. p.947-1091.
18. Daffos F, Forestier F, Capella-Pavlovsky M, Thulliez P, Aufrant C, Valenti D, Cox WL. Prenatal management of 746 pregnancies at risk for congenital toxoplasmosis. *N Engl J Med* 1988; 318:271-275.
19. Hohlfeld P, Daffos F, Costa JM, Thulliez P, Forestier F, Vidaud M. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase-chain-reaction test on amniotic fluid. *N Engl J Med* 1994; 331(11):695–9.
20. Desmonts G, Couvreur J. Toxoplasmosis in pregnancy and its transmission to the fetus. *Bull NY Acad Med* 1974; 50:146-159.
21. Montoya JG, Rosso F. Diagnosis and management of toxoplasmosis. *Clin Perinatol* 2005; 32: 705-276.
22. ELSHEIKHA, H. M. Congenital Toxoplasmosis: Priorities For Further Health Promotion Action. *Public Health* 2008; 122: 335 – 353.
23. Camargo Neto E, Anele E, Rubim R, Brites A, Schult J, Becker D, Tuuminen T. High prevalence of congenital toxoplasmosis in Brazil estimated in a 3-year prospective neonatal screening study. *Int J Epidemiol* 2000; 29 (5): 941-947.
24. Oliveira LM, Jones JL, Azevedo-Silva J, Alves CC, Orefice F, Addiss DG. Highly endemic, waterborn toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2003. 9:55-62.
25. Hedman K, Lappalainen M, Seppala I, Makela O. Recent primary *Toxoplasma* infection indicated by a low avidity of specific IgG. *J Infect Dis* 1989; 159:736-739.
26. Montoya JG, Huffman HB, Remington JS. Evaluation of the immunoglobulin G avidity test for diagnosis of toxoplasmic lymphadenopathy. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4627-4631.
27. Valérie Leroy, Jérôme Harambat, Paul Perez, Christoph Rudin, Eskild Petersen, for the Eurotox Group (Panel 3). Performances of tests involved in screening and diagnosing of acute maternal toxoplasmosis during pregnancy and congenital infection. A systematic review, 1985-2005 (The Scientific Secretariat of the Eurotox initiative 2005). Bordeaux (France): The Eurotox Group; 2006.74p.
28. Dupouycamet J, Bognoux ME, Desouza SL, Thulliez P, Dommergues M, Mandelbrot L, et al. Comparative Value of Polymerase Chain-Reaction and Conventional Biological Tests for the Prenatal-Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis. *Ann Biol Clin (Paris)* 1992; 50(5):315–9.

29. Foulon W, Pinon JM, Stray-Pedersen B, Pollak A, Lappalainen M, Decoster A, et al. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: a multicenter evaluation of different diagnostic parameters. *Am J Obstet Gynecol* 1999;181(4):843-847.
30. Hitt JÁ, Filice GA. Detection of *Toxoplasma gondii* parasitemia by gene amplification, cell culture, and mouse inoculation. *J Clin Microbiol* 1992; 30(12):3181-3184.
31. James GS et al. Comparison of cell culture, mouse inoculation, and PCR for detection of *Toxoplasma gondii*: effects of storage conditions on sensitivity. *J Clin Microbiol* 1996; 34(6): 1572-1575.
32. KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155:335-350.
33. Mullins KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 1990; 262: 56-65.
34. Yang S, Rothman R. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations and future applications in acute-care settings. *Lancet* 2004; 4: 337-348.
35. Burg JL, Grover CM, Pouletty P, Boothroyd JC. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1989; 27:1787-92.
36. Bastien P, Procop GW, Reischl U. Quantitative Real-Time PCR is Not More Sensitive than “Conventional” PCR. *J Clin Microbiol*. 2008; 46(6):1897-900.
37. Loeffler JK, Schmidt, H Hebart, U. Schumacher, H. Einsele. Automated extraction of genomic DNA from medically important yeast species and filamentous fungi by using the MagNAPure LC system. *J Clin Microbiol* 2002; 40:2240-2243.
38. Peyron F, Wallon M, Liou C, Garner P. Treatments for toxoplasmosis in pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev* 2000; 2: CD001684.
39. Thiébaud R, Leproust S, Chene G, Gilbert R. Effectiveness of prenatal treatment for congenital toxoplasmosis: a meta-analysis of individual patients’ data. *Lancet* 2007; 369:115-122.
40. McLeod R, Kieffer F, Sautter M, Hosten T, Pelloux H. Why prevent, diagnose and treat congenital toxoplasmosis? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104(2): 320-344.

