

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EPIDEMIOLOGIA**



TESE DE DOUTORADO

**PREVALÊNCIA DE TOXOPLASMOSE AGUDA EM
GESTANTES, INCIDÊNCIA DE TOXOPLASMOSE
CONGÊNITA E DESEMPENHO DE TESTES DIAGNÓSTICOS
EM TOXOPLASMOSE CONGÊNITA**

IVANA ROSÂNGELA DOS SANTOS VARELLA

Orientador: Prof. Dr. Mário Bernardes Wagner

Porto Alegre, abril de 2007

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EPIDEMIOLOGIA**



TESE DE DOUTORADO

**PREVALÊNCIA DE TOXOPLASMOSE AGUDA EM
GESTANTES, INCIDÊNCIA DE TOXOPLASMOSE
CONGÊNITA E DESEMPENHO DE TESTES DIAGNÓSTICOS
EM TOXOPLASMOSE CONGÊNITA**

IVANA ROSÂNGELA DOS SANTOS VARELLA

Orientador: Prof. Dr. Mário Bernardes Wagner

A apresentação desta tese é exigência do Programa de Pós-graduação em Medicina: Epidemiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Doutor.

Porto Alegre, Brasil
2007

V293p Varella, Ivana Rosângela dos Santos
Prevalência de toxoplasmose aguda em gestantes,
Incidência de toxoplasmose congênita e desempenho
de testes diagnósticos em toxoplasmose congênita/
Ivana Rosângela dos Santos Varella. - 2007.
206 f. ; 30 cm.

Tese de doutorado (Pós-graduação em Epidemiologia)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre,
2007.

Orientação: Prof. Dr. Mário Bernardes Wagner.

1. Toxoplasmose Congênita-Diagnóstico-Transmissão
Vertical. I. Título.

CDU 618.3-008.6(043.3)

Catálogo elaborado por Izabel A. Merlo, CRB 10/329.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Airton Stein, Programa de Pós-graduação em Epidemiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Prof. Dr. Jair Ferreira, Programa de Pós-graduação em Epidemiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Prof. Dr. José Geraldo Lopes Ramos, Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Prof.^a Dr.^a Mary Clarisse Bozzetti, Programa de Pós-graduação em Epidemiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Prof. Dr. Ricardo Kuchenbecker, Coordenador do Serviço de Controle de Infecção Hospitalar do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Dedico esta tese às crianças que participaram do estudo e aos pais dos bebês com toxoplasmose congênita, que demonstraram tanta paciência e dedicação, superando dificuldades ao longo do tratamento dos seus filhos...

“Things that really count cannot be counted”

Enkin's and Chalmer's

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Rudi Nei e Ivone, exemplos de uma base sólida para alcançarmos os objetivos;

Ao meu esposo, Miguel Varella, pelo apoio e compreensão nos momentos mais difíceis;

À Alethea e Livia Varella, filhas amadas, que me permitiram crescer sem culpas;

À Inelva Miotto, amiga e assistente social do Hospital da Criança Conceição, que auxiliou na busca de pacientes que não retornaram para o seguimento, e que sem isso inviabilizaria o estudo;

À Ivete Cristina Teixeira Canti, uma parceria constante nesta pesquisa;

À Regina Westhele Müller, Célia Magalhães e Carlos Humberto Bianchi e Silva, parceiros em tantos projetos e por assumirem responsabilidades em momentos em que estive ausente;

Aos médicos residentes do Programa de Residência Médica em Pediatria do Hospital da Criança Conceição, aos colegas pediatras da Unidade Neonatal e Alojamento Conjunto do Hospital Nossa Senhora da Conceição, que me estimulam a buscar novos conhecimentos, a cada dia;

À equipe da Unidade de Prevenção da Transmissão Vertical do HNSC, e ao Dr Breno Riegel Santos, por oportunizarem a prática da Epidemiologia;

À Izabel Merlo e sua equipe do Centro de Documentação do GHC, pelo incansável e competente auxílio.

À Gerência de Ensino e Pesquisa do GHC, especialmente ao Dr Alexandre Moretto, que incentivou o desenvolvimento de projetos de pesquisa no GHC.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia, UFRGS, que contribuíram muito com meu aprendizado ao longo destes anos;

Ao Prof. Mário Wagner, a quem eu especialmente admiro pela competência em ensinar e orientar e que me concedeu a honra de ser a sua primeira orientanda da Epidemiologia.

SUMÁRIO

Abreviaturas e Siglas	11
Resumo.....	13
Abstract	17
Lista de Quadros	21
Lista de Tabelas	22
Lista de Figuras	24
1 APRESENTAÇÃO.....	25
2 INTRODUÇÃO.....	26
3 JUSTIFICATIVA	29
4 REVISÃO DA LITERATURA	32
4.1 O organismo	32
4.2 O ciclo de vida do <i>Toxoplasma gondii</i>	33
4.3 Transmissão (Etiologia).....	36
4.4 Transmissão Vertical (Etiologia).....	38
4.5 Rastreamento sorológico na gestação e avaliação de custo-efetividade	47
4.6 Métodos diagnósticos na gestante e no feto	51
4.7 Frequências de infecção pelo <i>T. gondii</i> em recém-nascidos	56
4.8 Diagnóstico clínico.....	57
4.8.1 Doença clinicamente aparente	59
4.8.2 Infecção Subclínica.....	60
4.8.3 Alterações oculares.....	61
4.8.4 Manifestações neurológicas.....	64
4.8.5 Outras manifestações clínicas.....	65
4.9 Métodos diagnósticos no recém-nascido.....	66
4.9.1 Exames laboratoriais.....	67
4.9.2 Demonstração de anticorpos IgG.....	69
4.9.3 Demonstração de anticorpos IgM, IgA, IgE.....	70
4.9.4 Métodos sorológicos.....	71
4.10 Tratamento pós-natal.....	77
4.11 Acompanhamento pós-natal	80
4.12 Prevenção	82
4.12.1 Prevenção Primária.....	82
4.12.2 Prevenção Secundária.....	84
4.13 Estratégias para prevenção da Toxoplasmose Congênita em diferentes países europeus – “Simpósio Europeu sobre Toxoplasmose Congênita”	85
4.13.1 Bélgica.....	85
4.13.2 França	86
4.13.3 Alemanha.....	87
4.13.4 Áustria.....	88
4.13.5 Finlândia	88

4.13.6 Itália	89
4.13.7 Noruega.....	89
4.13.8 Portugal.....	90
4.13.9 Reino Unido.....	90
4.14 Perspectivas para o futuro	91
4.15 Considerações metodológicas	92
4.16 Conclusão	89
5 OBJETIVOS	97
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DE LITERATURA.....	98
7 ARTIGO 1 - PREVALÊNCIA DE TOXOPLASMOSE AGUDA EM 41.112 GESTANTES ATENDIDAS EM UM HOSPITAL PÚBLICO NO SUL DO BRASIL	108
Resumo	109
Introdução	110
Pacientes e Métodos	111
Resultados.....	113
Discussão e Conclusão	115
Referências bibliográficas	122
8 ARTIGO 2 - INCIDÊNCIA DE TOXOPLASMOSE CONGÊNITA E TAXA DE TRANSMISSÃO VERTICAL EM CRIANÇAS NASCIDAS EM UM HOSPITAL PÚBLICO NO SUL DO BRASIL.....	125
Resumo	126
Introdução	127
Material e Métodos	128
Resultados.....	132
Discussão e conclusão	134
Referências bibliográficas	141
9 ARTIGO 3 - DESEMPENHO DE TESTES DIAGNÓSTICOS EM TOXOPLASMOSE CONGÊNITA, COM ÊNFASE NA DETECÇÃO DO DNA DO <i>T. gondii</i> COM REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM AMOSTRA SÉRICA.....	144
Resumo	145
Introdução	146
Material e Métodos	148
Resultados.....	150
Discussão	151
Referências bibliográficas	161
10 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	165
10.1 Artigo 1 – Prevalência de Toxoplasmose aguda em gestantes.....	165
10.2 Artigo 2 – Incidência de toxoplasmose congênita e taxa de transmissão vertical.....	166
10.3 Artigo 3 – Desempenho dos testes diagnósticos em toxoplasmose congênita.....	169
10.3.1 Aspectos metodológicos relacionados à validade dos resultados.....	170
10.3.2 Aspectos metodológicos relacionados aos resultados do estudo–acurácia	173

10.3.3 Aspectos práticos dos testes estudados.....	174
10.4 Referências bibliográficas das considerações finais e conclusão.....	178
ANEXOS	180
ANEXO A – PROJETO DE PESQUISA.....	181
ANEXO B – APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA PELO COMITÊ DE ÉTICA.....	204
ANEXO C – INFORMAÇÕES CONTIDAS NO BANCO DE DADOS.....	205

ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	-	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>
AIG	-	Adequado para a idade gestacional
Capture – ELISA	-	<i>Capture Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
Dif	-	Diferença
DNA	-	Ácido desoxirribonucleico
DS ELISA	-	Elisa duplo sanduíche
EFO	-	Exame de fundo de olho
ELFA	-	<i>Enzyme-linked fluorescent assay</i>
ELIFA	-	<i>Enzyme-linked immunofiltration assay</i>
ELISA	-	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EP	-	Erro padrão
ETF	-	Ecografia transfontanelar
EUA	-	Estados Unidos da América
GIG	-	Grande para a idade gestacional
HIV	-	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HMG	-	Hemograma
HNSC	-	Hospital Nossa Senhora da Conceição
IC 95%	-	Intervalo de confiança de 95%
IFA	-	<i>Conventional Indirect Fluorescent Antibody Test</i>
IgA	-	Imunoglobulina A
IgE	-	Imunoglobulina E
IgG	-	Imunoglobulina G
IgM	-	Imunoglobulina M
ISAGA	-	<i>Immunosorbent agglutination assay</i>
LCR	-	Líquido cefalorraquidiano
MEIA	-	<i>Microparticle enzyme immunoassay</i>
OR	-	<i>Odds ratio</i>
PIG	-	Pequeno para a idade gestacional
PCR	-	<i>Polymerase chain reaction</i>
χ^2	-	Qui-quadrado

RCP	-	Reação em cadeia da polimerase
RN	-	Recém-nascido
RR	-	Risco relativo
RV	-	Razão de verossimilhança
SNC	-	Sistema Nervoso Central
SPSS	-	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TC	-	Toxoplasmose congênita
<i>T. gondii</i>	-	<i>Toxoplasma gondii</i>
UFRGS	-	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UK	-	<i>United Kingdom</i>

RESUMO

Introdução: A infecção aguda pelo *Toxoplasma gondii* em gestantes pode determinar infecção fetal através de passagem transplacentária. As crianças afetadas podem desenvolver coriorretinite e déficit neurológico, na ausência de tratamento adequado.

Objetivos: Estimar a prevalência de toxoplasmose aguda em gestantes atendidas na maternidade do Hospital Nossa Senhora da Conceição, avaliando possíveis diferenças nas frequências ao longo do período estudado; medir a incidência de toxoplasmose congênita (TC) e estimar a taxa de transmissão vertical em crianças nascidas neste hospital; avaliar a acurácia de testes diagnósticos em TC, aplicados no momento do nascimento, na população de crianças estudadas.

Métodos: Inicialmente um estudo transversal foi desenvolvido para identificar as pacientes que apresentaram critérios de infecção aguda na gestação, atendidas na maternidade no momento do parto, entre outubro de 1998 e dezembro de 2005. Novas tecnologias foram introduzidas para detecção diagnóstica ao longo deste período. Entre outubro de 1998 e dezembro de 2001 (período 1), utilizou-se o método *microparticle enzyme immunoassay* – MEIA e entre janeiro de 2002 e dezembro de 2005 (período 2) foi utilizada a técnica de captura de IgM e o teste de avididade de IgG com o método *enzyme linked fluorescent assay* – ELFA (VIDAS).

Os recém-nascidos identificados a partir deste estudo inicial foram incluídos em um estudo de coorte histórico, com tempo de acompanhamento aproximado de doze meses, para estabelecer o diagnóstico definitivo de toxoplasmose congênita, obtido em dois momentos: (1) logo após o nascimento; (2) aos 12 meses, aproximadamente.

Para a definição de caso da infecção aguda na gestação e de toxoplasmose congênita foi utilizado o sistema de classificação elaborado por Lebech *et al.*, com adaptações (quadro 1).

Aqueles casos classificados como improváveis foram excluídos do cálculo da prevalência de toxoplasmose aguda em gestantes e de incidência de TC.

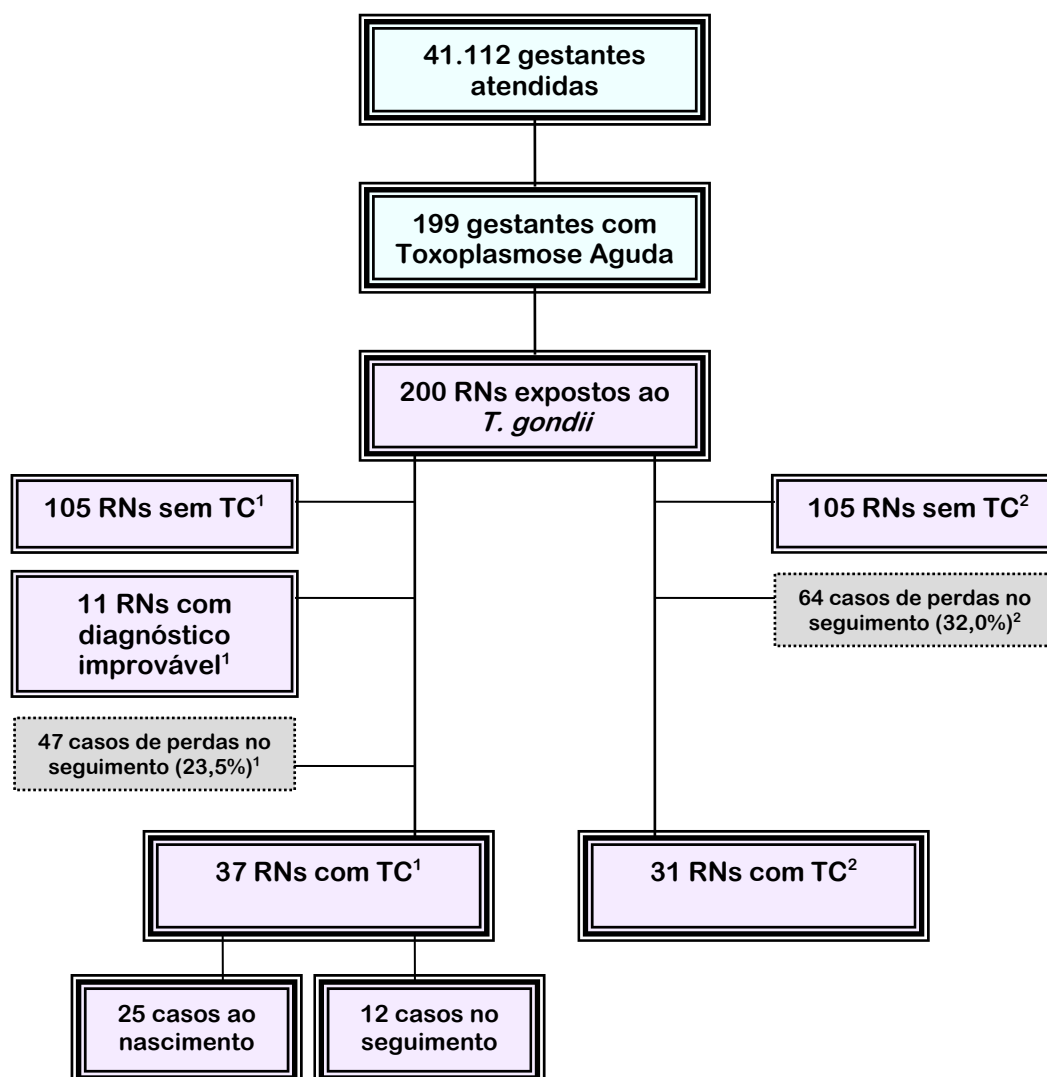
Para avaliar a acurácia de testes diagnósticos em TC realizados no momento do nascimento utilizou-se, como padrão ouro para o diagnóstico definitivo, a concentração de anticorpos IgG em torno de 12 meses de vida. Um bebê infectado deve ter concentrações iguais ou mais elevadas de IgG nesta idade quando comparadas às encontradas no nascimento. Houve comparação independente e cega dos métodos diagnósticos avaliados em relação ao padrão ouro. A dosagem de anticorpos IgG e IgM em recém-nascidos foi processada com o método *microparticle enzyme immunoassay* (MEIA).

Análise: Para comparar proporções foi utilizado o teste qui-quadrado com correção de Yates, teste exato de Fisher, quando necessário, e Teste t de Student para comparação entre médias de duas amostras independentes com distribuição simétrica. Na avaliação do desempenho de testes diagnósticos foram obtidos resultados de sensibilidade, especificidade, razões de verossimilhança (RV) positiva e negativa dos testes diagnósticos – hemograma, exame do líquor, ecografia transfontanelar, exame de fundo de olho (EFO) e a detecção de anticorpos IgM para toxoplasmose (MEIA) e do DNA do toxoplasma com reação em cadeia da polimerase – método *Nested* (RCP-*Nested*) séricos.

Categoria diagnóstica e critérios para diagnóstico de infecção primária durante a gestação
<p>Diagnóstico definitivo</p> <ul style="list-style-type: none"> • Viragem sorológica • RN infectado <p>Diagnóstico provável</p> <ul style="list-style-type: none"> • IgG superior a 300 UI/mL* • Baixa avidéz de IgG* • IgG materna aumentando três vezes ou mais* <p>Diagnóstico possível</p> <ul style="list-style-type: none"> • Avidéz de IgG intermediária na segunda metade da gestação* • IgG inferior a 300 UI/mL e apenas um exame no momento do parto* • IgG inferior a 300 UI/mL e apenas um exame no pré-natal, na segunda metade da gestação* <p>Diagnóstico improvável</p> <ul style="list-style-type: none"> • IgG inferior a 300 UI/mL e alta avidéz de IgG com idade gestacional superior a 16 semanas* • IgG estável com exames realizados na segunda metade da gestação*
Categoria diagnóstica e critérios para diagnóstico de toxoplasmose fetal e congênita
<p>Diagnóstico definitivo</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aumento na concentração de IgG nos primeiros 12 meses de vida, com ou sem sinais clínicos da tríade clássica (hidrocefalia ou microcefalia, retinocoroidite e calcificações cerebrais) • IgG persistentemente positivo em torno de 12 meses, sem sinais clínicos da tríade clássica • IgM positivo nos primeiros 6 meses de vida, excluindo as amostras dos primeiros 2 dias de vida • RCP do líquido amniótico positiva <p>Diagnóstico provável</p> <ul style="list-style-type: none"> • IgM positivo entre 6 e 12 meses de idade, sem testes sorológicos prévios para comparação • Retinocoroidite e/ou hidrocefalia/calcificações cerebrais e infecção primária materna definida durante a gestação sem outros resultados disponíveis • RCP em amostra sérica ou líquórica positiva <p>Diagnóstico possível</p> <ul style="list-style-type: none"> • Retinocoroidite e/ou hidrocefalia/calcificações cerebrais, IgG positivo, sem testes sorológicos ou conhecimento de infecção materna <p>Diagnóstico improvável</p> <ul style="list-style-type: none"> • Diminuição da concentração de IgG nos primeiros seis meses de vida, na ausência de tratamento
*Resultados associados à presença de IgM reagente

Quadro 1: Categorias diagnósticas e critérios de definição de caso de toxoplasmose aguda na gestação, fetal e congênita de acordo com Lebech *et al.*, com adaptações.

A população estudada está representada na figura 1.



¹ Os critérios utilizados para estes diagnósticos seguiu a classificação de Lebech *et al.*, com adaptações, utilizados no primeiro e no segundo artigo desta tese.

² O critério utilizado para estes casos foi a concentração de IgG em torno de 12 meses de vida (padrão ouro), utilizado no terceiro artigo desta tese.

Figura 1: Fluxograma que representa a população de gestantes e de recém-nascidos.

Resultados: Em uma população de 41.112 gestantes, a prevalência de toxoplasmose aguda foi de 4,8 para cada 1.000 gestantes (IC95%: 4,2 a 5,6). Houve redução significativa na prevalência de toxoplasmose aguda nas gestantes deste hospital a partir do ano 2002 (P=0,008).

O diagnóstico de toxoplasmose congênita foi definitivo em 37 crianças entre 40.727 nascidos vivos no período estudado, atingindo uma incidência de 0,9 para cada 1.000 nascimentos (IC95%: 0,6 a 1,3). Logo após o nascimento, entre os 200 recém-nascidos expostos ao *T. gondii*, resultado de 199 gestantes infectadas, 25 bebês apresentaram critérios diagnósticos de toxoplasmose congênita, atingindo taxa de transmissão vertical de 12,5% (IC 95%: 8,2% - 17,9%). Após o seguimento foram

detectados mais 12 casos, aumentando esta taxa para 18,5% (IC 95%: 13,4% – 24,6%).

Para avaliar a acurácia de testes diagnósticos aplicados no momento do nascimento, foram identificadas 31 crianças com TC, de acordo com o padrão ouro, entre 136 expostas ao protozoário intra-útero e que completaram seguimento até os 12 meses de vida. Os testes que apresentaram melhor desempenho isoladamente na predição do diagnóstico, foram detecção de anticorpos IgM específicos, EFO e RCP-*Nested* atingindo razões de verossimilhança positivas de 119,3 (IC95%: 7,40 – 1923,92), 49,9 (IC95%: 3,0 – 838,2) e 24,8 (IC95%: 3,22 – 190,35), respectivamente. A RV negativa para IgM foi 0,4 (IC95%: 0,3 – 0,6), mas para o EFO e RCP-*Nested* foi apenas 0,7 (IC95%: 0,6 – 0,9).

Conclusão: A prevalência de toxoplasmose aguda em gestantes incluídas neste estudo foi inferior à encontrada na França e na Bélgica, mas foi mais elevada quando comparada às descritas na Suécia, Noruega, Dinamarca e Nova Iorque. A prevalência estimada neste estudo foi similar a de outros locais do Brasil, como Mato Grosso do Sul, mas inferior à obtida no Distrito Federal. Esta variabilidade nas estimativas pode estar relacionada com os diferentes métodos diagnósticos utilizados no rastreamento, ou ainda, com os diferentes fatores de risco envolvidos na transmissão da doença. Em nosso estudo, esta frequência diminuiu a partir do ano de 2002, o que não pode ser atribuível à introdução do teste de avidéz de IgG, uma vez que a média de idade gestacional na realização deste exame foi tardia. Entretanto, existe a possibilidade de que o teste de captura de IgM com o método ELFA tenha contribuído para diminuir os casos falso-positivos de IgM, o que poderá ser confirmado com futuros estudos. Estes resultados apontam que a introdução de novas tecnologias no laboratório deve ser acompanhada de esforços para melhorar as condições de acesso precoce das gestantes ao pré-natal de referência, com o objetivo de não perder a oportunidade para melhor discriminar as gestantes sem doença e evitar procedimentos invasivos, desnecessários e onerosos.

A incidência de toxoplasmose congênita e a taxa de transmissão vertical foram elevadas. Estas frequências podem estar subestimadas devido às perdas no seguimento. Para avaliar o efeito das perdas na validade do estudo, foram comparadas as características da população de gestantes e de recém-nascidos do grupo de bebês com seguimento completo em relação ao grupo que não retornou para o seguimento. Estas características foram semelhantes nos dois grupos, portanto, consideramos que o percentual de perdas, embora elevado, não prejudicou a validade do estudo.

A identificação de 12 casos adicionais de TC com o seguimento dos bebês reforça a necessidade de monitoramento sorológico durante o primeiro ano de vida, mesmo sem evidência de infecção congênita ao nascimento.

Na avaliação dos testes diagnósticos aplicados ao nascimento, a detecção de anticorpos IgM específicos no sangue do neonato, o EFO e o RCP-*Nested* sérico demonstraram melhor desempenho para identificar os bebês com TC. Entretanto, para afastar este diagnóstico, apenas o resultado não reagente de anticorpos IgM específicos apresentou maior utilidade, mas com efeito de pequena magnitude.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, toxoplasmose congênita, transmissão vertical de doença, diagnóstico.

ABSTRACT

Introduction: The acute infection by *Toxoplasma gondii* in pregnant women may cause fetal infection by means of the transplacental transfer. Affected children may develop chorioretinitis and neurological deficit in the absence of a proper treatment.

Objectives: To estimate the prevalence of acute toxoplasmosis in pregnant women cared for at the maternity ward of Hospital Nossa Senhora da Conceição, evaluating possible differences in frequencies along the period of study; to measure the incidence of congenital toxoplasmosis (CT), and estimate the rate of vertical transmission in children who were born in this hospital; to evaluate the accuracy of diagnostic tests in CT, applied at the moment of the birth, in the population of studied children.

Methods: Initially a cross-sectional study was developed to identify the patients who presented criteria of acute infection in the pregnancy, cared for at the maternity ward at the moment of the labor, between October 1998 and December 2005. New technologies have been introduced for diagnostic detection along this period. Between October 1998 and December 2001 (period 1) the *microparticle enzyme immunoassay* – MEIA was used, while between January 2002 and December 2005 (period 2) the IgM capture technique and the IgG avidity test with the *enzyme linked fluorescent assay* – ELFA (VIDAS) method were used.

Those newborns (NB) identified at this initial study were included in a historical cohort study, with an approximate follow-up time of twelve months, to establish the definitive diagnosis of congenital toxoplasmosis, obtained in two moments: (1) soon after birth; (2) at 12 months, approximately.

For the definition of cases of acute infection in pregnancy and congenital toxoplasmosis, the classification system elaborated by Lebech *et al.* was used with adaptations (Picture 1).

Those cases that were classified as unlikely were excluded from the prevalence calculation of acute toxoplasmosis in pregnant women and from the incidence of CT.

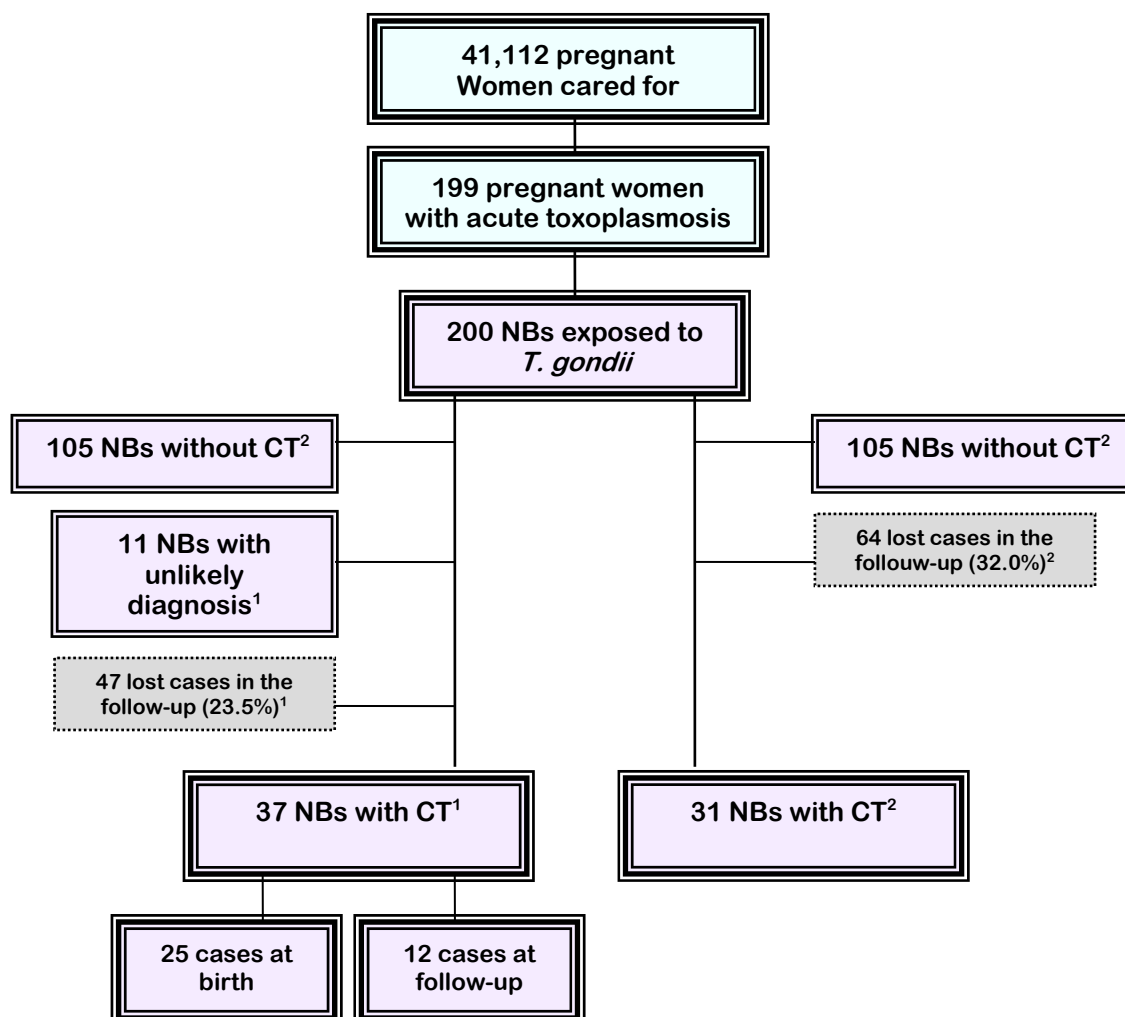
In order to evaluate the accuracy of diagnostic tests in CT accomplished at the moment of birth, the concentration of IgG antibodies around 12 months of age was used as a gold standard for the ultimate diagnosis. An infected baby must have equal or higher concentrations of IgG at this age when compared to the ones found at birth. An independent and blind comparison of the diagnostic methods evaluated in relation to the gold standard was performed. The dosage of IgG and IgM antibodies in newborns was processed with the *microparticle enzyme immunoassay* (MEIA) method.

Analysis: In order to compare proportions, a chi square test with Yates correction, an exact Fisher test when necessary, and a Student's t-test for comparison between means of two independent samples with symmetrical distribution were used. In the performance evaluation of diagnostic tests, results of sensitivity, specificity, positive and negative likelihood ratio (LR) of the diagnostic tests – hemogram, liquor test, transfontanellar ultrasonography brain scan, ophthalmoscopy, and detection of IgM antibodies for toxoplasmosis (MEIA) and the DNA of the toxoplasm with *polymerase chain reaction* – method *Nested* (PCR-*Nested*) serum were obtained.

Diagnostic category and criteria for diagnosis of primary infection during the pregnancy
<p>Definitive diagnosis</p> <ul style="list-style-type: none"> • Seroconversion • Infected NB <p>Likely diagnosis</p> <ul style="list-style-type: none"> • IgG higher than 300 UI/mL* • Low avidity of IgG* • Maternal IgG increasing three times or more* <p>Possible diagnosis</p> <ul style="list-style-type: none"> • Intermediate avidity of IgG during the second half of pregnancy* • IgG lower than 300 UI/mL and one exam only at the moment of labor* • IgG lower than 300 UI/mL and one exam only during the prenatal care, in the second half of pregnancy*
<p>Unlikely diagnosis</p> <ul style="list-style-type: none"> • IgG lower than 300 UI/mL and high avidity of IgG with a gestational age higher than 16 weeks* • IgG stable with exams performed during the second half of pregnancy*
Diagnostic category and criteria for fetal and congenital toxoplasmosis
<p>Definitive diagnosis</p> <ul style="list-style-type: none"> • Increase in the concentration of IgG during the initial 12 months of age, with or without clinical signs of the classic triad (hydrocephaly or microcephaly, retinochoroiditis, and brain calcifications) • Persistently positive IgG around 12 months of age, without any clinical signs of the classic triad • Positive IgM during the initial 6 months of life, excluding the samples of the 2 initial days of life • Positive PCR of the amniotic liquid <p>Likely diagnosis</p> <ul style="list-style-type: none"> • Positive IgM between 6 and 12 months of age, without previous serologic tests for comparison • Retinochoroiditis and/or hydrocephaly/brain calcifications, and maternal primary infections defined during the pregnancy without any further results available • Positive PCR in serum or liquor sample <p>Possible diagnosis</p> <ul style="list-style-type: none"> • Retinochoroiditis and/or hydrocephaly/brain calcifications, positive IgG, no serological tests or knowledge about maternal infection <p>Unlikely diagnosis</p> <ul style="list-style-type: none"> • Decrease of the IgG concentration during the initial 6 months of age, in the absence of treatment
* Associated with positive IgM.

Picture 1: Diagnostic categories and definition criteria of cases of pregnancy, fetal, and congenital acute toxoplasmosis according to Lebech *et al.*, with adaptations.

The studied population is shown in Figure 1.



¹ The criteria used for these diagnoses followed the classification of Lebech *et al.*, with adaptations, used at first and second article of this thesis.

² The criterion used for these cases was the concentration of IgG around 12 months of life (gold standard), used at third article of this thesis.

Figure 1: Flowchart representing the population of studied pregnant women and newborns.

Results: In a population of 41,112 pregnant women, the prevalence of acute toxoplasmosis was 4.8 per 1,000 pregnant women (CI95%: 4.2 to 5.6). There was a significant decrease in the prevalence of acute toxoplasmosis in pregnant women of this hospital from 2002 on ($P=0.008$).

The diagnosis of congenital toxoplasmosis was definitive in 37 children among 40,727 live births in the studied period, reaching an incidence of 0.9 per 1,000 births (CI95%: 0.6 to 1.3). Soon after the birth, among the 200 newborns exposed to the *T. gondii*, resulting from 199 pregnant women, 25 babies showed diagnostic criteria of congenital toxoplasmosis, reaching a vertical transmission rate

of 12.5% (CI 95%: 8.2% - 17.9%). After the follow-up, another 12 cases were detected, increasing this rate to 18.5% (CI 95%: 13.4% – 24.6%).

In order to evaluate the accuracy of diagnostic tests applied at the moment of birth, 31 children with CT were identified according to the gold standard, among 164 ones who were exposed to protozoan intra-uterus and who completed their follow-up until 12 months of age. The tests that showed better performance when isolate in the prediction of the diagnosis were the detection of specific IgM antibodies, ophthalmoscopy, and PCR-*Nested* reaching positive RV of 119.3 (CI95%: 7.40 – 1923.92), 49.9 (CI95%: 3.0 – 838.2), and 24.8 (CI95%: 3.22 – 190.35), respectively. The negative RV for IgM was 0.4 (CI95%: 0.3 – 0.6), but for ophthalmoscopy and PCR-*Nested* it was 0.7 (CI95%: 0.6 – 0.9) only.

Conclusion: The prevalence of acute toxoplasmosis in pregnant women included in this study was lower than the one found in France and Belgium, but was higher when compared to the ones described in Sweden, Norway, Denmark, and New York. The estimated prevalence in this study was similar to the one from other locations in Brazil, such as Mato Grosso do Sul, but lower to the one obtained in Brasília. This variability in the estimates may be related to the different methods for diagnosis used in the screening or even to the different risk factors involved in the transmission of the disease. In our study, this frequency decreased from 2002 on, and this cannot be attributed to the introduction of the IgG avidity test, since the means of gestational age at the accomplishment of this test was late. However, there is a possibility that the IgM capture test with the ELFA method has contributed to decrease the frequency of false-positive cases of IgM, what can be confirmed with future studies. These results signal that the introduction of new technologies in the laboratory must be accompanied by efforts to improve conditions for an early access of pregnant women to the reference prenatal care, aiming to prevent the loss of opportunities of better discriminating pregnant women that are not sick and avoiding unnecessary and expensive invasive procedures.

The incidence of congenital toxoplasmosis and the rate of vertical transmission were elevated. These frequencies may be underestimated due to the losses in the follow-up. In order to evaluate the effect of losses in the study validity, characteristics of the population of pregnant women and newborns belonging to the group of babies with full follow-up in relation to the group that did not return for the follow-up were compared. These characteristics were similar in the two groups, therefore we consider that the percentual of losses, even though high, did not endanger the validity of the study.

The identification of twelve additional cases of congenital toxoplasmosis with the follow-up of the babies reinforces the need of a serological monitoring during the first year of life, even without any evidence of congenital infection at birth.

In the evaluation of diagnostic tests applied at birth the detection of specific IgM antibodies in the blood of the newborn, the ophthalmoscopy, and the serum PCR-*Nested* showed a better performance to identify babies with CT. However, in order to discard this diagnosis, only the non-reagent IgM specific antibodies result showed higher utility, with a small magnitude effect though.

Key words: *Toxoplasma gondii*; congenital toxoplasmosis; disease transmission, vertical; diagnosis.

LISTA DE QUADROS

RESUMO

Quadro1 - Categorias diagnósticas e critérios de definição de caso de toxoplasmose aguda na gestação, fetal e congênita de acordo com Lebech <i>et al.</i> , com adaptações	13
---	----

ABSTRACT

Picture 1 - Diagnostic categories and definition criteria of cases of pregnancy, fetal, and congenital acute toxoplasmosis according to Lebech <i>et al.</i> , with adaptations	17
---	----

REVISÃO DA LITERATURA

Quadro 1- Possíveis sinais e sintomas de TC na infância e seqüelas tardias	57
Quadro 2 - Recomendações para prevenção primária em gestantes suscetíveis	82

ARTIGO 3

Quadro 1 - Categorias diagnósticas e critérios para o diagnóstico de infecção Primária durante a gestação	153
---	-----

LISTA DE TABELAS

JUSTIFICATIVA E REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1 – Programas de rastreamentos perinatais	29
Tabela 2 – Efeito do tempo entre o início do tratamento pré-natal e a soroconversão e do tipo de tratamento na transmissão vertical, na amostra de gestantes tratadas	44
Tabela 3 – Efeito do tempo entre o início do tratamento pré-natal e a soroconversão e do tipo de tratamento nas manifestações clínicas diagnosticadas no primeiro ano de vida	45
Tabela 4 – Achados clínicos em bebês de gestantes com infecção aguda por <i>T. gondii</i>	58
Tabela 5 – Características clínicas dos pacientes com infecção pelo <i>T. gondii</i> e relação com os principais genótipos do <i>T. gondii</i>	64
Tabela 6 – Efeito da combinação de resultados de IgM e IgA na sensibilidade e especificidade	72
Tabela 7 – Sensibilidade e especificidade do <i>Western-Blot</i> e IgM-ISAGA para detectar infecção por <i>T. gondii</i> ao nascimento e 3 meses de idade	73
Tabela 8 – Desempenho de testes diagnósticos em recém-nascidos	74

ARTIGO 1

Tabela 1 – Prevalência acumulada de toxoplasmose aguda em gestantes de acordo com o sistema de classificação e definição de caso de infecção pelo <i>Toxoplasma gondii</i> em gestantes imunocompetentes.....	119
---	-----

ARTIGO 2

Tabela 1 – Taxa de transmissão vertical de toxoplasmose em dois momentos de diagnóstico.....	136
Tabela 2 – Taxa de transmissão vertical conforme categorias e critérios para o diagnóstico de infecção primária na gestação	137
Tabela 3 – Comparação das características de gestantes e de recém-nascidos quanto ao completo seguimento para o diagnóstico	138

ARTIGO 3

- Tabela 1 – Desempenho dos testes diagnósticos em toxoplasmose congênita - hemograma, ecografia transfontanelar, exame do líquido, exame de fundo de olho, detecção de anticorpos IgM para toxoplasmose e do DNA do *T. gondii* com reação em cadeia da polimerase 154
- Tabela 2 – Desempenho dos testes diagnósticos em toxoplasmose congênita em paralelo - hemograma, ecografia transfontanelar, exame do líquido, exame de fundo de olho, detecção de anticorpos IgM para toxoplasmose e do DNA do *T. gondii* com reação em cadeia da polimerase 155
- Tabela 3 – Desempenho dos testes diagnósticos em toxoplasmose congênita em série - hemograma, ecografia transfontanelar, exame do líquido, exame de fundo de olho, detecção de anticorpos IgM para toxoplasmose e do DNA do *T. gondii* com reação em cadeia da polimerase. 156
- Tabela 4 – Razões de verossimilhança para os seis testes realizados para o diagnóstico de toxoplasmose congênita ao nascimento, estratificados de acordo com o número de testes positivos..... 157

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

- Figura 1 - Fluxograma que representa a população de gestantes e de recém-nascidos estudados 14

ABSTRACT

- Figure 1 - Flowchart representing the population of studied pregnant women and newborns 18

REVISÃO DA LITERATURA

- Figura 1 - Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii* 33
- Figura 2 - Risco de infecção congênita conforme idade gestacional no momento da soroconversão materna 40

ARTIGO 1

- Figura 1 - Prevalência de toxoplasmose aguda na gestação entre 1998 e 2005..... 118

1 APRESENTAÇÃO

Este trabalho consiste na tese de doutorado intitulada “Prevalência de toxoplasmose aguda em gestantes, incidência de toxoplasmose congênita e desempenho de testes diagnósticos em toxoplasmose congênita”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em 25 de abril de 2007. O trabalho é apresentado em três partes, na ordem que segue:

1. Introdução, Revisão da Literatura e Objetivos
2. Artigos
 - a. Prevalência de toxoplasmose aguda em gestantes
 - b. Incidência de toxoplasmose congênita
 - c. Desempenho de testes diagnósticos em toxoplasmose congênita
3. Conclusões e Considerações Finais.

Documentos de apoio, incluindo o Projeto de Pesquisa, estão apresentados nos anexos.

2 INTRODUÇÃO

O *Toxoplasma gondii* pode determinar infecção fetal através de passagem transplacentária quando a mãe adquire a infecção durante a gestação ou, menos comumente, quando mulheres cronicamente infectadas têm um imunocomprometimento importante (1,2).

Magnitude do problema

A incidência de toxoplasmose durante a gestação é variada em diferentes populações e foi estimada numa amplitude de três a seis casos por 1.000 nativos nos países de alto risco e de um a dois casos por 1.000 nativos nos países de baixo risco (3).

A freqüência de toxoplasmose congênita varia entre 0,1/1.000 nascimentos nos Estados Unidos (4), 0,42/1.000 nascimentos na Dinamarca (5) e até 1,9 a 3,2/1.000 em Paris (1).

Inicialmente, um estudo prévio realizado como tema para a dissertação de mestrado, neste programa, entre a população de gestantes do Hospital Nossa Senhora da Conceição, em Porto Alegre, identificou a prevalência de soropositividade para toxoplasmose que atingiu 59,8% (IC95%:57,0%-62,5%). Este resultado sugere que as gestantes suscetíveis estão expostas a um elevado risco de infecção aguda considerando a alta prevalência nesta população, semelhante à França (6). Outro estudo aponta prevalência de soropositividade para toxoplasmose em gestantes, tão elevada quanto 74,5% na região noroeste do Rio Grande do Sul (7).

Transcendência

A morbidade observada, como consequência da infecção congênita, é o dano neurológico tal como hidrocefalia ou microcefalia, déficit neuropsicomotor e epilepsia, ou o déficit visual progressivo e irreversível em qualquer época da vida (1,4,8).

Um dos problemas da toxoplasmose congênita é que a forma de manifestação mais comum é subclínica ao nascimento em 76% dos casos observados em um período de seguimento de seis meses a quatro anos (1,8,9). Portanto, o diagnóstico da toxoplasmose congênita depende inicialmente do rastreamento sorológico em gestantes para identificar ocorrência de soroconversão e posteriormente proceder à avaliação diagnóstica do recém-nascido.

Vulnerabilidade

O objetivo do rastreamento em gestantes é instituir medidas de prevenção primária para mulheres soronegativas promovendo uma redução de 63% nas taxas de soroconversão (10) e assegurar o diagnóstico precoce e tratamento da gestante com infecção aguda para prevenir a ocorrência e a gravidade das seqüelas nos recém-nascidos (11).

Atualmente, as estratégias preventivas em toxoplasmose congênita são variáveis de acordo com diferentes países. Alguns países como França, Áustria e Bélgica têm um programa nacional de prevenção, enquanto outros locais adotaram uma estratégia preventiva mais limitada ou mesmo, sem uma abordagem sistemática.