## ANEXOS

## ANEXO - FORMULÁRIO PARA EXTRAÇÃO DE DADOS



Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ  
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS



### REVISÃO SISTEMÁTICA DO DESEMPENHO NO LÍQUIDO AMNIÓTICO PARA DIAGNÓSTICO DE TOXOPLASMOSE CONGÊNITA

1. Número Identificador:

--	--	--	--	--

2. Nome do revisor:

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

3. Data da avaliação:

		/			/				
--	--	---	--	--	---	--	--	--	--

4. Nome do primeiro autor (último e iniciais):

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

5. Ano de publicação:

--	--	--	--

6. Periódico:

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

7. Volume:

--	--	--	--	--

8. Número:

--	--	--	--	--

9. Página (primeira):

--	--	--	--	--

10. Este estudo aborda gestantes que apresentam suspeita de toxoplasmose aguda durante a gestação?  
 Sim  Não  Sem informação

11. Este estudo avalia a acurácia no líquido amniótico?  
 Sim  Não  Sem informação

12. Este estudo apresenta as medidas de resultado, sensibilidade, especificidade, valores preditivos?  
 Sim  Não  Sem informação

13. Este estudo compara o resultado do teste da PCR com um teste de referência?  
 Sim  Não  Sem informação

14. Este estudo está escrito em Português, Inglês, Francês, Espanhol ou Italiano?  
 Sim  Não  Sem informação

15. Este estudo foi incluído para extração de dados do texto completo?  
 Sim  Não  Sem informação

#### Seção 3: Avaliação de risco de viés pelo QUADAS 2

##### Quanto à seleção de pacientes

##### A. Risco de Viés

16. A amostra de pacientes foi consecutiva ou randomizada?

Sim  Não  Não está claro

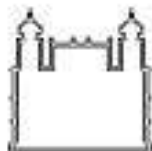
17. Um desenho de caso-controle foi evitado?

Sim  Não  Não está claro

18. O estudo evitou exclusões inapropriadas?

Sim  Não  Não está claro





Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ  
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS



REVISÃO SISTEMÁTICA DO DESEMPENHO NO LÍQUIDO AMNIÓTICO PARA  
DIAGNÓSTICO DE TOXOPLASMOSE CONGÊNITA

1. Número Identificador:

--	--	--	--

19 Qual o risco da seleção de pacientes ter introduzido viés?

Alto  Baixo  Não está claro

B. Preocupação quanto a aplicabilidade.

20 Existe a preocupação de que os pacientes incluídos não correspondam à pergunta da revisão?

Alto  Baixo  Não está claro

Quanto ao teste índice

A. Risco de Viés

21 O resultado do teste índice foi interpretado sem o conhecimento do resultado do teste de referência?

Sim  Não  Não está claro

22 Se um limite decisão (cutoff) foi usado, ele foi pré-especificado?

Sim  Não  Não está claro

23 Qual o risco da condução ou interpretação do teste índice poder ter introduzido viés?

Alto  Baixo  Não está claro

B. Preocupação quanto à aplicabilidade.

24 Existe a preocupação de que o teste índice, sua condução, sua interpretação, sejam diferentes da questão da revisão?

Alto  Baixo  Não está claro

Quanto ao teste de referência

A. Risco de Viés

25 O teste de referência padrão classifica corretamente a condição de interesse?

Sim  Não  Não está claro

26 O resultado do teste de referência foi interpretado sem o conhecimento do resultado do teste índice?

Sim  Não  Não está claro

27 Qual o risco da condução ou interpretação do teste de referência ter introduzido viés?

Alto  Baixo  Não está claro

B. Preocupação quanto à aplicabilidade.

28 Existe a preocupação de que a condição de interesse, tal como definido pelo teste de referência não corresponda à questão da revisão?

Alto  Baixo  Não está claro

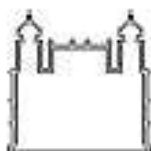
Quanto ao fluxo de pacientes e tempo

A. Risco de Viés

29 Houve um intervalo de tempo apropriado entre o teste índice e o teste de referência?

Sim  Não  Não está claro





Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ  
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS



REVISÃO SISTEMÁTICA DO DESEMPENHO NO LÍQUIDO AMNIÓTICO PARA  
DIAGNÓSTICO DE TOXOPLASMOSE CONGÊNITA

1. Número Identificador:

--	--	--	--

30 Todos os pacientes foram submetidos a um teste de referência?

Sim  Não  Não está claro

31 Todos os pacientes foram submetidos ao mesmo teste de referência?

Sim  Não  Não está claro

32 Todos os pacientes foram incluídos na análise?

Sim  Não  Não está claro

33 Qual o risco do fluxo de pacientes ter introduzido viés?

Alto  Baixo  Não está claro

Seção 4: Características do estudo ou da amostra

34 Este estudo é multicêntrico?

Sim  Não  Não está claro

35 Nacionalidade dos voluntários ou país em que a investigação foi conduzida:

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

36 Idade média ou mediana das gestantes voluntárias da amostra?   anos

37a Proporção de gestantes no primeiro trimestre ao diagnóstico da toxoplasmose aguda materna:   %