É amplamente aceito que os rastreamentos, como ações preventivas secundárias, devem ser direcionados a problemas de saúde freqüentes e graves. A importância do problema em saúde está, intimamente, relacionada com sua

freqüência na população (10). Assim, é fundamental que se conheça a prevalência da toxoplasmose aguda em gestantes da nossa população para estimar a magnitude do problema e permitir a avaliação das estratégias diagnósticas adotadas até o momento em toxoplasmose congênita. Deve-se considerar, entretanto, que os diferentes métodos diagnósticos utilizados apresentam variabilidade em suas sensibilidades e especificidades (12) e ainda não existem evidências no benefício do tratamento materno na redução do risco de toxoplasmose congênita (13-16), embora alguns estudos iniciais tenham demonstrado um efeito benéfico tanto do tratamento materno (8,17,18) quanto da criança ao longo do primeiro ano de vida, na ocorrência e na gravidade das seqüelas (19-22).

3 JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento deste projeto tem como base estudar os aspectos que envolvem as estratégias preventivas em toxoplasmose congênita. Estas medidas têm como objetivo reduzir a incidência de infecção aguda na gestação, detecção precoce e instituição de tratamento na gestante e no recém-nascido. Conseqüentemente haveria redução da transmissão vertical, da ocorrência de seqüelas freqüentes como as oculares e neurológicas, bem como a gravidade destas (10).

Um dos maiores problemas para a implementação da abordagem preventiva da doença é que o custo para diagnóstico e tratamento é elevado e as evidências dos benefícios das intervenções são limitadas (categoria B). Embora os autores que defendem a sua implementação argumentem que estas evidências já são suficientes, pois os estudos disponíveis mostraram, a partir de análise multivariável, a redução da freqüência e gravidade das seqüelas, mesmo sem redução da transmissão vertical com a instituição do tratamento materno (13-15). Além disso, já foram implantados outros programas de rastreamentos perinatais para outras doenças que apresentam incidência semelhante à toxoplasmose congênita (Tabela 1). A diferença se observa no tempo mais prolongado para o aparecimento das seqüelas da toxoplasmose congênita, que ocorrem em torno de 10 a 15% das crianças afetadas ao nascimento. Entretanto, aproximadamente 50% das crianças afetadas perdem a acuidade visual em torno dos 18 anos de idade (14).

Tabela 1 – Programas de rastreamentos perinatais

Doença	Incidência	Seqüelas	Possibilidades de tratamento	Resultados do tratamento
Fenilcetonúria neonatal	1/6.000 a 1/15.000	Grave retardo mental	Restrição da ingestão de fenilcetonúria	Prevenção de doença neurológica em crianças tratadas
Fibrose cística neonatal	1/2.000 a 1/4.000 (caucasianos)	Doença pulmonar crônica Insuficiência pancreática	Tratamento precoce das complicações pulmonares	Aumento da sobrevida*
Hipotireoidismo neonatal	1/4.000	Retardo mental	Tiroxina	Melhor crescimento e desenvolvimento intelectual

* Segundo Reis FJC *et al.* Fibrose Cística. J Pediatr. (Rio J.). 1998;74 (Supl.1):S76-S94.

O desempenho de testes diagnósticos utilizados em recém-nascidos logo após o nascimento ainda não é suficientemente adequado para evitar a instituição de tratamento empírico aos bebês, que são expostos aos efeitos colaterais das medicações. A sensibilidade para IgM atinge 40% aproximadamente, ao nascimento (23). Portanto, ainda é necessário longo período de seguimento destes bebês para afastar ou determinar o diagnóstico definitivo a partir do desaparecimento de anticorpos IgG, considerado como padrão ouro. Este evento costuma ocorrer entre 8 a 12 meses de vida. Pretende-se avaliar, com este estudo, a detecção de DNA do *Toxoplasma* a partir do teste reação em cadeia da polimerase, que foi pouco estudado em amostras séricas ou líquóricas dos recém-nascidos até o presente momento.

No Brasil ainda não foram oficialmente implantadas as estratégias preventivas para redução da toxoplasmose congênita e, ainda não existe um programa de vigilância epidemiológica da doença para avaliarmos a magnitude do problema no contexto nacional.

A partir do conhecimento da prevalência de toxoplasmose aguda em gestantes, da incidência de toxoplasmose congênita e avaliação do desempenho de testes diagnósticos em recém-nascidos, que sumariza os objetivos deste estudo é possível obter elementos que permitirão realizar estudos de custo-efetividade no nosso meio. Assim pretende-se auxiliar no estabelecimento das estratégias mais apropriadas à população de gestantes atendidas no Sistema Único de Saúde, no município de Porto Alegre.

4 REVISÃO DA LITERATURA

A Toxoplasmose é a doença clínica ou patológica causada pelo *Toxoplasma gondii* e infecção por *T. gondii* é uma infecção primária assintomática ou persistência do parasito nos tecidos. Segundo Remington, o termo toxoplasmose congênita se refere aos casos em que há os sinais da doença relacionados à infecção congênita (1). Nesta revisão o tema será abordado, utilizando os termos toxoplasmose congênita e infecção congênita pelo *T. gondii* como sinônimos.

4.1 O organismo

O protozoário foi descrito pela primeira vez em 1908, quando Nicolle & Manceaux observaram um parasita em células mononucleares de baço e fígado de um roedor do Norte da África (*Ctenodactylus gondii*). Inicialmente o organismo foi chamado de *Leishmania gondii* e no ano seguinte, com base em critérios morfológicos, eles propuseram a denominação *Toxoplasma gondii*. Ao mesmo tempo, e independentemente, foi chamado de *Toxoplasma cuniculi* por Alfonso Splendore, no Brasil, que encontrou o parasita em um coelho que havia morrido com paralisia. Em 1923, Janku, um oftalmologista em Praga, descreveu o primeiro caso reconhecido em humanos. Ele encontrou cistos de parasita na retina de uma criança de onze meses de idade com hidrocefalia congênita e microftalmia com coloboma na região macular (1,9).

Em 1948, Sabin e Feldman criaram um teste sorológico, o *dye test*, que permitiu aos numerosos investigadores estudarem aspectos clínicos e

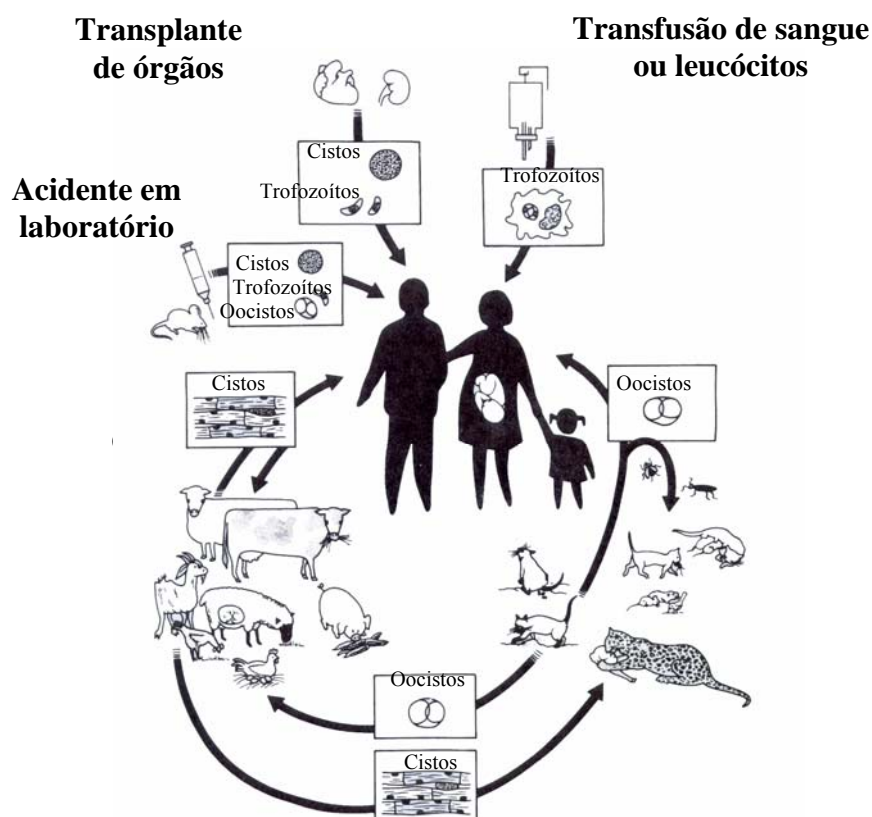
epidemiológicos da toxoplasmose. Assim, demonstraram que o *T. gondii* é causa de uma infecção em seres humanos, altamente prevalente e disseminada (1).

O *T. gondii* possui três linhagens clonais designadas tipo I, II e III, que difere em virulência e padrão epidemiológico de ocorrência. Os tipos I e II têm sido relatados em pacientes com doença congênita, enquanto que aqueles isolados em animais são predominantemente do genótipo III. O tipo II foi freqüentemente isolado de pacientes com AIDS (24). Houve predomínio do *T. gondii* tipo II (92,9%) em relação ao tipo III nos casos de toxoplasmose congênita, procedentes principalmente da França. Não observaram, nesta amostra, genótipos atípicos ou do tipo I (25). Entretanto, Fuentes *et al.* identificaram *T. gondii* tipo I em 75% dos casos de toxoplasmose congênita na Espanha (26).

4.2 O ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*

O *Toxoplasma gondii* tem um complexo ciclo de vida consistindo em três estágios: a) os trofozoítos, mais recentemente denominados endozoítos ou taquizoítos, encontrados na fase aguda da infecção como forma proliferativa que invade as células; b) esporozoítos, forma do parasito encontrada em oocistos; c) e forma intracística denominada cistozoíto ou bradizoíto encontrada em cisto tecidual, na fase latente da infecção (1,27,28).

O ciclo de vida desse protozoário, conforme descrito abaixo, está representado na Figura 1.



Fonte: Remington JS, McLeod R, Thulliez P, Desmonts G. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein JO. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. 6th ed. Philadelphia: WB Saunders; 2005.p. 947-1091.

Figura 1: Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*

Os gatos se tornam infectados pelo *T. gondii* pela ingestão de cistos teciduais ou oocistos, através dos quais organismos viáveis são liberados e invadem as células enteroepiteliais do intestino delgado, onde se desenvolve um ciclo assexuado seguido de ciclo sexuado que resulta na formação de novos oocistos, que são, então, excretados no meio ambiente (1,28). Os oocistos não esporulados, após 1 a 21 dias da excreção, se tornam esporulados (forma infecciosa). Os oocistos não se tornam esporulados em temperaturas abaixo de 4°C ou acima de 37°C. Embora os gatos

eliminam oocistos por somente uma a duas semanas, a sua quantidade é elevada. Além disso, os oocistos podem sobreviver no ambiente por muitos meses (1).

Os taquizoítos constituem a forma invasiva responsável pelas manifestações da infecção aguda. Nesta forma, o parasita invade as células e se replica, ocorrendo a parasitemia, responsável pela infecção congênita. Os taquizoítos invadem todos os órgãos, especialmente os músculos (incluindo o coração), fígado, baço, linfonodos e sistema nervoso central (27). Esta forma do organismo é empregada nos testes sorológicos (Sabin-Feldman *dye test*, métodos de anticorpos fluorescentes e testes de aglutinação). A forma taquizoíta requer um habitat intracelular para sobreviver e se multiplicar. Não sobrevive ao congelamento e ao descongelamento, nem à dessecação e ao suco gástrico. O organismo é multiplicado em laboratório no peritônio de ratos, em culturas teciduais de mamíferos e em ovos de galinha embrionados. Através do processo de endodiogênese, se formam as rosetas e, finalmente, os cistos (1).

Quando o hospedeiro desenvolveu uma resposta imune, a infecção atinge estágio latente ou crônico, durante o qual cistos estão presentes em muitos tecidos, mais comumente em músculo esquelético, no miocárdio e no cérebro; esses cistos podem permanecer no hospedeiro por toda a vida (1).

Congelamento, descongelamento, dessecação e aquecimento a 66°C destroem esta forma de cisto tecidual; entretanto, o organismo pode sobreviver por até dois meses a 4°C. Cistos teciduais podem se tornar inviáveis quando temperaturas internas atingem 67°C ou - 12°C. Até que mais dados estejam disponíveis, parece que o congelamento a - 20°C por 18 a 24 horas, seguido por descongelamento, deve ser considerado suficiente para destruição dos cistos (1,29).

4.3 Transmissão (Etiologia)

A infecção é adquirida principalmente por ingestão de alimentos ou água contaminados com oocistos eliminados pelos gatos ou ingestão de carnes cruas ou pouco cozidas contendo cistos teciduais (24).

Entre alimentos de origem animal, o *T. gondii* tem sido encontrado encistado em tecidos de porcos, ovelhas e cabras mais freqüentemente do que em tecidos de outros animais domésticos. *T. gondii* viável é raramente encontrado em carne de vaca. Até o momento, a importância da carne de vaca na epidemiologia da infecção pelo *T. gondii* é incerta. O agente é altamente prevalente em ovelhas e cabras adultas. Embora a prevalência deste protozoário em cordeiros não seja conhecida, *T. gondii* viável foi encontrado em muitos tecidos comestíveis de cordeiros infectados congenitamente. Pesquisas sorológicas e parasitológicas nos Estados Unidos e outros países indicam alta prevalência (23%) de *T. gondii* em suínos abatidos entre 1983 e 1984 (29).

A infecção pode acometer crianças que brincam em tanques de areia, onde os gatos costumam defecar. A transmissão pode ocorrer, também, mediante transplante de órgãos ou transfusão sanguínea; transmissão transplacentária e inoculação acidental de taquizoítos (1,27).

Em um estudo multicêntrico europeu, Cook *et al.* determinaram que o principal fator de risco para a infecção em gestantes foi o consumo de carne crua ou inadequadamente cozida, em 30% a 63% dos casos, e contato com solo contaminado, em 6% a 17% das infecções. Outros fatores que também mostraram risco aumentado de infecção foi o consumo de leite não pasteurizado e derivados, e produtos

conservados de carne de porco. Os autores não encontraram associação significativa entre infecção aguda materna e contato com gatos (30).

Ter gatos não tem sido um consistente fator de risco para infecção por *T. gondii*, como citam alguns autores. O risco é maior quando ocorre exposição às fezes do gato, quando eles estão eliminando oocistos. Essa liberação de oocistos durante várias semanas somente acontece quando o gato adquire a infecção pelo *T. gondii*. Quando estes animais são mantidos confinados, não caçam para se alimentar ou não ingerem carne crua, a probabilidade de infecção diminui e, conseqüentemente, eles representam pequeno risco. Assim, a possibilidade de transmissão da infecção aos seres humanos através do ato de tocar nos gatos é mínima ou inexistente (11).

Entretanto, Kapperud & cols., na Noruega, observaram que os casos de infecção na gestação tiveram contato diário com gatos mais freqüentemente do que os controles (OR=3,6). Além disso, aqueles que lavavam a faca de cozinha com menos freqüência tiveram risco de infecção cinco vezes maior. Os casos apresentaram tendência a gostar mais de carne pouco cozida do que os controles, (OR=3,5), mas a análise de regressão logística não mostrou ser significativa (31).

Em Nápoles, os autores encontraram forte associação entre o consumo de carne de porco defumada e carne de gado crua e a infecção recente em gestantes. O consumo destes alimentos uma vez ao mês, pelo menos, aumenta em três vezes o risco de infecção recente por *T. gondii* (32).

Conforme conclusão de Cook *et al.*, os resultados do estudo sobre fatores de risco para infecção em gestantes não podem ser generalizados para países com diferentes climas e hábitos culinários. Eles recomendam mais estudos para identificar

os principais fatores de risco em diferentes populações, com a finalidade de priorizar as orientações às gestantes para evitar a infecção aguda (30).

Muitos estudos demonstram a variabilidade da prevalência de soropositividade em gestantes conforme regiões geográficas, características climáticas, fatores culturais e hábitos alimentares. Foi observada uma proporção de 10,9% na Noruega (33), 14,0% em Estocolmo (34), 18,8% em Londres (35), 20,3% na Finlândia (36), 28,6% em Barcelona (37), 32,0% em Nova Iorque (1) e 87% em Paris (1).

No Brasil, existem alguns estudos de prevalência de gestantes soropositivas para IgG antitoxoplasma: atinge 92% no Mato Grosso do Sul (38), 77,1% no Rio de Janeiro (39), 74,5% na região noroeste do Rio Grande do Sul (7), 69,4% em Recife (40), 61,1% e 54,3% em Porto Alegre (41,42), 45,4% no Paraná (43), 42,0% em Salvador (44) e 32,4% na região metropolitana da cidade de São Paulo (45).

A prevalência de soropositividade para toxoplasmose nas gestantes estudadas na maternidade do Hospital Nossa Senhora da Conceição, em Porto Alegre foi de 59,8% (IC95%: 57,0% - 62,5%) (6).

4.4 Transmissão Vertical (Etiologia)

A infecção adquirida durante a gestação pode causar toxoplasmose congênita com coriorretinite e defeitos neurológicos como freqüentes conseqüências. Portanto, é crítico determinar o momento em que ocorreu a infecção em gestantes (1). A forma de detectá-la depende da realização de triagem sorológica durante o pré-natal,

ênfatizando a utilização de métodos sorológicos acurados principalmente em casos de resultados positivos, que poderiam desencadear intervenções desnecessárias (46).

O risco global de infecção fetal a partir de infecção aguda materna pelo *T. gondii* é de 20% a 50% (11).

Numerosas variáveis influenciam a probabilidade de infecção congênita. Muitos destes fatores são reconhecidos, mas pouco entendidos. Eles incluem a cepa e virulência do *T. gondii*, tamanho da inoculação, via de infecção, tempo de duração da gestação e imunocompetência da gestante (1).

Entretanto, a taxa de transmissão fetal depende de três fatores fundamentais: parasitemia materna, idade gestacional no momento da infecção e tratamento materno. Esses tópicos merecem um detalhamento maior.

1. Parasitemia materna

O *Toxoplasma gondii* pode determinar infecção fetal através de passagem transplacentária quando a mãe adquire infecção durante a gestação ou, menos comumente, quando mulheres cronicamente infectadas têm um imunocomprometimento grave (1,2,47).

O organismo atinge a placenta durante parasitemia materna invadindo e multiplicando-se dentro de células placentárias; eventualmente, tem acesso à circulação fetal. Esse processo pode ocorrer dentro de um período menor do que 4 semanas a maior do que 16 semanas (1).

Transmissão durante a amamentação ou contato direto entre as pessoas não tem sido relatados (24).

2. Idade gestacional no momento da infecção

Há consistência entre os achados dos inúmeros estudos em relação à idade gestacional no momento da infecção: quanto mais precoce é a infecção na gestação, menor o índice de acometimento fetal.

Daffos *et al.*, na França em 1988, mostraram taxa de infecção fetal menor do que 56%, a taxa descrita inicialmente por Desmonts e Couvrer, em 1974. Eles encontraram 0,6% de taxa de transmissão fetal quando a infecção materna ocorreu no período periconcepcional, 3,7% se a infecção materna se deu antes de 16 semanas de gestação e taxa de 20% quando a infecção materna ocorreu entre a 16^a a 25^a semana de gestação (1). Posteriormente, Hohlfeldt *et al.*, em 1989, verificaram que a taxa de transmissão vertical ocorreu em 7% dos recém-nascidos cujas mães tiveram infecção aguda na gestação. Mostraram que o número de fetos infectados no terceiro trimestre da gestação foi maior e que a doença foi mais grave quando adquirida durante o primeiro trimestre (17).

Em 1999, Foulon *et al.* descreveram uma taxa de infecção fetal variando de 0% (< 5 semanas de gestação) a 93% (entre 31 – 35 semanas de gestação); a taxa de transmissão vertical entre as gestantes com soroconversão estudadas foi de 44% (8).

No estudo desenvolvido por Dunn *et al.* na França, entre 1987 e 1995, a taxa de transmissão materno-fetal foi de 29% (IC 95%: 25%-33%). O risco de infecção congênita foi baixo na fase precoce da gestação, atingindo apenas 6% (IC 95%: 3%-9%) na 13^a semana de gestação. Depois disso, o risco aumenta de forma marcada e bruscamente linear até atingir 40% (IC 95%: 33%-47%) na 26^a semana de gestação e 72% (IC 95%: 60%-81%) na 36^a semana (48). (Figura 2)

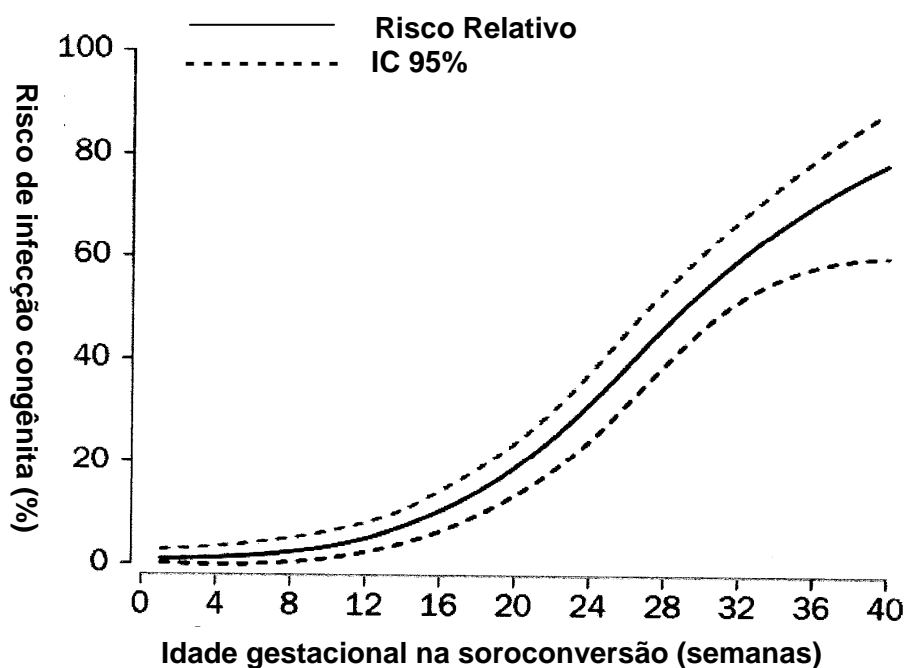


Figura 2: Risco de infecção congênita conforme idade gestacional no momento da soroconversão materna

Jenum *et al.* estabeleceram, em um estudo realizado na Noruega, que 1,7/1.000 gestantes apresentaram evidência de infecção primária durante a gestação, com uma taxa de transmissão de 23,4% (IC 95%: 11,3 – 35,5%). Eles observaram que a taxa era de 13,3% no primeiro trimestre, de 28,6% no segundo e de 50% no terceiro trimestre (49).

3. Impacto do tratamento materno

3.1 Na taxa de transmissão vertical

O tratamento de infecção aguda durante a gestação tem sido empregado com o objetivo de reduzir a incidência e a gravidade da infecção congênita. Quando os

testes de rastreamento detectam a infecção aguda durante a gestação, é iniciado o tratamento com espiramicina para tentar reduzir a transmissão ao feto (1,11).

Inicialmente, Desmonts & Couvrer descreveram que o uso da espiramicina na gestação reduziu de 56% para 24% a taxa de transmissão fetal (1). Hohlfeld *et al.* também relataram evidência indireta de redução da transmissão vertical com o uso da espiramicina na gestação e mostrou que o tratamento adicional com sulfadiazina e pirimetamina reduziu a gravidade da infecção fetal (17).

Posteriormente, Foulon *et al.* demonstraram que nem a administração de antibióticos nem o período de tempo decorrido entre a infecção e início da terapia influenciaram a transmissão da infecção ($P = 0,7$ e $0,3$, respectivamente). Por outro lado, os autores demonstraram que quanto menor é a idade gestacional no momento da infecção, menor é a frequência de transmissão ($P < 0,001$). A taxa global de transmissão da mãe para o feto foi de 44%. A análise multivariável mostrou, também, que o tratamento é fator preditivo para ausência de desenvolvimento de seqüelas na criança ($P = 0,026$; $OR = 0,30$; $IC\ 95\%: 0,10 - 0,86$) e, particularmente, para a gravidade dessas ($P = 0,007$; $OR = 0,14$; $IC\ 95\%: 0,036 - 0,584$). Quanto mais precoce o início da antibioticoterapia após a infecção, menor ocorrência de seqüelas no neonato ($P = 0,021$) (8).

Em uma revisão sistemática, incluindo nove estudos de coorte, Wallon *et al.* descreveram que em cinco destes estudos foi observada a redução da transmissão vertical entre os casos com tratamento antenatal, entretanto este efeito foi atribuído à eficácia do tratamento no terceiro trimestre. Em quatro estudos não foi observada redução significativa na transmissão vertical, mas a idade gestacional na soroconversão não foi avaliada (15).

Em 2000, Peyron *et al.* realizaram uma revisão sistemática para a elaboração de metanálise a partir de ensaios clínicos que avaliassem o efeito do tratamento antenatal, mas nenhum estudo com esta metodologia foi localizado. Os autores sugeriram não introduzir novas tecnologias diagnósticas antes de avaliar o impacto dos programas de rastreamento e os efeitos do tratamento (13).

Gilbert *et al.*, não observaram diferença significativa na transmissão vertical quando compararam a introdução do tratamento materno antes de três semanas da conversão com o início após oito semanas da soroconversão (OR=1,44;IC95%:0,60-3,31). A análise foi ajustada à idade gestacional na soroconversão (50).

Em um estudo ecológico, alguns autores avaliaram o risco de transmissão vertical do *T. gondii* e o aparecimento de manifestações clínicas comparando o tratamento pré-natal intensivo na Áustria e em Lyon com ausência de tratamento ou tratamento menos intensivo na Dinamarca e Países Baixos. Eles não encontraram claras evidências de que o risco de transmissão tenha sido menor em centros com tratamento pré-natal intensivo. Inclusive um efeito paradoxal na transmissão vertical foi observado na Dinamarca onde não foi adotado o tratamento antenatal (TV=21%, OR=0,59;IC95%:0,41-0,81) (51).

Na Suíça, a taxa de transmissão observada foi de 3,9% com tratamento materno comparada com 27,7% quando não realizado tratamento durante a gestação (52). Mas os autores não consideraram evidência de redução da transmissão vertical porque a amostra incluiu gestantes com infecção primária improvável.

3.2. Na ocorrência de manifestações clínicas

Em contraste aos achados de Foulon *et al.* (8), Gras *et al.* relataram que não houve evidência de efeito benéfico do uso materno de pirimetamina-sulfadiazina nas lesões intracranianas ou oculares em seus filhos aos três anos de idade: odds ratio (OR) para qualquer uma das lesões foi 0,89 (IC95%:0,41-1,88) quando comparada à espiramicina. E, ainda, não houve associação entre a demora no início do tratamento pré-natal e aparecimento de lesões oculares (hazard ratio=0,69; IC95%:0,28-1,68) ou qualquer lesão aos 3 anos de idade (OR=0,44; IC95%:0,16-1,19). Observaram, ainda, que entre as mães de crianças com lesões intracranianas foi significativamente mais provável que a soroconversão tenha ocorrido mais precocemente na gestação (OR por semana de gestação=0,90;IC95%:0,84-0,97) (18).

O estudo ecológico, já anteriormente descrito, avaliou também o efeito do tratamento intensivo na ocorrência de manifestações clínicas, em um período de seguimento estimado em três anos. A proporção de crianças que desenvolveu manifestações clínicas variou entre 9 e 33% e não encontraram evidência de redução de manifestações clínicas em centros com tratamento mais intensivo, mas o risco relativo ajustado para seguimento de três anos foi impreciso devido ao pequeno número de crianças afetadas e perdas no seguimento (51).

Em um estudo de coorte mais recente incluindo treze centros europeus, Gras *et al.* descreveram que houve redução significativa das lesões intracranianas quando o tratamento iniciou há menos de 4 semanas da soroconversão, quando comparado à ausência de tratamento (OR=0,28; IC95%:0,08 – 0,75). E quando comparada com o uso isolado de espiramicina, a ausência de tratamento dobrou o risco de lesões intracranianas (OR=2,33;IC95%:1,04 – 5,50). Os autores observaram que não houve

associação entre idade gestacional na soroconversão, tipo de tratamento ou tempo de início do tratamento e presença de lesões oculares (53).

Em recente metanálise incluindo 26 estudos de coorte, os autores avaliaram o efeito do tratamento pré-natal na transmissão vertical (tabela 2) e na presença de lesões intracranianas (calcificações intracranianas ou dilatação ventricular) e oculares (retinocoroidite ou microftalmia) (tabela 3). A taxa de transmissão vertical de acordo com a idade gestacional na soroconversão foi 15% (IC95%:13-17) com 13 semanas, 44% (IC95%:40-47) com 26 semanas e 71% (IC95%:66-76) com 36 semanas. A chance de transmissão aumentou 12% (IC95%:10-14) por semana de gestação na soroconversão (16).

Tabela 2. Efeito do tempo entre o início do tratamento pré-natal e a soroconversão e do tipo de tratamento na transmissão vertical, na amostra gestantes tratadas (n=1438 gestantes e 398 crianças infectadas).

	OR (IC95%)	P
Tempo entre início do tratamento e soroconversão		0,05
< 3 semanas	0,48 (0,28 – 0,80)	
> 3 semanas e < 5 semanas	0,64 (0,40 – 1,02)	
> 5 semanas e < 8 semanas	0,60 (0,36 – 1,01)	
≥ 8 semanas*	-	
Tipo de tratamento (ESP X PS)	0,79 (0,55 – 1,13)	0,19
Idade gestacional na soroconversão (por semana)	1,15 (1,12 – 1,17)	<0,0001
Latitude (para 5° maiores)	0,71 (0,53 – 0,96)	0,03

ESP=espiramicina; PS=pirimetamina+sulfonamida.

Modelo ajustado para a idade gestacional na soroconversão materna.

*Categoria de referência

Tabela 3. Efeito do tempo entre o início do tratamento pré-natal e a soroconversão e do tipo de tratamento nas manifestações clínicas, diagnosticadas no primeiro ano de vida.

	Qualquer manifestação clínica (n=550)		Retinocoroidite (n=524)		Lesões intracranianas (n=494)	
	OR (IC95%)	P	OR (IC95%)	P	OR (IC95%)	P
Idade gestacional na soroconversão ¹	0,96 (0,93-0,99)	0,01	0,97 (0,93-1,00)	0,04	0,91 (0,87 – 0,95)	<0,0001
Tratamento pré-natal e tempo entre início do tratamento e soroconversão						
Não tratadas (n=164)*	-	0,03	-	0,03	-	0,41
ESP < 5 semanas (n=112)	0,68 (0,31-1,52)		0,86 (0,36-2,09)		0,37 (0,09-1,54)	
ESP ≥ 5 semanas (n=143)	0,87 (0,41-1,86)		0,98 (0,42-2,32)		0,83 (0,28-2,42)	
OS, em qualquer IG (n=67)	0,66 (0,26-1,69)		0,82 (0,30-2,29)		0,73 (0,22-2,48)	
ESP, e após, PS (n=64)	2,41 (1,15-5,03)		2,89 (1,29-6,49)		1,40 (0,46-4,24)	

¹Em semanas; ESP=espiramicina; PS=pirimetamina-sulfonamida; IG=idade gestacional.

Modelo ajustado para idade gestacional na soroconversão, período do estudo e latitude do centro.

*Categoria de referência

Esta metanálise demonstrou fraca evidência para um aumento da taxa de transmissão vertical com início tardio do tratamento pré-natal em relação à idade gestacional na soroconversão. Estes resultados podem refletir um real efeito protetor do tratamento precoce, ou um confundimento causado por tratamento seletivo de mães com alto risco de infecção fetal, devido ao diagnóstico tardio. Os autores não encontraram evidência de que o tratamento pré-natal tenha reduzido significativamente o risco de manifestações clínicas em crianças infectadas. Os autores relatam que a principal limitação do estudo está relacionada ao delineamento. Embora eles tenham ajustado para alguns fatores importantes, não é possível excluir o efeito de outros fatores não incluídos no modelo. Além disso, o viés por indicação do tratamento poderia parcialmente explicar a fraca evidência de aumento da transmissão vertical com o início tardio de tratamento, uma vez que a probabilidade

de manifestações clínicas poderia ser maior entre aquelas pacientes que utilizaram tratamento (16).

Até este momento, ainda não foram publicados ensaios clínicos randomizados, portanto, a efetividade do tratamento materno atinge o grau de evidência B (13,14). Portanto, futuros estudos com este delineamento devem ser estimulados para avaliar o efeito do tratamento materno pré-natal no desenvolvimento a longo prazo, para justificar mudanças nas atuais condutas (13-15,16).

4.5 Rastreamento sorológico na gestação e avaliação de custo-efetividade

Em 1978 e 1985, a Áustria e a França, respectivamente, implantaram programas nacionais para detecção imediata e tratamento de infecções pelo toxoplasma durante a gestação (1).

O objetivo dos programas é instituir medidas preventivas para mulheres soronegativas, assegurando diagnóstico precoce e tratamento da infecção adquirida na gestação. Na França, desde o início do programa têm sido realizados exames médicos, pré-nupcial e pré-natal, para detecção de anticorpos específicos para *Toxoplasma gondii*. Quando uma mulher suscetível engravida, o teste é realizado no primeiro exame pré-natal, durante o primeiro trimestre; outros seis exames adicionais são realizados, mensalmente, para detectar soroconversão. Adicionalmente, as gestantes são orientadas sobre medidas preventivas (11,54).

Na Áustria, quase todas as mulheres que engravidam são submetidas ao rastreamento no primeiro trimestre da gestação e, se os resultados forem negativos,

são testadas novamente durante o 2º e o 3º trimestres, com intervalos de dois meses, no máximo. A taxa de soropositividade entre gestantes, na Áustria, declinou de 50%, no final de 1970, para 36,7% no início de 1990. A incidência de infecção congênita diminuiu de 50 a 70 casos/10.000 nascimentos, antes do programa, para 1/10.000 nascimentos no início de 1990 (11,55).

Existem algumas discussões a respeito da justificativa em realizar rastreamento para Toxoplasmose Congênita (TC) em alguns países, principalmente quando a prevalência de infecção na gestação é baixa (54). O *United Kingdom Working Group* concluiu que o rastreamento materno reduz o número de casos de doença, mas com custo substancial. A raridade da doença e as limitações no diagnóstico e tratamento restringem a efetividade do rastreamento. Devem-se considerar, também, os riscos associados à amniocentese para detecção de infecção fetal (56). Baseados no modelo de Bader, Mittendorf *et al.* analisaram a aplicação do rastreamento nos Estados Unidos. Eles concluíram que, quando a prevalência da doença é rara, mesmo melhorando a especificidade dos testes não é possível superar a influência da raridade no valor preditivo positivo do teste. Assim, por exemplo, numa população poderiam ocorrer 12,1 casos de abortamentos de fetos normais para cada caso de infecção congênita confirmada (57).

Em revisões sistemáticas para avaliar a evidência da eficácia do tratamento na gestação, Wallon *et al.* concluíram que o valor dos programas de rastreamentos no período pré-natal depende da segurança do tratamento em reduzir o risco de doença congênita e que os dados disponíveis para medir os riscos e benefícios das drogas antiparasitárias usadas para presumível infecção toxoplásmica primária não são comparáveis entre si (15).

Através de metanálise, Peyron *et al.* também concluíram que as evidências atuais são insuficientes para confirmar que o tratamento em gestantes previne infecção fetal ou melhora os resultados nas crianças acompanhadas. Acrescentam que o custo do rastreamento é elevado e recomendam que países onde este rastreamento ainda não é aplicado realizem cuidadosas pesquisas antes da sua introdução (13).

Para avaliação dos custos dos programas de prevenção em toxoplasmose congênita, vários fatores devem ser considerados. Inicialmente é importante medir a proporção de pacientes suscetíveis à infecção aguda na gestação, população alvo para sorologias seriadas mensalmente ou a cada trimestre, conforme as particularidades de cada local. Em populações onde a prevalência de soropositividade é mais baixa, um maior número de pacientes necessitaria de testes seriados o que elevaria os custos do programa de prevenção. Acrescenta-se ainda a dificuldade em determinar, com precisão, o momento em que ocorre a infecção aguda na gestante (58).

Os métodos diagnósticos atualmente disponíveis para detecção de anticorpos IgM para toxoplasmose não são suficientemente acurados, considerando a sua variabilidade existente comercialmente. Isto pode determinar resultados falso-positivos, refletidos a partir de uma especificidade tão baixa quanto 49,2% (59). Um outro fator que dificulta a interpretação dos resultados é a persistência destes anticorpos durante anos após o episódio agudo. Estima-se que resultados falso-positivos podem atingir taxas tão altas quanto 60% em relação aos testes positivos, quando os exames são realizados em laboratórios que não são de referência. Com isto torna-se evidente a necessidade de outros testes complementares, assim como a

sua correta interpretação por profissionais experientes, para avaliar a probabilidade de infecção aguda (46).

Em termos de custos, um programa nacional de educação em saúde mostrou-se menos oneroso do que o programa de rastreamento e tratamento utilizado na França. Esta diferença aumenta quando a prevalência de infecção crônica é menor (58). No Reino Unido, a análise de Henderson, citada por Jeannel *et al.* também mostrou que o custo da aplicação do programa de rastreamento seria quatro vezes maior do que o de educação em saúde. Para ser custo-efetivo, o programa deveria prevenir mais do que quatro vezes o número de casos registrados de toxoplasmose. Considerando a eficácia incerta da espiramicina, os efeitos colaterais da sulfadiazina e pirimetamina e a possibilidade de abortamentos resultantes de métodos diagnósticos de infecção fetal sem a precisão adequada, os autores concluem que os programas de educação em saúde seriam a medida preventiva com melhores resultados (58).

Por outro lado, dados de um estudo prospectivo realizado na Finlândia, que analisou a relação custo-benefício da realização de rastreamento, mostraram uma soropositividade de 20,3% em gestantes e incidência de infecção aguda de 2,4/1.000 gestantes suscetíveis. A incidência de toxoplasmose congênita foi de 0,3/1.000. O estudo comparou alternativas na realização ou não de rastreamento para infecções primárias por *T. gondii* durante a gravidez. O risco de transmissão materna foi de 40% e a efetividade do tratamento foi de 50%. Os cálculos foram realizados combinando análise de decisão e de sensibilidade. Os resultados mostraram que a aplicação do rastreamento reduziu o custo em 25%. Na Finlândia, a economia anual poderia atingir aproximadamente 2,1 milhões de dólares. A análise de sensibilidade

mostrou que o rastreamento associado à educação em saúde foi preferível à sua aplicação isolada, se a incidência de infecção primária materna exceder 1,1/1.000 e a efetividade do tratamento for superior a 22,1% (36).

O comentário de Hassl A., em relação a este estudo finlandês, propõe incluir, na análise, os custos do follow-up dos bebês e especificar melhor quais as pacientes que seriam excluídas da necessidade de aplicação de testes combinados para melhorar a correlação entre os mesmos. Na opinião do autor o argumento mais convincente para realizar rastreamento em um rico país europeu é raramente suficiente. Ele questiona qual o preço para evitar um aborto ou uma incapacidade ao longo da vida. Lappalainen M. reforça que no seu estudo utilizou apenas aspectos financeiros, sem considerar custo com a morte de uma criança ou ônus psicológico causado por resultados falso-positivos ou falso-negativos e cita Enkin's e Chalmer's: "Coisas que realmente contam não podem ser medidas" (60).

4.6 Métodos diagnósticos na gestante e no feto

Os métodos mais usados para o diagnóstico de toxoplasmose são os métodos sorológicos. Os principais deles são as reações de Sabin-Feldman, de hemaglutinação indireta, de fixação do complemento, de imunofluorescência indireta e reações imunoenzimáticas (9).

Os anticorpos IgG são marcadores sorológicos de imunidade ou infecção crônica (latente) porque, após um episódio de infecção aguda, eles persistem de modo estável ou com lenta diminuição da concentração. Concentrações elevadas (>300 UI/mL) podem persistir por anos em aproximadamente 5% dos pacientes (1).

A reação de Sabin-Feldman ou teste do corante é o processo sorológico clássico para o diagnóstico da toxoplasmose; ela se baseia na observação de que os toxoplasmas de exsudato peritonial de camundongos, em contato com soro normal, se coram pelo azul-de-metileno. Quando existem anticorpos contra o toxoplasma no soro, este não se cora. Apesar de se tratar de um teste de alta sensibilidade e especificidade, seu uso se tornou restrito devido à complexidade da técnica empregada e à sua disponibilidade em poucos laboratórios (9).

No teste de hemaglutinação indireta, hemácias marcadas com *Toxoplasma* são aglutinadas quando em contato com soro contendo anticorpos contra *Toxoplasma*. Já que, na infecção aguda, os títulos podem demorar semanas para positivarem, o teste não é uma prova útil para o diagnóstico de toxoplasmose na gestação; além disso, ele freqüentemente apresenta resultados falso-negativos em recém-nascidos com TC (9).

Na reação de fixação de complemento, os anticorpos testados aparecem mais tardiamente do que em outras reações. Portanto, o teste é indicado quando a reação de imunofluorescência e a de Sabin-Feldman se encontram com títulos estáveis ou muito altos, quando, então, é possível verificar a elevação dos títulos na reação de fixação de complemento (9).

Os testes de hemaglutinação indireta e de fixação de complemento não são, usualmente, recomendados, visto que diferentes preparações de antígenos causam resultados distintos. Assim, a resposta de anticorpos pode ser diversa não somente quando diferentes testes são usados, mas também quando um mesmo teste é realizado em laboratórios diversos (1).

A reação de imunofluorescência indireta (IFA) é considerada de boa especificidade e sensibilidade, comparável ao teste do corante. Porém, reações falso-positivas foram descritas em pacientes com doenças auto-imunes. A presença de anticorpos IgM específicos em soro obtido de cordão umbilical de recém-nascidos (RNs) é indicadora de infecção congênita; resultados falso-positivos foram descritos em pacientes com fator reumatóide positivo e em casos em que houve “escape” placentário. Em cerca de 50% a 75% dos casos de RNs com TC pode haver resultados falso-negativos como consequência de altos títulos de anticorpos maternos da classe IgG (9).

A introdução da técnica de reação imunoenzimática, denominada teste de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), trouxe grande avanço para o diagnóstico da doença. Porém, foi observada a presença de resultados falso-positivos quando o fator reumatóide estava presente e, também, em alguns casos de infecção crônica (9,61).

Baseados no método descrito por Duermeier e van der Veen para o vírus da hepatite A, Naot & Remington desenvolveram uma técnica para detecção de anticorpos IgM específicos para *Toxoplasma* denominada de ELISA “duplo sanduíche” (DS – ELISA IgM ou teste de captura de IgM). Com essa técnica, foi possível detectar a presença de IgM específico para *Toxoplasma* em 92% das amostras de indivíduos com toxoplasmose recentemente adquirida e que eram negativas na reação de IFA-IgM. Este método demonstrou não só ser simples, rápido e acurado no diagnóstico de toxoplasmose aguda em adultos e na forma congênita, mas, principalmente, mais sensível e específico do que o teste de IFA na detecção de anticorpos IgM para *T. gondii*. Esta sensibilidade maior do DS-ELISA IgM, quando

comparada à do IFA-IgM, pode ser atribuída ao fato de que a inibição da demonstração de anticorpos IgM pela presença de anticorpos IgG séricos no teste IFA-IgM é eliminada com esta técnica (9,61).

Em outro estudo para avaliar o teste de ELISA “duplo sanduíche” no diagnóstico de infecção congênita pelo *T. gondii*, os mesmos autores observaram que, entre amostras séricas de 55 recém-nascidos com infecção congênita comprovada, o teste DS-ELISA IgM foi positivo em 43 (72,7%), enquanto que IFA-IgM foi positivo em apenas 14 (25,4%) (62).