37b Proporção de gestantes no segundo trimestre ao diagnóstico da toxoplasmose aguda materna:   %

37c Proporção de gestantes no terceiro trimestre ao diagnóstico da toxoplasmose aguda materna:   %

38 Qual a idade gestacional média da infecção aguda materna?   ,  semanas

39 Foi explícita a apreciação da investigação por comitê de ética em pesquisa?

Sim  Não  Sem informação

40 Tempo médio/mediano em semanas entre diagnóstico da infecção materna e a investigação fetal:   semanas

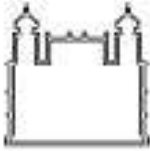
41 Proporção de gestantes que receberam tratamento para toxoplasmose antes da investigação fetal:   %

42 Tempo médio/mediano entre início do tratamento para toxoplasmose e investigação fetal.   semanas

43 Há evidência de que o tratamento prévio da gestante influenciou no resultado do teste indice?

Sim  Não  Sem informação





Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ  
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS



REVISÃO SISTEMÁTICA DO DESEMPENHO NO LÍQUIDO AMNIÓTICO PARA  
DIAGNÓSTICO DE TOXOPLASMOSE CONGÊNITA

1. Número Identificador:

--	--	--	--

- 44 Proporção de diagnóstico da infecção aguda materna por IgM: 

--	--	--
- 45 Proporção de diagnóstico da infecção aguda materna por teste de avidez: 

--	--	--
- 46 Proporção de diagnóstico da infecção aguda materna por US fetal: 

--	--	--
- 47 Proporção de diagnóstico da infecção aguda materna por PCR: 

--	--	--
- 48 Proporção de diagnóstico da infecção aguda materna por quadro clínico: 

--	--	--
- 49 Estudo com gestantes infectadas com HIV:  Sim  Não  Sem informação
- 50 Proporção de gestantes infectadas com HIV na amostra: 

--	--	--

Seção 5: Dados do teste

- 51 Teste in-house?  Sim  Não  Sem informação
- 52 Nome do teste se comercial: 

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
- 53 Fabricante do teste comercial:  Sim  Não  Sem informação
- 53a Nome do fabricante do teste comercial: 

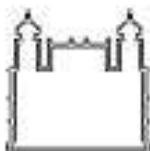
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
- 54 PCR qualitativo/quantitativo:  Qualitativo  Quantitativo
- 55 Nome da sonda ou iniciador ou primer: 

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
- 56 Região amplificada: 

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
- 57 Limite de detecção informado ou sensibilidade analítica: 

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
- 58 Ponto de corte utilizado no teste, se quantitativo: 

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
- 59 Amostra biológica utilizada:  
 Líquido Amniótico



REVISÃO SISTEMÁTICA DO DESEMPENHO NO LÍQUIDO AMNIÓTICO PARA  
DIAGNÓSTICO DE TOXOPLASMAMOSE CONGÊNITA

1. Número Identificador:

--	--	--	--

60 Este trabalho propõe um modelo de predição?

- Sim  Não  Sem informação

61 Teste utilizado como referência:

- Seguimento  
 Inoculação  
 Placenta  
 Outros

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

62 Tamanho da amostra estudada: 

--	--	--	--	--

62a Verdadeiro positivo: 

--	--	--

62c Falso positivo: 

--	--	--

62b Falso negativo: 

--	--	--

62d Verdadeiro negativo: 

--	--	--

63 Tamanho da amostra estudada no primeiro trimestre: 

--	--	--	--	--

63a Verdadeiro positivo: 

--	--	--

63c Falso positivo: 

--	--	--

63b Falso negativo: 

--	--	--

63d Verdadeiro negativo: 

--	--	--

64 Tamanho da amostra estudada no segundo trimestre: 

--	--	--	--	--

64a Verdadeiro positivo: 

--	--	--

64c Falso positivo: 

--	--	--

64b Falso negativo: 

--	--	--

64d Verdadeiro negativo: 

--	--	--

65 Tamanho da amostra estudada no terceiro trimestre: 

--	--	--	--	--

65a Verdadeiro positivo: 

--	--	--

65c Falso positivo: 

--	--	--

65b Falso negativo: 

--	--	--

65d Verdadeiro negativo: 

--	--	--