Alguns autores concluíram que o teste ELISA com captura de IgA no diagnóstico pré e pós-natal da infecção congênita pelo *Toxoplasma* é mais sensível do que o teste ELISA-IgM. Também relataram que o método é potencialmente útil para o diagnóstico precoce de infecção aguda em gestantes. O período em que anticorpos IgA estão presentes pode variar desde alguns meses até um ano, mas não por período maior do que dois anos. É mais freqüente o desaparecimento em sete meses após a infecção (1,9,63).

A reação de aglutinação por imunoabsorção – ISAGA (*immunosorbent agglutination assay*) combina as vantagens do teste de aglutinação direta e do ELISA por captura, em relação à especificidade e sensibilidade, para demonstração de anticorpos IgA, IgM e IgE para *Toxoplasma* (1,9). O método tem sido padronizado devido ao reconhecimento de sua maior sensibilidade e precocidade no diagnóstico da infecção em adultos. Alguns autores referem que o teste ISAGA-IgE é muito útil no diagnóstico de infecção aguda adquirida em gestantes e em recém-nascidos congenitamente infectados, devido à precocidade tanto da elevação quanto da queda dos seus níveis (1).

Um marcador de infecção recente atualmente referido é a baixa afinidade ou avidéz de anticorpos específicos IgG. É um teste simples que pode complementar a definição de um perfil sorológico, especialmente quando insuficientemente delineado pelos demais marcadores sorológicos (64,65).

Alguns autores referem que a baixa avidéz de IgG não pode ser interpretada como infecção recentemente adquirida porque ela pode persistir por mais do que cinco meses, dependendo do método utilizado. Entretanto, a alta avidéz de IgG no primeiro trimestre da gestação virtualmente exclui a infecção recentemente adquirida, o que torna este teste útil no início da gestação. Já a alta avidéz na fase tardia da gestação não exclui infecção adquirida no primeiro trimestre (1).

Uma avaliação de quatro métodos diagnósticos para detecção de anticorpos IgG para toxoplasma mostrou que eles têm resultados comparáveis e podem ser adotados em laboratórios para rastreamento. Os autores observaram maior discrepância entre os testes na detecção de anticorpos IgM (10%) do que de IgG (8%); é importante, contudo, considerar a prevalência da toxoplasmose na população em que os testes serão aplicados, já que, em populações de baixa prevalência, a discrepância pode ser maior. Neste estudo, as amostras foram positivas para anticorpos IgG e IgM em 28% e em 4,2% dos casos, respectivamente. A sensibilidade, a especificidade para o teste IMX Toxo IgG, versão 2.0, foram 98,9% e 98,3%, respectivamente (66).

Outro estudo com Platelia Toxo IgM mostra a necessidade de um teste confirmatório devido ao baixo valor preditivo para identificar infecção primária (59).

Na avaliação da sensibilidade e especificidade de seis testes comerciais, Wilson *et al.* encontraram, para Abbott Imx Toxo IgM, versão 2.0, 93,3 e 97,3%, respectivamente (12).

Quanto ao diagnóstico pré-natal de infecção fetal pelo *Toxoplasma gondii*, a técnica de RCP, por amniocentese, tem sido avaliada em alguns estudos. Holfeldt encontrou sensibilidade de 92% e especificidade de 100% (1), ao passo que Jenum *et al.* encontraram 33% e 94%, respectivamente (49).

4.7 Frequências de infecção pelo *T. gondii* em recém-nascidos

A ocorrência de toxoplasmose congênita varia em diferentes populações. Um estudo colaborativo desenvolvido em Paris entre 1970 e 1980 mostrou que a prevalência de infecção congênita por *Toxoplasma gondii* foi de 1,9 a 3,2/1.000 (1).

Em Massachusetts, a prevalência de toxoplasmose congênita entre 1986 e 1992, detectada através de rastreamento sorológico em amostra sérica foi de 0,08/1.000 nascimentos (55). Nos Estados Unidos, a partir de estudos regionais, alguns autores estimam o surgimento de 400 a 4.000 casos de TC a cada ano (11,55).

Em Barcelona a prevalência de toxoplasmose congênita ao nascimento foi de 0,3/1.000 nascimentos, com taxa de transmissão vertical de 41,6% (37).

Na Dinamarca, Lebech *et al.* determinaram uma prevalência de infecção congênita ao nascimento de 0,42/1.000 nascimentos (IC 95%: 0,27 – 0,61) e taxa de transmissão materno-fetal de 19,4% (IC 95%:13,2 – 27,0) em casos não tratados (5).

Na Suécia, a prevalência de toxoplasmose congênita, ao nascimento, foi 0,07/1.000 (IC95%:0,15-2,14) (67) e em Londres, este resultado foi similar atingindo

0,08/1.000 nascidos vivos (68). Um estudo mais recente realizado na Suíça mostrou declínio da prevalência de toxoplasmose congênita comparando o período de 1982 a 1985 com o período de 1986 a 1999, atingindo 0,8/1.000 e 0,12/1.000 nascidos vivos, respectivamente (51).

A partir de 17.653 amostras em papel filtro a prevalência de toxoplasmose congênita ao nascimento na Polônia foi de 1,08/1.000 nascidos vivos (69).

No Brasil, alguns estudos estimaram a incidência de infecção congênita por *T. gondii*. Em Passo Fundo, a partir de amostras do cordão umbilical de 1.250 recém-nascidos houve a identificação de 1 caso de infecção congênita, atingindo uma incidência estimada de toxoplasmose congênita de 0,8/1.000 (IC95%:0,2-44,5) (70). Outro estudo realizado no Rio Grande do Sul, a partir de 140.914 amostras em papel filtro houve a identificação de 47 casos atingindo prevalência de TC ao nascimento de 0,3/1.000 recém-nascidos (71). Em Uberlândia, MG, a partir de amostra de sangue do cordão de 805 recém-nascidos e utilizando o método Elisa com captura de IgM e/ou IgA, a frequência de toxoplasmose congênita foi de 5,0/1.000 recém-nascidos (IC95%: 1,4 – 12,7) (72).

As diferenças observadas nas prevalências entre estes locais podem ser explicadas pela diferente sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos e das amostras utilizadas.

4.8 Diagnóstico clínico

O diagnóstico de Toxoplasmose congênita era usualmente estabelecido quando crianças apresentavam hidrocefalia, coriorretinite e calcificações

intracranianas, classicamente denominadas como tríade de Wolf, descrita em 1939 (1,24), entretanto, é de ocorrência rara. O espectro clínico pode incluir desde a aparência normal ao nascimento até um quadro de eritroblastose, hidropsia fetal, a clássica tríade de toxoplasmose ou uma variedade de outras manifestações (Quadro 1) (1,27).

Possíveis sinais e sintomas de toxoplasmose congênita na infância e seqüelas tardias		
Anormalidades do LCR*	Hepatomegalia	Retardo mental
Anemia	Hidrocefalia [‡]	Microcefalia
Coriorretinite [‡]	Calcificações intracranianas [‡]	Espasticidade, paralisias
Convulsões	Icterícia	Esplenomegalia
Surdez	Déficit de aprendizado	Trombocitopenia
Febre	Linfadenopatias	Dano visual
Retardo no crescimento	Rash maculopapular	
[‡] Sinais da tríade clássica sugerindo a presença de toxoplasmose congênita.		
*LCR: líquido cefalorraquidiano.		

Quadro 1: Possíveis sinais e sintomas de TC na infância e seqüelas tardias.

O desenvolvimento de sinais clínicos é fortemente associado ao período da gestação em que houve a soroconversão materna. O risco para desenvolvimento de sinais clínicos, antes de 3 anos de idade, de acordo com o período gestacional da soroconversão materna, diminui de 61% (IC95%:34-85%) nas 13 semanas, para 25% (18-33%) nas 26 semanas, e 9% (4-17%) nas 36 semanas de gestação (48).

Na tabela 2 observa-se os resultados de um estudo prospectivo incluindo bebês de 542 mulheres que adquiriram toxoplasmose aguda na gestação (24).

Tabela 4 – Achados clínicos em bebês de gestantes com infecção aguda por *T.gondii*.

	Infecção adquirida (%)		
	1° trimestre	2° trimestre	3° trimestre
Toxoplasmose congênita	9,0	27,0	59,0
Subclínica	22,2	74,4	89,8
Clinicamente aparente	77,8	15,6	10,2
Morte perinatal ou natimortos	5,0	2,0	0

Fonte: Desmonts G, Couvrer J, 1979. Citado em: Montoya JG; Liesenfeld O. Toxoplasmosis. Lancet 2004;363:1965-1976.

A infecção congênita pelo *T. gondii* pode apresentar-se sob uma das quatro formas clínicas: (a) doença manifesta no período neonatal; (b) doença (grave ou leve) com manifestação nos primeiros meses de vida; (c) seqüela ou reativação de infecção prévia não diagnosticada; (d) infecção subclínica (1).

4.8.1 Doença clinicamente aparente

Com finalidade didática, é possível dividir as formas graves de toxoplasmose congênita em neurológica e generalizada.

Na forma neurológica, é proeminente o aparecimento de calcificações intracranianas, alteração liquórica, retinocoroidite, convulsões, fontanela cheia, hidrocefalia e microcefalia.

Freqüentemente, os sinais neurológicos ou hidrocefalia aparecem entre 3 e 12 meses de idade. Estas alterações nem sempre estão associadas a dano cerebral grave; por outro lado podem estar relacionadas a um quadro de encefalite ativa ainda não associada com necrose cerebral irreversível ou obstrução do aqueduto de Sylvius (1).

Lactentes com sinais de doença generalizada, resultante de infecção fetal mais tardia na gestação, apresentam além de retinocoroidite e alterações líquóricas, icterícia, hepatoesplenomegalia, linfadenopatias, trombocitopenia e anemia. Entre os casos mais graves, presentes em menos de 10% dos pacientes, salienta-se a tétrede de Sabin: hidro ou microcefalia; coriorretinite (retinocoroidite bilateral), macular ou perimacular, simétrica; calcificações cerebrais intraparenquimatosas; e retardo mental (1).

4.8.2 Infecção Subclínica

Muitas crianças com infecção congênita pelo *T. gondii* são aparentemente normais ao nascimento; os sinais e sintomas da doença se manifestam semanas, meses ou anos mais tarde atingindo 76% dos casos observados em um período de seguimento de 6 meses a 4 anos. Em muitos casos, no entanto, isto se deve ao reconhecimento tardio da doença e não à demora do início dos sinais e sintomas (1,8).

Estas crianças podem, subseqüentemente, desenvolver seqüelas, incluindo coriorretinite, estrabismo, cegueira, hidrocefalia ou microcefalia, retardo neuropsicomotor, epilepsia ou surdez (1,4,8).

A prevalência de alteração auditiva periférica transitória foi de 12,5% e de alteração do processamento auditivo central foi de 33,3% em crianças entre 0 e 2 anos de idade, portadoras de toxoplasmose congênita (73).

Outro estudo relatou que em 1054 crianças com idade entre um e quatorze anos, 70 apresentaram anticorpos IgM reagente para toxoplasmose (6,6%). E, destas últimas 49 apresentaram dano auditivo em diferentes graus (4,6%) (74).

Ainda é difícil estabelecer a frequência de infecção subclínica, pois a maioria dos estudos foi retrospectiva e, tiveram a presença de alterações clínicas como base diagnóstica para acompanhamento dos bebês. Couvrer *et al.* demonstraram, em estudo prospectivo, que 55% das crianças tiveram infecção subclínica (1). No Brasil, Sáfadi *et al.* relataram que a apresentação subclínica da doença ocorreu em 88% dos casos, com desenvolvimento de manifestações neurológicas e de coriorretinite em 51% e 95% das crianças, respectivamente (75).

4.8.3 Alterações oculares

A seqüela mais freqüente em toxoplasmose congênita é ocular (coriorretinite) seguida de calcificações intracranianas e de hidrocefalia (1,48).

Entre as alterações oculares, a mais comum foi a coriorretinite (92%), associada em 71% dos casos com outras lesões oculares. A segunda alteração ocular mais comum foi microftalmia e estrabismo, em estudo realizado na Bulgária (76).

A idade no início do sintoma ocular variou desde um mês até 9 anos de idade, aproximadamente, no estudo de Wilson *et al.* Seqüelas neurológicas foram observadas menos freqüentemente do que a coriorretinite e foram sempre acompanhadas de lesão ocular (4).

Inicialmente, Koppe *et al.* mostraram que 20%-80% das crianças afetadas congenitamente desenvolveram doença ocular durante acompanhamento de 20 anos.

A maioria delas apresentou lesões durante os primeiros dois anos de vida (77). Estes dados sugerem que, se as crianças infectadas no período pré-natal não desenvolvem lesões precocemente, é menos provável que elas desenvolvam coriorretinite mais tarde (78,19).

Alguns estudos mostraram o benefício do tratamento durante o primeiro ano de vida entre as crianças afetadas, quanto ao desenvolvimento de lesões oculares e as recorrências (19,20).

McAuley *et al.*, mostrou que a incidência de lesões retinianas em pacientes com toxoplasmose congênita subclínica ao nascimento foi de 30%, variando entre 23% dentro dos primeiros quatro anos de vida e 50% após os cinco anos de idade. Este estudo mostrou, também, que não houve progressão ou desenvolvimento de novas lesões durante o primeiro ano de vida quando estas crianças estavam sendo tratadas, embora tenha havido um pequeno número de recorrências tardias (6,8%). Além disso, os fatores que contribuíram para as incapacidades mais importantes incluíram demora no estabelecimento do diagnóstico e no início da terapia. O dano visual ocorreu em 100% dos pacientes não tratados e em 30,7% dos pacientes tratados (20).

Mets *et al.* desenvolveram um estudo prospectivo longitudinal, que identificou cicatriz de coriorretinite como o achado ocular mais comum em todos os pacientes (58% nos tratados e 82% nos pacientes não tratados). Cicatriz macular esteve presente em 54% dos pacientes tratados (41% bilaterais) e em 76% daqueles que não receberam tratamento (23% bilaterais). Neste último grupo a recorrência de lesões foi maior (19).

A incidência de retinocoroidite em pessoas congenitamente infectadas nascidas na Inglaterra foi de 25% após um a seis anos de acompanhamento. A expectativa para desenvolvimento de sintomas de reativação da retinocoroidite, a longo prazo foi de 20% (68).

Em um estudo de coorte mais recente os autores encontraram que 24% das crianças desenvolveram pelo menos uma lesão de retinocoroidite, durante um tempo mediano de acompanhamento de seis anos (5 a 14 anos). Quanto à idade no diagnóstico da primeira lesão retiniana, os autores observaram que 3% ocorreram no primeiro mês, e 12% no primeiro ano de vida. A metade das lesões iniciais foi diagnosticada no primeiro ano de vida, 58% antes dos dois anos, 76% antes dos cinco anos, e 95% antes dos dez anos. Em 13% dos pacientes as lesões estavam ativas no momento do diagnóstico. Em 69% dos casos a acuidade visual foi normal. Os autores concluíram que os pais de crianças com toxoplasmose congênita devem ser informados que o início tardio de lesões retinianas pode ocorrer muitos anos após o nascimento, mas o prognóstico ocular é satisfatório quando a infecção é identificada precocemente e adequadamente tratada (79).

Já o estudo de Gilbert *et al.*, sugere que 2/3 da toxoplasmose ocular diagnosticada em adultos é causada por infecção pós-natal. Os autores referem também que estudos de coorte mais recentes mostraram frequência de 22% de retinocoroidite entre crianças com TC. A idade em que ocorrem os primeiros sintomas oculares e a associação destes com outros sintomas sugestivos de TC são as características clínicas que podem auxiliar a distinção entre infecção pelo *T.gondii* pré ou pós-natal (80).

No Brasil, alguns estudos mostram que cicatriz macular bilateral decorrente de TC foi a maior causa de diminuição da acuidade visual (43,4%) em um ambulatório de estudo de acuidade visual entre pacientes com idade inferior a quatorze anos, na Universidade Estadual de Campinas em São Paulo (78).

Um outro estudo realizado em Erechim (RS) identificou prevalência de 21,3% de toxoplasmose ocular entre indivíduos com treze anos de idade ou mais. Os autores consideraram tal prevalência 30 vezes maior do que estimativas prévias de ocorrência de toxoplasmose ocular descrita em outros estudos (81).

4.8.4 Manifestações neurológicas

Entre as manifestações mais comuns encontra-se a hidrocefalia, presente ao nascimento ou logo após, e geralmente progressiva; convulsões, opistótono, paralisia de extremidades e *stress* respiratório. Observou-se maior proporção de casos de crianças com alterações do sistema nervoso central (SNC) associadas à coriorretinite (23%) do que lesões do SNC sem comprometimento ocular (2,2%) (1).

Em relação ao prognóstico, o estudo colaborativo de Chicago demonstrou que 70% das crianças que tiveram grave envolvimento neurológico, incluindo hidrocefalia, microcefalia e calcificações múltiplas, e dano oftalmológico (incluindo lesão macular) ao nascimento, mas que foram tratadas por um ano, apresentaram desenvolvimento normal (20). Roizen N *et al.* encontraram resultados similares no acompanhamento neurológico de 36 crianças com toxoplasmose congênita (21).

Ao avaliar a evolução de calcificações intracranianas de crianças com toxoplasmose congênita tratada, foi observada a diminuição ou resolução em 75%

dos casos, em torno de 1 ano de idade. O tratamento menos intensivo ocorreu em 33% das crianças entre as quais houve a redução de calcificações comparada com 70% dos casos em que as calcificações foram estáveis. Um pequeno número de crianças não tratadas ou tratadas por período inferior a um mês apresentou calcificações aumentadas ou estáveis durante o primeiro ano de vida. Estes achados apontam para o efeito benéfico do tratamento em crianças afetadas (22).

É importante realizar o diagnóstico diferencial entre a coriomeningite linfocítica congênita, que mimetiza toxoplasmose congênita, e a infecção por citomegalovírus (82).

4.8.5 Outras manifestações clínicas

Na toxoplasmose congênita pode-se observar ainda a prematuridade, instabilidade térmica, desordens endócrinas, síndrome nefrótica, miocardite toxoplásmica severa, calcificações hepáticas, alterações ósseas, ascite e surdez. Não existem evidências de associação de toxoplasmose congênita e Síndrome de Down ou com malformações. Para avaliar o retardo no desenvolvimento neuropsicomotor são necessários futuros estudos (1).

Finalmente, nenhum dos sinais descritos em recém-nascidos com doença congênita é patognomônico de toxoplasmose e deve-se considerar o diagnóstico diferencial com outros patógenos, incluindo citomegalovírus, vírus herpes simples, rubéola e sífilis (24).

Atualmente têm surgido estudos que tentam avaliar a associação entre os achados clínicos dos pacientes com infecção pelo *T. gondii* e os principais genótipos

deste parasito (25). Um exemplo destas pesquisas está descrito na tabela 3. Os autores observaram o predomínio do genótipo II (84,8%) nesta amostra. Genótipo I e atípico não foram encontrados em pacientes assintomáticos ou com toxoplasmose congênita benigna.

Tabela 5 – Características clínicas dos pacientes com infecção pelo *T. gondii* e relação com os principais genótipos do *T. gondii*.

Achados clínicos	Período da infecção materna, semanas	N° de casos				Total
		Tipo de <i>T. gondii</i>				
		I	II	III	Atípico	
Morte fetal	2 – 11 ^a	-	6	-	-	6
Morte neonatal	Desconhecido	1	2	-	-	3
Toxoplasmose grave	7 – 17	2	16	-	3	21
Assintomáticos ou forma benigna	15 – 38	-	43	2	-	45
RN não infectado, placenta positiva	14 – 20 ^b	4	-	-	-	4
Dados não disponíveis	10 – 31	-	6	-	1	7
Total		7	73	2	4	86

^a Uma reativação durante AIDS.

^b Uma reinfeção ou reativação.

Uma publicação mais recente do estudo colaborativo de Chicago, com estratificação conforme grau de gravidade da doença ao nascimento, refere efeito benéfico do tratamento ao longo do primeiro ano de vida com o uso de sulfadiazina, pirimetamina e ácido folínico. Entre as crianças do grupo de manifestações leves ou ausentes, não houve recorrência de lesões oculares e 85% delas apresentaram acuidade visual normal. E, no grupo de crianças classificadas como doença grave, 100% apresentaram audição normal, 80% desenvolveram função motora normal, e

64% não apresentaram recorrência de lesões, mas dano visual foi detectado em 85% dos casos (83).

4.9 Métodos diagnósticos no recém-nascido

O diagnóstico de infecção aguda pelo toxoplasma pode ser estabelecido de várias formas: pelo seu isolamento no sangue ou em fluidos corporais; pela demonstração da presença de cistos na placenta ou nos tecidos do feto ou do RN; pela observação da presença de antígenos ou de parasitas em preparações de tecidos ou fluidos corporais; pela demonstração de antigenemia, seqüência específica de ácidos nucleicos (DNA); ou por meio de testes sorológicos (1).

A avaliação diagnóstica do recém-nascido cuja mãe apresentou exames sorológicos sugestivos ou prováveis de toxoplasmose aguda na gestação deve incluir: história e exame físico, exame neurológico e oftalmológico, hemograma com plaquetas, testes de função hepática, creatinina sérica, exame do líquido cefalorraquidiano, RCP (reação em cadeia da polimerase) em amostra sérica ou do líquido, ecografia transfontanelar, tomografia computadorizada, avaliação auditiva e teste sorológico para toxoplasmose (1).

4.9.1 Exames laboratoriais

1. Hemograma com plaquetas:

Podem estar presentes leucocitose ou leucopenia. No período neonatal, observa-se freqüentemente eosinofilia, que pode ser superior a 30% da contagem diferencial de células brancas (1). Trombocitopenia é comum em crianças que

apresentam sinais clínicos de infecção ou em casos subclínicos, com aparecimento precoce de petéquias ou equimoses.

2. Exame do líquido cefalorraquidiano (LCR):

Em crianças com suspeita de infecção congênita pelo *T. gondii* o exame do LCR pode demonstrar xantocromia e pleiocitose mononuclear. Estas alterações são inespecíficas, mas a quantidade elevada de proteínas encontrada no fluido ventricular, geralmente medida em gramas por decilitro, é quase exclusiva da toxoplasmose neonatal (1). Wallon *et al.* avaliaram o desempenho de dois testes citoquímicos no líquido cefalorraquidiano em RNs com suspeita de toxoplasmose congênita: contagem de células brancas e concentração de proteínas. Os autores concluíram que não houve diferença significativa entre probabilidade pós-teste de infecção e estimativa de risco pré-teste. Também não encontraram evidência de que estes testes auxiliaram como preditores de risco de seqüelas. Então, o exame citoquímico não contribuiu significativamente no diagnóstico de infecção congênita ao nascimento (84).

3. Ecografia transfontanelar e Tomografia computadorizada:

A tomografia craniana permite a localização de calcificações intracranianas, a avaliação do tamanho ventricular e reconhecimento da atrofia cortical. Além disso, detecta calcificações que não foram vistas com ultrassonografia cerebral.

As calcificações intracranianas demonstradas mediante a realização destes testes podem ser simples ou múltiplas e, em alguns casos tem resolução com tratamento durante o primeiro ano de vida (1).

4. Diagnóstico sorológico

A maioria das crianças infectadas no período pré-natal não apresenta sintomas ao nascimento, mas há probabilidade de elas desenvolverem seqüelas no futuro. Assim, o diagnóstico depende fundamentalmente dos métodos sorológicos (1,11).

Os principais testes são as reações de Sabin-Feldman, de hemaglutinação indireta, de fixação do complemento, de imunofluorescência indireta e as reações imunoenzimáticas.

As reações imunoenzimáticas são mais estudadas e mais úteis na avaliação de recém-nascidos com possibilidade de infecção congênita.

4.9.2 Demonstração de anticorpos IgG

Os anticorpos IgG são marcadores sorológicos de imunidade ou infecção crônica (latente) porque, após um episódio de infecção aguda, eles persistem de modo estável ou com lenta diminuição da concentração. Os anticorpos maternos IgG transmitidos de modo passivo ao feto progressivamente desaparecem, com meia-vida de aproximadamente 30 dias, isto é, eles diminuem em torno de 50% a cada mês, na ausência de toxoplasmose congênita. Em casos de passagem de altos títulos ou concentrações de anticorpos maternos, este período pode se estender por mais de um ano. Desta forma, é possível fazer o diagnóstico da infecção congênita mais tardiamente a partir da persistência de anticorpos IgG aos 12 meses de vida (1). O desaparecimento ou não de IgG específica com 1 ano de idade é o padrão ouro para determinar se o bebê está infectado ou não (85).

4.9.3 Demonstração de anticorpos IgM, IgA, IgE

A presença de anticorpos IgM, IgA ou IgE no cordão umbilical ou sangue do neonato é evidência de síntese específica de anticorpos pelo feto infectado intra-útero (1).

Um único teste com resultado de IgM para toxoplasmose soro reagente não pode ser utilizado para estabelecer o diagnóstico de toxoplasmose em crianças maiores ou adultos. Por outro lado, a detecção de anticorpos IgM ou IgA para toxoplasmose no feto ou recém-nascido, nos primeiros dias de vida, geralmente é compatível com diagnóstico de infecção, na ausência de contaminação do sangue fetal ou do bebê com o sangue materno. Este resultado deve ser repetido, em um período de 3 a 4 dias (1).

A demonstração de anticorpos IgM em recém-nascidos depende primariamente da idade gestacional no momento da infecção materna. A taxa de soropositividade para anticorpos IgM quando a infecção materna ocorre na 10^a, na 20^a, ou na 30^a semana de gestação, aproximadamente, é de 10%, 20% e 60%, respectivamente (1).

Resultados negativos para anticorpos IgM não afastam a possibilidade de infecção congênita. Nestes casos o acompanhamento do bebê é fundamental para afastar ou estabelecer o diagnóstico definitivo (1).

4.9.4 Métodos sorológicos

► **Imunofluorescência indireta convencional (IFA):** teste mais utilizado no passado. Apresenta bom desempenho quanto a sensibilidade e especificidade para detecção de anticorpos IgG. Resultados falso-positivos podem ocorrer na presença de desordens do tecido conjuntivo. Esta técnica apresenta falha na demonstração de anticorpos IgM devido à possibilidade de efeito inibitório de altas concentrações de anticorpos IgG para *T. gondii* no soro. Somente 25% a 50% das crianças congenitamente infectadas apresentam anticorpos IgM específicos para *T. gondii* a partir deste teste (1).

► **Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA):** Naot & Remington relataram que a sensibilidade para anticorpos IgM ao comparar ELISA com IFA foi 72,7% e 25,4%, respectivamente, no soro de 55 recém-nascidos com toxoplasmose congênita confirmada (61). Vários estudos revelam maior sensibilidade da técnica para detecção de IgA quando comparada à detecção de IgM (1). Entre amostras de 9 recém-nascidos infectados Stepick-Biek *et al.* identificaram 44% de soropositividade para anticorpos IgM e 89% para anticorpos IgA. O período em que anticorpos IgA estão presentes pode variar desde alguns meses até um ano, mas não por período maior do que dois anos. É mais freqüente o desaparecimento em sete meses após a infecção (1,63).

A escolha da IgA para crianças contaminadas no 3º trimestre da gestação, devido à sua maior sensibilidade, apóia-se em especialistas que preferem o risco do tratamento em crianças sem infecção do que o risco de não tratar um recém-nascido com infecção (86).

► *Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (capture ELISA)*: é também denominada de ELISA “duplo sanduíche” (DS – ELISA IgM). É rotineiramente empregada por muitos laboratórios para demonstração de anticorpos IgM e IgA (1). Com essa técnica, foi possível detectar a presença de IgM específico para *Toxoplasma* em 92% das amostras de indivíduos com toxoplasmose recentemente adquirida e que eram negativas na reação de IFA-IgM. Este método demonstrou ser simples, rápido e acurado no diagnóstico de toxoplasmose aguda em adultos e na forma congênita, e mais sensível e específico do que o teste de IFA na detecção de anticorpos IgM para *T. gondii*. Esta sensibilidade maior do *capture*-ELISA IgM, pode ser atribuída ao fato de que a inibição da demonstração de anticorpos IgM pela presença de anticorpos IgG séricos no teste IFA-IgM é eliminada com esta técnica (61).

► *Enzyme-Linked Immunofiltration Assay (ELIFA)*: este método detecta 85% dos casos de infecção congênita nos primeiros dias de vida, e permite a detecção de IgE no fluido cefalorraquidiano ou soro do recém-nascido (1). No estudo de Zufferey *et al.*, a sensibilidade e especificidade do teste ELIFA em amostra de sangue do cordão foi de 94,1% e 98,6%, respectivamente (87). A combinação do perfil imunológico da mãe e bebê por método ELIFA e o método de imunocaptura quantitativo para a detecção de anticorpos IgM e IgA permitiu o diagnóstico de toxoplasmose congênita em 90% dos bebês até 1 mês de vida, 92% entre 31 a 60 dias de vida, 94% entre 61 a 90 dias de vida, e 100% entre 3 a 9 meses de idade. Assim é possível identificar precocemente a proporção de crianças congenitamente afetadas, permitindo uma estratégia de tratamento mais adequada (88).

► *Immunosorbent agglutination assay* (ISAGA): é um teste útil para demonstração de anticorpos IgM, IgA e IgE. É mais sensível e específico do que IgM IFA e IgM ELISA. O uso deste método evitaria os resultados falso-positivos pela presença do fator reumatóide. Devido a alta sensibilidade deste teste ocorre detecção de anticorpos IgM mais precocemente (entre 1 a 2 semanas após a infecção) e com duração mais prolongada quando comparado aos outros testes. O teste ISAGA-IgE é muito útil no diagnóstico de infecção aguda adquirida em gestantes e em recém-nascidos congenitamente infectados, devido à precocidade tanto da elevação quanto da queda dos seus níveis (1).

Utilizando o método ISAGA, Wallon *et al.* identificaram que a soropositividade para IgM ocorreu em 40% e em 70% dos neonatos cujas mães apresentaram soroconversão nos primeiros 2 trimestres e no 3º trimestre, respectivamente. Quanto à sensibilidade da IgA com o método ELISA, eles não encontraram um desempenho melhor do que a IgM, como relatado em outros estudos. A combinação dos testes IgM reagente ou IgA reagente resultou em aumento da sensibilidade para 73% (8). (Tabela 4). Ainda neste estudo houve evidência de 27% de resultados falso-negativos e de 1,6% de resultados falso-positivos para IgM e IgA quanto ao diagnóstico de toxoplasmose congênita.

Tabela 6 - Efeito da combinação dos resultados de IgM e IgA na sensibilidade e especificidade.

	n	IgM	IgA	IgM ou IgA reagente	IgM e IgA reagente
Sensibilidade (IC95%)	89	67% (57 - 77)	59% (49 - 70)	73% (62 - 82)	52% (41 - 62)
Especificidade (IC95%)	188	99% (96 - 100)	99% (96 - 100)	98% (95 - 100)	100% (97 - 100)

Adaptado de Wallon M, Dunn D, Slimani D, Girault V, Gay-Andrieu F, Peyron F. Diagnosis of congenital toxoplasmosis at birth: what is the value of testing for IgM and IgA? *Eur J Pediatr* 1999;158:645-649.

► *Microparticle Enzyme Immunoassay* (MEIA) e *Enzyme-Linked Fluorescent Assay* (ELFA): estas técnicas são muito utilizadas em nosso meio, mas não existem estudos, a partir de revisão sistemática no *medline* que avaliaram seu desempenho em recém-nascidos.

► Análise de *Western Blot* - IgG e IgM para os pares mães-bebês: os anticorpos IgM e/ou IgG produzidos a partir de infecção fetal podem ser diferentes daqueles produzidos pela mãe e pode ser reconhecida esta diferença a partir da análise por *Western Blot*. Resultados falso-negativos podem ocorrer após o tratamento materno. Recomenda-se que este teste seja utilizado em combinação com outros testes sorológicos para detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA específicos (1).

Ao comparar o desempenho do método *Western Blot* (IgG, IgM e IgA) com métodos sorológicos padrões como ELISA, ISAGA e IFA, para detecção de imunoglobulina específica IgM, foi observada melhor sensibilidade e especificidade do *Western Blot* em relação ao IgM-ISAGA, enquanto que este foi superior aos métodos ELISA e IFA. Entre os três isotipos (IgG, IgM e IgA) estudados com *Western Blot*, a IgA apresentou menor sensibilidade (Tabela 5) (90).

Tabela 7 – Sensibilidade e especificidade do Western Blot e IgM-ISAGA para detectar infecção por *Toxoplasma gondii* ao nascimento e três meses de idade.

Teste	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
Ao nascimento		
Western Blot (IgG,IgM,IgA)	65,2	96,1
IgM ISAGA	60,9	93,1
Aos 3 meses		
Western Blot (IgG,IgM,IgA)	82,6	96,6
IgM ISAGA	69,6	100

► Desempenho dos testes quanto à amostra (sangue do cordão, sangue venoso, amostra em papel filtro):

A especificidade global foi melhor nos testes realizados no sangue neonatal (98%) quando comparada aos realizados no cordão umbilical (90%). A análise multivariável mostrou associação independente entre idade gestacional no momento da infecção e positividade de IgM e IgA no sangue do cordão ou sangue do RN. Infecções adquiridas na primeira metade da gestação resultam em deficiente resposta imunológica do feto. A síntese de anticorpos no feto inicia após a 22^a semana de gestação, o que resulta em falha na detecção de anticorpos IgM e IgA antes deste período (Tabela 6) (23).

Tabela 8 – Desempenho de testes diagnósticos em recém-nascidos

Teste	Sangue do Cordão (%)			Sangue do RN (%)		
	IgM	IgA	IgM e IgA	IgM	IgA	IgM e IgA
Sensibilidade	41	64	66	43	66	70
Especificidade	96	92	90	99	99	98

Adaptado de: Naessens A, Jennum PA, Pollak A, Decoster A, Lappalainen M, Villena I, et al. Diagnosis of congenital toxoplasmosis in the neonatal period: a multicenter evaluation. *J Pediatr* 1999;135:714-9.

Outro estudo relatou que não houve diferença estatisticamente significativa quanto à sensibilidade em amostra sérica comparada ao sangue do cordão para detecção de anticorpos IgM e IgA. Entretanto, ambos os testes foram considerados mais específicos quando foi utilizado o sangue venoso (89).

Para avaliar a viabilidade de um programa de rastreamento neonatal, Lebech *et al.* detectaram anticorpos IgM para toxoplasma através de papel filtro. Resultados positivos de IgM e/ou IgA nas seis primeiras semanas de vida foram observados em

83% das crianças com toxoplasmose congênita. Nas demais, o diagnóstico foi estabelecido pela persistência de anticorpos IgG aos 12 meses de vida. A taxa de falsos-positivos através de papel filtro foi de 0,19/1.000 (5).

► *Polymerase chain reaction assay* (PCR): existem numerosos estudos que avaliaram o desempenho desta técnica no diagnóstico de infecção fetal a partir de líquido amniótico. O desempenho do teste, realizado antes de 18 semanas de gestação é desconhecido. A especificidade para o diagnóstico pré-natal de toxoplasmose congênita tem sido relatada como próxima a 100%. Em contraste, a sensibilidade varia muito de acordo com a idade gestacional no momento da infecção materna. A sensibilidade da RCP no diagnóstico pré-natal é maior quando a infecção materna ocorre entre 17 e 21 semanas quando comparada com a sua ocorrência após 21 semanas ($P < 0,02$) (91,92).

Assim, os recém-nascidos de mães que adquiriram infecção durante a gestação devem ser avaliados quanto à possibilidade de infecção congênita, mesmo com resultado negativo em RCP realizado em líquido amniótico.

Também é possível utilizar a detecção de genes de *T. gondii* em fluido cerebral, humor aquoso, lavado broncoalveolar e amostras teciduais ou séricas. Para diagnóstico pós-natal o estudo de Fuentes *et al.* demonstrou que uma perspectiva seria o uso de amostras de urina para detecção do *T. gondii* (93).

4.10 Tratamento pós-natal

Remington *et al.* recomendam terapia específica para casos de toxoplasmose congênita em crianças menores de um ano de idade. Poucos dados são disponíveis para avaliar o tratamento em crianças infectadas assintomáticas. A avaliação da eficácia do tratamento na toxoplasmose é difícil devido à variabilidade na gravidade e resultados da infecção. O parasita provavelmente nunca é eliminado completamente mediante terapia específica e a cura da doença depende do genótipo de parasito envolvido, dos órgãos comprometidos e do tempo de duração da infecção no início do tratamento. A terapia é benéfica contra a forma taquizoíta, mas não tem erradicado a forma cística, especialmente no sistema nervoso central e olhos (1).

O uso concomitante de pirimetamina e sulfadiazina tem sido associado à resolução dos sinais de toxoplasmose ativa, usualmente em poucas semanas após início da terapia. Estas duas drogas têm ação sinérgica contra o *T. gondii* e estão indicadas em todos os casos da doença (1). Remington *et al.* recomendam que a duração do tratamento com sulfadiazina associada à pirimetamina deve ser de 1 ano. Contudo, em alguns locais da Europa o tratamento é mantido durante os dois primeiros anos de vida (1).

O ácido fólico deve ser usado durante o tratamento com pirimetamina e por uma semana após a terapia com pirimetamina, para minimizar o seu efeito de depressão medular.

Pouca informação está disponível em relação ao uso de espiramicina no recém-nascido com toxoplasmose congênita e este medicamento não tem sido usado de rotina nos Estados Unidos. Entretanto, segundo Couvrer, o tratamento com

sulfadiazina e pirimetamina pode ser intercalado com ciclos de espiramicina, conforme o detalhamento a seguir (9):

- Doença clinicamente manifesta: usar sulfadiazina com pirimetamina (tratamento 1) durante 6 meses. Nos seis meses seguintes, ciclos de trinta dias do tratamento 1 alternados com trinta dias de uso de espiramicina (tratamento 2).

- Toxoplasmose Congênita subclínica: tratamento 1 por seis semanas, seguido de seis semanas de tratamento 2, alternado com quatro semanas de tratamento 1, até completar um ano de tratamento.

- Corticóide: usa-se a prednisona, na dose de 1-2mg/Kg/dia, de 12 em 12h, VO, por 3 a 4 semanas ou enquanto persistirem os sinais inflamatórios. Está indicada quando ocorre hiperproteinoorraquia $\geq 1\text{g/dl}$ ou coriorretinite ativa.

O grupo colaborativo de Chicago orienta que, ao ser confirmado o diagnóstico de toxoplasmose congênita, o tratamento com a associação de sulfadiazina + pirimetamina + ácido folínico deve se estender até a criança completar 1 ano de vida (1,94).

RNs assintomáticos, com resultados sorológicos inconclusivos, cujas mães apresentam diagnóstico comprovado de toxoplasmose aguda na gestação ou muito provável devem iniciar tratamento empírico com sulfadiazina, pirimetamina e ácido folínico (tratamento 1) e manter durante 1 mês. Neste momento deverá ser solicitado exame sorológico e, se a concentração de IgG reduzir à metade, IgM for soro não reagente, RCP negativo e RN assintomático, suspender tratamento e manter acompanhamento (1,9,94).

O grau de evidência é B para o tratamento da toxoplasmose em crianças.

► Medicamentos (1)

Sulfadiazina:

Dose: 100mg/Kg/dia, dividida em 2 doses iguais (12/12 horas).

Apresentação: comprimidos de 500mg.

Preparo: Diluir 1 comprimido em 5ml de água destilada (1ml=100mg).

Efeitos colaterais: discrasias sangüíneas, lesão renal (hematúria, cristalúria, anúria), reações de hipersensibilidade, anorexia, vômitos e outros, como hepatite, hipotireoidismo, artrite, distúrbios neuropsíquicos.

Pirimetamina:

Dose de ataque: 2mg/Kg/dia por dois dias, e após, 1mg/Kg/dia, dose única diária. Se necessário, manter tratamento até um ano de idade, após 2-6 meses alterar o intervalo para dias alternados (segundas, quartas e sextas-feiras).

Apresentação: comprimidos de 25mg.

Preparo: Diluir 1 comprimido em 5ml de água destilada (1ml=5mg).

Efeitos colaterais: depressão medular reversível com a suspensão temporária da droga ou uso concomitante de ácido folínico. Também pode causar náuseas, vômitos, dores abdominais.

Dose de manutenção: 10mg, 3 vezes por semana (segundas, quartas e sextas-feiras).

Aumentar a dose conforme o necessário para toxicidade da pirimetamina – número de neutrófilos absolutos abaixo de 1000. A pirimetamina deve ser temporariamente suspensa se este número for inferior a 500. Neutropenia persistente apesar da interrupção da pirimetamina pode ser causada pela sulfadiazina.

Apresentação: comprimidos de 15mg.

Preparo: Diluir em 3ml de água destilada (1ml=5mg).

Espiramicina:

Dose: 100mg/Kg/dia, 6/6h.

Apresentação: comprimidos de 250mg.

Preparo: Diluir em 5ml de água destilada (1ml=50mg).

Efeitos colaterais: a espiramicina é menos tóxica do que o esquema anterior. Pode causar náuseas, vômitos, diarreia, sendo raros os fenômenos de hipersensibilidade.

4.11 Acompanhamento pós-natal

Recomenda-se a sorologia para toxoplasmose mensalmente ou a cada dois meses. Se IgG for soro não reagente aos seis ou oito meses de idade afasta-se o diagnóstico de toxoplasmose congênita (1,94).

Em crianças com infecção congênita o controle de cura é essencialmente clínico, já que as provas sorológicas só se normalizam vários meses após a cura clínica, com títulos estáveis de anticorpos IgG.

Durante o tratamento deve-se monitorizar toxicidade medicamentosa mediante solicitação de hemograma completo com plaquetas 1 a 2 vezes por semana, durante a administração diária de pirimetamina e de 1 a 2 vezes por mês durante a administração de pirimetamina em dias alternados. Além disso, deve-se realizar controle de peso semanalmente, para adequação das doses.

Devido ao risco de reativação da doença, especialmente na localização ocular, as crianças com infecção congênita, devem ser submetidas a exame oftalmológico regularmente, com 3 e 6 meses, semestrais até os 3 anos de idade e, a seguir,

anualmente. Em adição a estes cuidados, as avaliações auditivas e neurológicas devem ser realizadas periodicamente (1,94,95).

A interpretação de testes diagnósticos em toxoplasmose congênita e em toxoplasmose aguda materna é complexa considerando a variabilidade de métodos existentes. Portanto, é necessário o acompanhamento do recém-nascido para afastar ou estabelecer diagnóstico definitivo.

4.12 Prevenção

Atualmente o objetivo principal no manejo clínico e epidemiológico da infecção pelo *T. gondii* em gestantes é reduzir a ocorrência de infecção aguda em pacientes suscetíveis, a transmissão vertical e a frequência e gravidade das seqüelas entre crianças afetadas, salientando-se a coriorretinite e o comprometimento neurológico.

As medidas adotadas para a prevenção da toxoplasmose congênita podem variar de acordo com diferentes países, entretanto, as estratégias têm como base quatro objetivos (96):

- Identificar as mulheres suscetíveis e limitar o risco de contaminação durante a gravidez;
- Identificar o mais precocemente possível o diagnóstico na gravidez e evitar ou limitar a transmissão ao feto;
- Após o diagnóstico de soroconversão materna realizar o diagnóstico de toxoplasmose fetal e tratar o feto intra-útero;
- Diagnosticar e tratar ao nascimento os casos de toxoplasmose congênita, mesmo clinicamente inaparentes, para prevenir o risco de reativação e complicações tardias.

4.12.1 Prevenção Primária

A prevenção primária consiste na identificação dos fatores de risco envolvidos na infecção aguda em gestantes e fornecer recomendações específicas para evitar a doença entre gestantes suscetíveis (30-32). É, ainda, uma das

abordagens mais efetivas conforme demonstrado em alguns estudos. Foulon *et al.* demonstraram redução da taxa de soroconversão: a taxa, que era de 1,43% quando não era proporcionada nenhuma recomendação específica, foi de 0,95% quando recomendações por escrito eram dadas às mulheres soronegativas antes da gravidez ou por ocasião da 1ª consulta pré-natal. Esta redução de 34% da taxa de soroconversão não foi estatisticamente significativa; mas, em um estudo posterior, os autores observaram 63% de redução na taxa de soroconversão (de 1,43% para 0,53%) (14,97,98).

O Centro de Controle de Doenças e Prevenção, de Atlanta (EUA), sugere as recomendações contidas no quadro 2, para a prevenção primária em gestantes suscetíveis (28).

<ul style="list-style-type: none">• O alimento deve ser cozido em temperaturas adequadas. Um termômetro de alimentos deve ser usado para medir a temperatura interna da carne para assegurar que ela está totalmente cozida. Carne de gado, ovelha e de vitela devem ser cozidas a 63°C. Carne de porco e de caça deve ser cozida a 71°C antes de consumir. Todas as aves devem ser cozidas a 82°C.
<ul style="list-style-type: none">• Frutas e vegetais devem ser descascados ou bem lavados antes de consumir.
<ul style="list-style-type: none">• Pratos e utensílios, e mãos devem ser sempre lavados com água e sabão após o contato com carne, aves e frutos do mar crus, ou frutas e vegetais não lavados.
<ul style="list-style-type: none">• Gestantes devem usar luvas para praticar jardinagem e durante contato com o solo ou areia porque os resíduos dos gatos podem estar no solo ou areia. Após jardinagem ou contato com solo ou areia as mãos devem ser bem lavadas.
<ul style="list-style-type: none">• Gestantes devem evitar trocar a caixa de excreções dos gatos. Se isto não for possível, devem usar luvas e lavar bem as mãos, após. Trocar esta caixa diariamente porque os oocistos do <i>T. gondii</i> necessitam vários dias para se tornarem infectantes. Gestantes devem ser encorajadas a manter seus gatos em casa e não criar ou manusear gatos perdidos. Gatos devem ser alimentados somente com produtos comerciais enlatados ou secos ou alimentos bem cozidos.
<ul style="list-style-type: none">• Educação em saúde para mulheres em idade reprodutiva deve incluir informações sobre prevenção da toxoplasmose relacionada com consumo de carne e contato com o solo. Os profissionais de saúde devem prover informações sobre higiene dos alimentos e prevenção da exposição às fezes dos gatos na primeira visita pré-natal.
<ul style="list-style-type: none">• Profissionais de saúde devem informar às gestantes sobre dois potenciais problemas relacionados com os testes sorológicos para <i>Toxoplasma</i>. Primeiro, não existem testes que possam determinar precisamente quando ocorreu a infecção inicial pelo <i>Toxoplasma</i>. Segundo, em uma população com baixa incidência de infecção pelo <i>Toxoplasma</i>, como nos Estados Unidos, por exemplo, uma substancial proporção de resultados positivos para IgM podem ser devidos a resultados falso-positivos, provavelmente.
<ul style="list-style-type: none">• O governo e a indústria da carne de gado devem continuar com os esforços para reduzir a contaminação pelo <i>Toxoplasma</i>.

Quadro 2 – Recomendações para prevenção primária em gestantes suscetíveis.

4.12.2 Prevenção Secundária

A segunda medida preventiva é a identificação de gestantes agudamente infectadas para que sejam adotadas medidas para avaliar a infecção fetal e, ainda, reduzir a incidência e gravidade das seqüelas com o início do tratamento. Entretanto, até o presente momento não existem evidências quanto ao efeito do tratamento materno na redução da transmissão vertical (14,52).

A terceira intervenção preventiva é o tratamento de recém-nascidos infectados. Quanto mais precoce o início da terapia após o nascimento, melhores resultados são alcançados em relação ao desenvolvimento de seqüelas (14,86).

4.13 Estratégias para prevenção da Toxoplasmose Congênita em diferentes países europeus – “Simpósio Europeu sobre Toxoplasmose Congênita”

Em 2002, em Paris, foi realizado o Simpósio Europeu sobre toxoplasmose congênita, oportunidade em que nove países europeus apresentaram as estratégias adotadas para prevenção específica de acordo com as condições epidemiológicas locais. Estas estratégias são apresentadas a seguir (99).

4.13.1 Bélgica

As estratégias para prevenir a toxoplasmose congênita são baseadas em educação em saúde para evitar a infecção pelo *T. gondii* durante a gestação, e no uso de tratamento com antibióticos após a infecção materna. O autor justifica o tratamento materno com base em estudos que mostram o seu efeito na redução de seqüelas, embora não se observe redução da transmissão vertical. Além disso, seriam necessários, aproximadamente, 20 anos para obtermos evidências sobre efeito do tratamento nas seqüelas oculares, com base em ensaios clínicos randomizados (100). Adicionalmente, 51% das gestantes são soropositivas para *T. gondii*, uma situação desfavorável dada a alta prevalência. A incidência estimada de toxoplasmose primária em gestantes é 8,5/1.000 e, no mínimo, 2/1.000 recém-nascidos nascerão

com toxoplasmose congênita. Esta alta prevalência, na opinião do autor justifica a estratégia de rastreamento para toxoplasmose durante a gestação (101).

4.13.2 França

Na França, a toxoplasmose é uma das doenças congênitas mais freqüentes. Em todos os países ela é sempre uma das infecções congênitas mais graves. Isto justifica intervenções preventivas importantes e que são recomendadas desde a sua implantação, em 1978. O autor refere que a partir da identificação das pacientes suscetíveis são abordadas medidas de prevenção primária e controle sorológico mensal até o término da gestação. Refere ser uma intervenção onerosa e que gera uma apreensão à mãe a cada resultado. O problema mais complexo surge com os resultados sorológicos positivos, considerando a dificuldade de determinar o momento da infecção, exigindo repetição de exames em 2 semanas de intervalo e a utilização do teste de avidéz de IgG que apresenta alta especificidade. E mesmo com estes recursos somados ao conhecimento da cinética dos anticorpos ainda é difícil identificar o momento preciso da infecção materna. Após identificação da infecção aguda materna é realizada amniocentese a partir da 18ª semana de gestação visando diagnóstico de infecção fetal. É realizado tratamento materno de acordo com este diagnóstico. Se a mãe apresenta teste sorológico compatível com infecção na gestação ou, se não realizou rastreamento, o recém-nascido deve ser investigado quanto à possibilidade de infecção congênita. Se os testes confirmarem o diagnóstico o tratamento deve ser realizado até 1 ou 2 anos de idade. O autor conclui que cada

país deve adotar as estratégias preventivas de acordo com suas características epidemiológicas locais (102).

4.13.3 Alemanha

Na Alemanha existe um programa que estimula a gestante com razoável suspeição de infecção por toxoplasmose realizar teste sorológico. “Razoável” suspeição é definida do ponto de vista clínico, porém esta estratégia ignora o fato de que a maioria das mulheres que desenvolvem a infecção são assintomáticas, permanecendo o risco de transmissão transplacentária. Esta situação levou à avaliação da prevalência de infecção durante a gestação e de infecção congênita que atingiu 0,7%, e 0,3/10.000 nativos, respectivamente, com ocorrência de manifestações graves em 10% dos bebês infectados. Com base nestes dados, os pesquisadores defenderam a introdução de um programa nacional de rastreamento para toxoplasmose em gestantes nos 10 anos subseqüentes. Recomendaram a inclusão de *guideline* oficial para diagnóstico de infecção pelo *T. gondii* antes de tratamento para infertilidade, antes da concepção, durante a gestação, no recém-nascido, na infância, bem como definição de caso e classificação da doença. Também foi considerado que um importante elemento para o *guideline* seria assegurar um programa de qualidade, com a publicação de recomendações oficiais para o tratamento de mulheres infectadas e seus bebês, além de um sistema de referência para laboratórios e instituições. Considerando que, em 2001, somente 39 casos de toxoplasmose congênita foram registrados, e que a eficácia do tratamento é controversa e, ainda, que a maioria dos países europeus não adotou programa

nacional de rastreamento, o Ministério da Saúde da Alemanha não aprovou esta proposta e o programa não foi implantado (103).

4.13.4 Áustria

Em 2002, na Áustria, foi introduzido um incentivo de 14,53 € por dia, desde o nascimento do bebê até seu terceiro aniversário, com soma total aproximada de 16.000 €, para incentivar a aderência ao programa, que atinge quase 100% de participantes. Existe uma estimativa de que 35 a 37% das mulheres em idade reprodutiva são soropositivas e a frequência estimada de infecção primária suspeita é de 3 a 6/1.000 gestantes, e de infecção antenatal pelo *Toxoplasma* é de apenas 0,1/1.000. De acordo com o conceito de que existe um período de incubação fetal prolongado, o diagnóstico precoce da infecção primária e tratamento imediato pode ser útil para prevenir a transmissão vertical do *T. gondii*, o que explicaria o sucesso da estratégia na Áustria. Estima-se, também, que o programa implantado há 27 anos preveniu mais de 5.000 casos de infecção antenatal pelo *T. gondii* ou toxoplasmose congênita, o que justifica a permanência da estratégia na Áustria (104).

4.13.5 Finlândia

Atualmente não existe um programa de rastreamento sistemático, na Finlândia, entretanto, estes procedimentos são práticas comuns no país (105).

4.13.6 Itália

Desde 1994, é oferecido rastreamento para toxoplasmose durante o pré-natal. A recomendação é de incluí-lo no período pré-concepcional ou precocemente na gestação, com informações sobre prevenção primária e aplicação de reteste em casos suscetíveis (sem definição de intervalo). Em casos de IgM reagente testes confirmatórios (IgA, IgG e Avidéz de IgG) e prevenção secundária com espiramicina são realizados. Em caso de infecção fetal ciclos de sulfadiazina-pirimetamina e ácido fólico, intercalados com espiramicina são iniciados. Abortamentos são considerados quando achados clínicos são observados. Embora estas recomendações sejam seguidas na prática clínica, procedimentos padrões não estão estabelecidos e pouco se conhece a respeito da extensão do problema, uma vez que a toxoplasmose ainda não é uma doença de notificação e não há uma política oficial ou pesquisas que representem a população do país (106).

4.13.7 Noruega

No país as estratégias adotadas são de prevenção primária e de rastreamento sorológico para gestantes de risco. Esta indicação inclui: (a) as mulheres que residem em áreas de risco (Oslo e Sul da Noruega); (b) as mulheres que viajaram para fora da Escandinávia durante a gestação, especialmente imigrantes suscetíveis visitantes de seu país de origem; (c) mulheres com gatos em casa; (d) mulheres com sinais e sintomas similares à influenza (107).

4.13.8 Portugal

A prevalência de toxoplasmose na população varia de 35% no Sul a 70% no Norte. Em gestantes a esta prevalência situa-se entre 30% e 60%. Não existe uma estimativa nacional de infecção na gestação e de infecção congênita. Pesquisas realizadas no Instituto Nacional de Saúde sugerem que a prevalência de infecção congênita é de 1,1/1.000 nascimentos, resultando em 124 casos por ano.

Não existe legislação que torne obrigatória a realização de rastreamento para a infecção, entretanto, em 2000, as orientações para prevenção foram propostas pela Direção desta Instituição. São adotadas medidas de prevenção primária, secundária e terciária, com protocolo semelhante à maioria dos locais já apresentados. Em Portugal é permitida a interrupção da gestação na presença de infecção materna confirmada. É estimado que 70% das gestantes, em Portugal, realizam triagem sorológica e, entre estas, em torno de 50% seguem a vigilância corretamente, razão pela qual o número de casos de toxoplasmose congênita pode ser superior ao estimado (108).

4.13.9 Reino Unido

Em 1998, os serviços de referência para pacientes com infecção por *T. gondii* foram centralizados e fundados pelo Serviço Nacional de Saúde Pública. Os benefícios observados com esta medida incluíram o uso de protocolos, critérios diagnósticos e aumento de dados epidemiológicos relacionados à infecção pelo *Toxoplasma*. Atualmente é recomendada a prevenção primária com distribuição de panfletos contendo orientações quanto às medidas para evitar esta infecção, embora

contenham adicionalmente informações relacionadas às outras possíveis infecções.

A incidência estimada de infecção congênita pelo *Toxoplasma*, entre 1998 e 2001, foi de 3,5/100.000 nativos, atingindo 21 bebês ao ano. Os autores referem que estes dados podem estar subestimados.

No Reino Unido não há um programa nacional de rastreamento durante a gestação ou neonatal. Como a toxoplasmose congênita não é notificada, dados oficiais quanto à ocorrência de infecção congênita pelo *T. gondii* não são disponíveis (109).

4.14 Perspectivas para o futuro

O uso de vacinas contra toxoplasmose tem como objetivo reduzir o dano fetal a partir da redução do número de cistos teciduais de *T. gondii* em animais e pela prevenção da formação de oocistos em gatos. Estes objetivos não são todos viáveis com o uso de uma única vacina. Até o momento não há vacinas efetivas para imunização contra *T. gondii* (29).

A prevenção da eliminação de oocistos pelos gatos é a chave para o controle da disseminação do *T. gondii*. Os gatos se infectam principalmente pela ingestão de cistos teciduais contidos na musculatura de outros animais. Estudos recentes indicam que, após esta infecção primária, a imunidade não é permanente, já que eles podem voltar a liberar oocistos no ambiente. Para adquirir imunidade, é necessária a ingestão de bradizoítos vivos. Após inoculação oral de uma nova vacina contendo bradizoítos vivos T-263, o ciclo coccidiano é interrompido no estágio sexuado e se desenvolve apenas um gameta; assim, os oocistos não são produzidos (29).

Um dos objetivos de vacinar animais de fazendas é reduzir o risco resultante da exposição de seres humanos à ingestão de carnes contaminadas. Gatos e roedores são importantes fatores de risco para infecção pelo *T. gondii* em suínos. Pesquisas sorológicas indicam que esta prevalência de infecção em suínos foi reduzida através de modernos sistemas de confinamento destes animais, evitando contato com gatos e roedores. Estas medidas reduziram a transmissão para seres humanos (29).

Congelamento da carne por um dia, no freezer a -12°C , cozimento com temperatura interna de 67°C ou irradiação gamma (0.5kGy) podem inviabilizar os cistos teciduais em carnes (29).

4.15 Considerações metodológicas

Muitos estudos foram desenvolvidos com o objetivo de avaliar o efeito do tratamento antenatal na transmissão vertical e na presença de manifestações clínicas. Entretanto, é possível identificar várias dificuldades metodológicas quando estudos observacionais são utilizados para avaliar o efeito do rastreamento e tratamento antenatal como estratégias preventivas. Estes potenciais vieses foram descritos por Thiébaud *et al.* com o objetivo de prover uma forma de interpretar estes dados e propor diferentes soluções para minimizar ou, pelo menos, quantificar estes vieses, auxiliando na implementação de futuros estudos e estão descritos a seguir (110):

O viés de seleção pode ser consequência do encaminhamento de gestantes com suspeição de doença aos serviços de referência. Se, adicionalmente, houver suspeição de sinais no feto, o diagnóstico de soroconversão e de infecção fetal são realizados ao mesmo tempo. Deste modo, não haveria tempo suficiente para permitir

o efeito do tratamento na transmissão da doença. Além disso, estes casos encaminhados poderiam contribuir para subestimar ou superestimar o efeito do tratamento se forem considerados tratados ou não tratados, respectivamente. Os autores recomendam que para evitar este viés, na população estudada, deveriam estar incluídas consecutivamente as gestantes que soroconverteram, identificadas a partir de rastreamento sorológico sistemático.

Outro potencial viés ocorre quando um determinado tratamento é prescrito por um motivo associado ao desfecho de interesse. Assim, as pacientes poderiam ser tratadas quando o desenvolvimento da doença é mais provável e, conseqüentemente, o efeito do tratamento poderia estar subestimado. O potencial viés de confundimento relacionado à idade gestacional no momento da soroconversão pode ser evitado restringindo a amostra incluindo apenas as pacientes que soroconverteram no último trimestre, e mesmo, assim ajustando para a idade gestacional na soroconversão para controlar algum outro fator residual.

O momento preciso da soroconversão materna é extremamente difícil de ser determinado, porque ele se encontra em um intervalo entre dois testes realizados. Uma forma de estimar esta data é inputar o ponto médio deste intervalo, mas outros métodos estatísticos também podem ser utilizados.

O viés de classificação pode ser evitado quando se utilizam critérios padronizados como proposto por Lebech *et al.*, entretanto não foram estabelecidos critérios para avaliar a presença de manifestações clínicas em crianças infectadas. É importante, também, avaliar todos os pacientes em um mesmo momento para evitar diferenças no seguimento.

Quando ocorrem perdas no seguimento deve ser apresentada uma completa descrição destes pacientes e, se relevante, uma análise de sensibilidade deveria ser realizada para avaliar o efeito das perdas no desfecho principal.

Estes autores concluíram que, o tratamento antenatal da toxoplasmose congênita está sendo usado a quase 30 anos em alguns países, mas houve um aumento em publicações que apontam para uma incerta efetividade do tratamento, principalmente relacionado à transmissão vertical. Portanto, sugerem que uma revisão sistemática e uma reanálise de dados observacionais seria mais útil para entender as evidências disponíveis, atualmente.

4.16 Conclusão

Ainda não existe consenso quanto a melhor abordagem preventiva na toxoplasmose congênita, em relação a custo-efetividade.

O Simpósio Europeu, em 2002, forneceu informações a respeito de experiências em diferentes países, e estimulou discussões com o objetivo de estabelecer as melhores estratégias de acordo com a realidade local.

Países com alta incidência de toxoplasmose na gestação, como a França e a Áustria implantaram um programa nacional de rastreamento para detecção e tratamento de todos os casos de infecção. Em países onde a doença é rara (UK, Holanda) as pacientes suscetíveis são orientadas quanto às precauções higiênicas para evitar a infecção. Outros países (Dinamarca e Polônia) adotaram posição intermediária com detecção a partir de rastreamento neonatal utilizando análise de IgM com amostra em papel filtro.

Anne Eskild & Per Magnus sugerem que diante da falta de evidências em relação ao benefício do tratamento materno devem ser estimulados ensaios clínicos randomizados, duplo-cegos, placebo-controlados. Adicionalmente, melhores estimativas sobre o ônus da doença deveriam ser realizadas, incluindo avaliação com base populacional. Os autores também sugerem avaliar o efeito da prevenção primária diretamente relacionada aos fatores de risco estabelecidos para cada população (111).

Ao comentar o estudo de Gilbert *et al.* (50), que não mostrou evidência de redução da transmissão vertical com o tratamento pré-natal, Thulliez P. relata que houve poucos casos de mulheres não tratadas e, além disso, a maioria destas soroconverteram no final da gestação. Assim, o efeito do tratamento no final da gestação não pode ser generalizado para toda a gestação. Refere, também, que a análise que comparou o tratamento pirimetamina e sulfonamida versus ausência de tratamento foi restrita à metade da população incluída no estudo, com resultados muito imprecisos (intervalo de confiança alargado). Ao estender seu comentário para o estudo de Gras *et al.* (18), que não encontrou evidência de efeito benéfico do tratamento pré-natal na ocorrência de manifestações clínicas, Thulliez P comenta o potencial efeito do viés de indicação nestes resultados. Acrescenta ainda, que a demora na instituição do tratamento pode ter ocorrido devido ao longo período de tempo necessário para a obtenção do resultado definitivo de infecção fetal mediante o teste de inoculação em ratos, padrão de referência no período estudado. O autor finaliza relatando que o tratamento atualmente recomendado em gestantes com diagnóstico prenatal é prescrever pirimetamina-sulfadiazina até o nascimento, e que os resultados destes estudos não contemplam evidências para modificá-lo (112).

É importante ressaltar que o conhecimento sobre aspectos epidemiológicos da doença como incidência em diferentes regiões, a forma predominante de contaminação, bem como a padronização e qualidade dos métodos diagnósticos, a centralização em serviços de referência e a necessidade de desenvolvimento de pesquisas com metodologia apropriada já são consenso entre *experts*. Com isto será possível atingir, no futuro, um maior grau de evidência na abordagem preventiva da toxoplasmose congênita com critérios bem definidos para implementação destas estratégias conforme a realidade local.

5 OBJETIVOS

1. Medir a prevalência de toxoplasmose aguda em gestantes utilizando testes sorológicos enzimáticos.
2. Medir a incidência de toxoplasmose congênita e a taxa de transmissão vertical em recém-nascidos, logo após o nascimento e aos 12 meses de vida.
3. Avaliar o desempenho dos testes utilizados para o diagnóstico de toxoplasmose congênita, aplicados logo após o nascimento.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DE LITERATURA

1. Remington JS, McLeod R, Thulliez P, Desmonts G. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein JO, editors. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. 6th ed. Philadelphia: WB Saunders; 2005. p.947-1091.
2. Minkoff H, Remington JS, Holman S, Ramirez R, Goodwin S, Landesman S. Vertical transmission of toxoplasma by human immunodeficiency virus-infected women. *Am J Obstet Gynecol* 1997;176:555-9.
3. Matsui D. Prevention, diagnosis, and treatment of fetal toxoplasmosis. *Clin Perinatol* 1994;21:675-89.
4. Wilson CB, Remington JS, Stagno S, Reynolds DW. Development of adverse sequelae in children born with subclinical congenital toxoplasma infection. *Pediatrics* 1980;66:767-74.
5. Lebech M, Andersen O, Christensen NC, Hertel J, Nielsen HE, Peitersen B, et al. Feasibility of neonatal screening for toxoplasma infection in the absence of prenatal treatment. *Lancet* 1999;353:1834-7.
6. Varella IS, Wagner MB, Darella AC, Nunes LM, Müller RW. Prevalência de soropositividade para toxoplasmose em gestantes. *J Pediatr* 2003;79(1):69-74.
7. Spalding SM; Amendoeira MRR.; Ribeiro LC.; Silveira C.; Garcia AP.; Camillo-Coura L. Estudo prospectivo de gestantes e seus bebês com risco de transmissão de toxoplasmose congênita em município do Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003;36(4):483-491.
8. Foulon W, Villena I, Stray-Pedersen B, Decoster A, Lappalainen M, Pinon JM, et al. Treatment of toxoplasmosis during pregnancy: a multicenter study of impact on fetal transmission and children's sequelae at age 1 year. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180:410-5.
9. Sáfadi MAP, Farhat CK. Toxoplasmose. In: Farhat CK, Carvalho ES, Carvalho LHR, Succi RCM. *Infectologia pediátrica*. 2^a ed. São Paulo: Atheneu; 1999. p. 612-9.
10. Foulon W, Naessens A, Ho-Yen D. Prevention of congenital toxoplasmosis. *J Perinat Med* 2000;28:337-45.
11. Jones JL, Lopez A, Wilson M, Schulkin J, Gibbs R. Congenital toxoplasmosis: a review. *Obstet Gynecol Surv* 2001;56:296-305.
12. Wilson M, Remington JS, Clavet C, Varney G, Press C, Ware D. Evaluation of six commercial kits for detection of human immunoglobulin M antibodies to

- toxoplasma gondii: the FDA Toxoplasmosis ad hoc Working Group. *J Clin Microbiol* 1997;35:3112-5.
13. Peyron F, Wallon M, Liou C, Garner P. Treatments for toxoplasmosis in pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2000;(2):CD001684.
 14. Foulon W, Naessens A, Ho-Yen D. Prevention of congenital toxoplasmosis. *J Perinat Med* 2000;28:337-45.
 15. Wallon M, Liou C, Garner P, Peyron F. Congenital toxoplasmosis: systematic review of evidence of efficacy of treatment in pregnancy. *BMJ* 1999;318:1511-4.
 16. The Systematic Review on Congenital Toxoplasmosis (SYROCOT) study group. Effectiveness of prenatal treatment for congenital toxoplasmosis: a meta-analysis of individual patients' data. *Lancet* 2007;369:115-22.
 17. Hohlfeld P, Daffos F, Thulliez P, Aufrant C, Couvreur J, Mac Aleese J, et al. Fetal toxoplasmosis: outcome of pregnancy and infant follow-up after in utero treatment. *J Pediatr* 1989;115:765-9.
 18. Gras L; Gilbert RE; Ades AE; Dunn DT. Effect of prenatal treatment on the risk of intracranial and ocular lesions in children with congenital toxoplasmosis. *Int J Epidemiol* 2001;30:1309-13.
 19. Mets MB, Holfels E, Boyer KM, Swisher CN, Roizen N, Stein L, et al. Eye manifestations of congenital toxoplasmosis. *Am J Ophthalmol* 1996;122:309-24.
 20. McAuley J, Boyer KM, Patel D, Mets M, Swisher C, Roizen N, et al. Early and longitudinal evaluations of treated infants and children and untreated historical patients with congenital Toxoplasmosis: The Chicago Collaborative Treatment Trial. *Clin Infect Dis* 1994;18:38-72.
 21. Roizen N, Swisher CN, Stein MA, Hopkins J, Boyer KM, Holfels E, et al. Neurologic and developmental outcome in treated congenital toxoplasmosis. *Pediatrics* 1996; 96(1):11-20.
 22. Patel DV, Holfels EM, Vogel NP, Boyer KM, Mets MB, Swisher CN, et al. Resolution of intracranial calcifications in infants with treated congenital toxoplasmosis. *Radiology* 1996;199(2):433-40.
 23. Naessens A, Jenum P, Pollak A, Decoster A, Lappalainen A, Villena I, Lebech M, Stray-Pedersen B, Hayde M, Pinon JM, Petersen E, Foulon W. Diagnosis of congenital toxoplasmosis in the neonatal period: a multicenter evaluation. *J Pediatr* 1999;135(6):714-9.
 24. Montoya JG, Lisenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet* 2004;363:1965-76.

25. Ajzenberg D, Cogné N, Paris L, Bessières MH, Thulliez P, Filisetti D, Pelloux H, Marty P, Dardé ML. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associates with human congenital toxoplasmosis and correlation with clinical findings. *J Infect Dis* 2002;186(5):684-689.
26. Fuentes I, Rubio JM, Ramirez C, Alvar J. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. *J Clin Microbiol* 2001;39(4):1566-70.
27. Jones J, Lopez A, Willson M. Congenital Toxoplasmosis. *Am Fam Physician* 2003; 67(10):2131-2138.
28. Centers for Disease Control and Prevention. CDC Recommendations Regarding Selected Conditions Affecting Women's Health. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report. Recommendations and Reports*. 2000 March 31;49(RR-2):57-75.
29. Dubey JP. Strategies to reduce transmission of toxoplasma gondii to animals and humans. *Vet Parasitol* 1996;64:65-70.
30. Cook AJ, Gilbert RE, Buffolano W, Zufferey J, Petersen E, Jenum PA, *et al*. Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. *BMJ* 2000;321:142-7.
31. Kapperud G, Jenum PA, Stray-Pedersen B, Melby KK, Eskild A, Eng J. Risk factors for toxoplasma gondii infection in pregnancy: results of a prospective case-control study in Norway. *Obstet Gynecol Surv* 1997;52:158-9.
32. Buffolano W, Gilbert RE, Holland FJ, Fratta D, Palumbo F, Ades AE. Risk factors for recent toxoplasma infection in pregnant women in Naples. *Epidemiol Infect* 1996;116(3):347-51.
33. Jenum PA, Kapperud G, Stray-Pedersen B, Melby KK, Eskild A, Eng J. Prevalence of toxoplasma gondii specific immunoglobulin G antibodies among pregnant women in Norway. *Epidemiol Infection* 1998;120:87-92.
34. Petersson K, Stray-Pedersen B, Malm G, Forsgren M, Evengård B. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* among pregnant women in Sweden. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000;79:824-9.
35. Gilbert RE, Tookey PA, Cubitt WD, Ades AE, Masters J, Peckham CS. Prevalence of toxoplasma IgG among pregnant women in West London according to country of birth and ethnic group. *BMJ* 1993;306:185.

36. Lappalainen M, Sintonen H, Koskiniemi M, Hedman K, Hiilesmaa V, Ämmälä P, et al. Cost-benefit analysis of screening for toxoplasmosis during pregnancy. *Scand J Infect Dis* 1995;27:265-72.
37. Muñoz BC, Guardiola LC, Juncosa MT, Viñas DL, Sierra SM, Sanfeliu SI, et al. Toxoplasmosis y embarazo. Estudio multicéntrico realizado em 16.362 gestantes de Barcelona. *Méd Clin (Barc)* 2004;123(1):12-6.
38. Figueiró-Filho EA, Lopes AHA, Senefonte FRA, Souza Júnior VG, Botelho CA, Figueiredo MS, Duarte G. Toxoplasmose aguda: estudo da frequência, taxa de transmissão vertical e relação entre os testes diagnósticos materno-fetais em gestantes em estado da Região Centro-Oeste do Brasil. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2005;27(8):442-9.
39. Meirelles Filho J. Toxoplasmose e gravidez: inquérito sorológico em gestantes e seus recém-nascidos na Maternidade-Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro. *J Bras Ginecol* 1985t;95:393-401.
40. Nóbrega MC, Magalhães V, Albuquerque Y, Magalhães C, Arcoverde C, Castro C. Toxoplasmose em gestantes e em seus recém-nascidos, atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco. *RBM Rev Bras Med (Cad Ginecol Obstet)* 1999;56:23-9.
41. Reis MM, Tessaro MM, D'Azevedo PA. Perfil sorológico para toxoplasmose em gestantes de um hospital público de Porto Alegre. *Rev bras ginecol obstet* 2006;28(3):158-164.
42. Neves JM, Nascimento LB, Ramos JGL, Martins-Costa SH. Toxoplasmose na gestação. *Rev bras ginecol obstet* 1994;16(6):197-202.
43. Soccol VT, Gubert IC, Carzino LC, Massuquetto SC, Soccol AC. Prevalência de toxoplasmose em gestantes através da técnica de ELISA. *Rev Méd Paraná* 2003;61(1):15-17.
44. Moreira LMO. Sorologia para toxoplasmose em uma população de gestantes da cidade de Salvador [dissertação]. Salvador (BA): Universidade Federal da Bahia; 1988.
45. Vaz AJ, Guerra EM, Ferratto LCC, Toledo LAS, Azevedo Neto RS. Sorologia positiva para sífilis, toxoplasmose e doença de Chagas em gestantes de primeira consulta em centros de saúde da área metropolitana, Brasil. *Rev Saúde Pública* 1990;24:373-9.
46. Liesenfeld O, Montoya JG, Tathinen NJ, Davis M, Brown Jr BW, Kobb KL, Parsonnet J, Remington JS. Confirmatory serologic testing for acute toxoplasmosis and rate of induced abortions among women reported to have

- positive Toxoplasma immunoglobulin M antibody titers. *Am J Obstet Gynecol* 2001;184(2):140-45.
47. European Collaborative Study and Research Network on Congenital toxoplasmosis. Low incidence of congenital Toxoplasmosis in children born to women infected with human immunodeficiency virus. *Eur J Obst Gynecol Reprod Biol* 1996;68:93-6.
 48. Dunn D, Wallon M, Peyron F, Petersen E, Peckham C, Gilbert R. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *Lancet* 1999 ;353:1829-33.
 49. Jenum PA, Stray-Pedersen B, Melby KK, Kapperud G, Whitelaw A, Eskild A, et al. Incidence of Toxoplasma gondii infection in 35.940 pregnant women in Norway and pregnancy outcome for infected women. *J Clin Microbiol* 1998;36:2900-6.
 50. Gilbert RE, Gras L, Wallon M, Peyron F, Ades AE, Dunn DT. Effect of prenatal treatment on mother to child transmission of Toxoplasma gondii: retrospective cohort study of 554 mother-child pairs in Lyon, France. *Int J Epidemiol* 2001;30:1303-08.
 51. Gilbert R, Dunn D, Wallon M, Hayde M, Prusa A, Lebech M, et al. Ecological comparison of the risks of mother-to-child transmission and clinical manifestations of congenital toxoplasmosis according to prenatal treatment protocol. *Epidemiol Infect* 2001;127:113-20.
 52. Signorell LM.; Seitz D.; Merkel S.; Berger R.; Rudin C. Cord blood screening for congenital toxoplasmosis in northwestern Switzerland. *Pediatr Infect Dis J* 2006;25(2):123-8.
 53. Gras L, Wallon M, Pollak A, Cortina-Borja M, Evengard B. The 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.
 54. Thulliez P. Screening programme for congenital toxoplasmosis in France. *Scand J Infect Dis Suppl* 1992;84:43-5.
 55. Guerina NG, Hsu HW, Meissner HC, Maguire JH, Lynfield R, Stechenberg B, et al. Neonatal Serologic screening and early treatment for congenital toxoplasma gondii infection: The New England Regional Toxoplasma Working Group. *N Engl J Med* 1994;330:1858-63.
 56. Bader TJ, Macones GA, Asch DA. Prenatal screening for toxoplasmosis. *Obstet Gynecol* 1997;90:457-64.

57. Mittendorf R, Pryde P, Herschel M, Williams M. Is routine Antenatal toxoplasmosis screening justified in the United States ? Statistical considerations in the application of medical screening tests. *Clin Obstet Gynecol* 1999;42:163-73.
58. Jeannel D, Costagliola D, Niel G, Hubert B, Danis M. What is known about the prevention of congenital toxoplasmosis? *Lancet* 1990;336:359-61.
59. Lisenfeld O, Press C, Montoya JG et al. False-positive results in immunoglobulin M (IgM) toxoplasma antibody tests and importance of confirmatory testing: the Platelia toxo IgM test. *J Clin Microbiol* 1997;35:174-78.
60. Hassl A. Efficiency Analysis of Toxoplasmosis Screening in pregnancy: Comment. Letters to the editors. *Scand J Infect Dis* 1996;28: 211-12.
61. Naot Y, Remington JS. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of IgM antibodies to toxoplasma gondii: use for diagnosis of acute acquired toxoplasmosis. *J Infect Dis* 1980;142:757-66.
62. Naot Y, Desmots G, Remington JS. IgM enzyme-linked immunosorbent assay test for the diagnosis of congenital toxoplasma infection. *J Pediatr* 1981;98:32-6.
63. Stepick-Biek P, Thulliez P, Araújo FG, Remington JS. IgA antibodies for diagnosis of acute congenital and acquired toxoplasmosis. *J Infect Dis* 1990;162:270-3.
64. Camargo ME, Silva SM, Leser PG, Granato CH. Avidéz de anticorpos IgG específicos como marcadores de infecção primária recente pelo toxoplasma gondii. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1991; 33:213-8.
65. Hedman K, Lappalainen M, Sepäiä I, Mäkelä O. Recent primary toxoplasma infection indicated by a low avidity of specific IgG. *J Infect Dis* 1989;159:736-40.
66. Hofgärtner WT, Swanzy SR, Bacina RM, Condon J, Gupta M, Matlock PE, et al. Detection of immunoglobulin G (IgG) and IgM antibodies to *Toxoplasma gondii*: evaluation of four commercial immunoassay systems. *J Clin Microbiol* 1997;35 :3313-5.
67. Evengård B, Petersson K, Engman ML, Wiklund S, Ivarsson AS, Tear-Fahnehjelm K, et al. Low incidence of toxoplasma infection during pregnancy and newborns in Sweden. *Epidemiol Infect* 2001;127(1):121-7.
68. Gilbert RE, Stanford MR, Jackson H, Holliman RE, Sanders MD. Incidence of acute symptomatic toxoplasma retinochoroiditis in south London according to country of birth. *BMJ* 1995;310:1037-1040.

69. Paul M, Petersen E, Szczapa J. Prevalence of congenital *Toxoplasma gondii* infection among newborns from the Poznan region of Poland: validation of a new combined enzyme immunoassay for *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin A and immunoglobulin M antibodies. *J Clin Microbiol* 2001;39(5):1912-6.
70. Mozzatto L, Procianoy RS. Incidence of congenital toxoplasmosis in Southern Brazil: a prospective study. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2003;45(3):147-151.
71. Neto EC, Anele E, Rubim R, Brites A, Schulte 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):941-7.
72. Segundo GRS, Silva DA, Mineo JR, Ferreira MS. Congenital toxoplasmosis in Uberlândia, MG, Brazil. *J Trop Pediatr* 2004;50(1):50.
73. Azevedo MF, Silva AAM, Guedes APS, Meneguello J, Caneschi S, Succi RCM. Achados audiológicos na toxoplasmose congênita. *Acta AWHO* 2000;19(2):96-101.
74. Muhaimed HA. Prevalence of sensorineural hearing loss due to toxoplasmosis in Saudi children: a hospital based study. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1996;34:1-8.
75. Sáfadi MAP, Berzin EM, Farhat CK, Carvalho ES. Clinical presentation and follow up of children with congenital toxoplasmosis in Brazil. *Braz J Infect Dis* 2003;7(5):325-331.
76. Vutova K, Peicheva Z, Popova A, Markova V, Mincheva N, Todorov T. Congenital toxoplasmosis: eye manifestations in infants and children. *Ann Trop Paediatr* 2002;22(3):213-8.
77. Koppe JG, Loewer-Sieger DH, de Roever-Bonnet H. Results of 20-year follow-up of congenital toxoplasmosis. *Lancet* 1986;1:254-6.
78. de Carvalho KM, Minguini N, Moreira Filho DC, Kara-Jose N. Characteristics of a pediatric low-vision population. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 1998;35:162-5.
79. Wallon M, Kodjikian L, Binquet C, Garweg J. Long-term ocular prognosis in 327 children with congenital toxoplasmosis. *Pediatrics* 2004;113:1567-1572.
80. Gilbert RE, Stanford MR. Is ocular toxoplasmosis caused by prenatal or postnatal infection? *Br J Ophthalmol* 2000;84:224-6.

81. Glasner PD, Silveira C, Kruszon-Moran D, Martins MC, Burnier Jr M, Silveira S, et al. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in Southern Brazil. *Am J Ophthalmol* 1992;114:136-44.
82. Wright R, Johnson D, Neumann M, Ksiazek TG, Rollin P, Keech RV, et al. Congenital lymphocytic choriomeningitis virus syndrome: a disease that mimics congenital toxoplasmosis or Cytomegalovirus infection. *Pediatrics* 1997;100(1):E9.
83. McLeod R, Boyer K, Karrison T, Kasza K, Swisher C, Roizen N, et al. Outcome of treatment for congenital toxoplasmosis, 1981-2004: The National Collaborative Chicago-Based, Congenital Toxoplasmosis Study. *Clin Infect Dis* 2006;42(10):1383-94.
84. Wallon M, Caudie C, Rubio S, Bellini L, Girault V, Gay-Andrieu F, et al. Value of cerebrospinal fluid cytochemical examination for the diagnosis of congenital toxoplasmosis at birth in France. *Pediatr Infect Dis J* 1998;17:705-10.
85. Pelloux H, Brenier-Pinchart MP, Fricker-Hidalgo H. Protozoan infections in humans: congenital toxoplasmosis. *Eur J of Protistology* 2003;39:444-448.)
86. Ecochard R, Landrison G, Colin C, Creac'h P, Wallon M, Gandilhon F, et al. Analyse de decision dans la toxoplasmose congénitale en l'absence de connaissance exacte des bénéfices et effets secondaires de la thérapeutique. *Rev Epidemiol Santé Publique* 1996;44:145-54.
87. Zufferey J, Hohlfeld P, Bille J, Fawer CL, Blanc D, Pinon JM, et al. Value of the comparative enzyme-linked immunofiltration assay for early neonatal diagnosis of congenital toxoplasma infection. *Pediatr Infect Dis J* 1999;18:971-5.
88. Pinon JM, Chemla C, Villena I, Foudrinier F, Aubert D, Puygauthier-Toubas D, et al. Early neonatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: value of comparative enzyme-linked immunofiltration assay immunological profiles and antitoxoplasma gondii immunoglobulin M (IgM) or IgA immunocapture and implications for postnatal therapeutic strategies. *J Clin Microbiol* 1996;34:579-83.
89. Wallon M, Dunn D, Slimani D, Girault V, Gay-Andrieu F, Peyron F. Diagnosis of congenital toxoplasmosis at birth: what is the value of testing for IgM and IgA? *Eur J Pediatr* 1999;158:645-649.
90. Tissot Dupont D, Fricker-Hidalgo H, Brenier-Princhart MP, Bost-Bru C, Ambroise-Thomas P, Pelloux H. Usefulness of Western Blot in Serological Follow-Up of Newborns Suspected of Congenital Toxoplasmosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003;22:122-125.

91. 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;97:296-300.
92. Remington JS, Thulliez P, Montoya JG. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 2004;42(3):941-945.
93. Fuentes I, Rodriguez M, Domingo CJ, Castillo F, Juncosa T, Alvar J. Urine sample used for congenital toxoplasmosis diagnosis by PCR. *J Clin Microbiol* 1996;34: 2368-71.
94. Guerina NG. Toxoplasmose. In: Cloherty JP, Stark AR, editors. *Manual de Neonatologia*. 4ª edição. Rio de Janeiro: MEDSI; 2000.p.333-343.
95. Graziano RM. Exame oftalmológico do recém-nascido no berçário: uma rotina necessária. *J Pediatr* 2002;78(3):187-8.
96. P. Ambroise-Thomas. Toxoplasmose congénitale: îls différentes stratégies préventives. *Arch Pédiatr* 2003;10(1):12-14.
97. Foulon W, Naessens A, Lauwers S, de Meuter F, Amy JJ. Impact of primary prevention on the incidence of toxoplasmosis during pregnancy. *Obstet Gynecol* 1988;72:363-6.
98. Foulon W: Congenital toxoplasmosis: Is screening desirable ? *Scand J Infect Dis Suppl* 1992;84:11-7.
99. Symposium Européen sur la toxoplasmose congénitale. *Arch Pédiatr* 2003;10(1):1-48.
100. Foulon W. Congenital toxoplasmosis: therapeutic strategies. *Arc Pédiatr* 2003;10(1):10-11.
101. Naessens A. Screening for toxoplasmosis during pregnancy: the situation in Belgium. *Arch Pédiatr* 2003;10(1):18.
102. Ambroise-Thomas P. Toxoplasmose congénitale: les différentes stratégies préventives. *Arch Pédiatr* 2003;10(1):12-14.
103. Janitschke K. Official recommendations and strategy for prevention of congenital toxoplasmosis in Germany. *Arch Pédiatr* 2003;10(1):15.
104. Aspöck H. Prevention of congenital toxoplasmosis in Áustria. *Arch Pédiatr* 2003;10(1):16-17.
105. Lappalainen M. Current situation regarding toxoplasmosis in Finland. *Arch Pédiatr* 2003;10(1):19.

106. Buffolano W. Failure to implement a preventive strategy against congenital toxoplasmosis in Italy. *Arch Pédiatr* 2003;10(1):21-22.
107. Stray-Pedersen B. Prevention of congenital toxoplasmosis in Norway. *Arch Pédiatr* 2003;10(1):23-24.
108. Ângelo M.H. Dispositions légales et stratégies préventives de la toxoplasmose congénitale au Portugal. *Arch Pédiatr* 2003; 10(1):25-26.
109. Joynson DHM. Congenital toxoplasma infection in the UK. *Arch Pédiatr* 2003;10(1):27-28.
110. Thiébaud R, Leroy V, Alioum A, Binquet C, Poizat G, Salmi LR et al. Biases in observational studies of the effect of prenatal treatment for congenital toxoplasmosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006; 124(1):3-9.
111. Eskild A, Magnus P. Commentary: Little evidence of effective prenatal treatment against congenital toxoplasmosis – the implications for testing in pregnancy. *Int J Epidemiol* 2001;30:1314-15.
112. Thulliez P. Commentary: Efficacy of prenatal treatment for toxoplasmosis: a possibility that cannot be ruled out. *Int J Epidemiol* 2001;30:1315-16.

7 ARTIGO 1

PREVALÊNCIA DE TOXOPLASMOSE AGUDA ENTRE 41.112 GESTANTES
ATENDIDAS EM UM HOSPITAL PÚBLICO NO SUL DO BRASIL

*Acute toxoplasmosis infection prevalence between 41,112 pregnant women assisted
in a public hospital in South of Brazil.*

Ivana Rosângela dos Santos Varella, Doutoranda em Epidemiologia pela UFRGS;

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL (UFRGS)

A ser enviado ao

International Journal of Epidemiology

Resumo

Introdução: A transmissão vertical da toxoplasmose pode determinar incapacidades graves como o dano neurológico e a coriorretinite em crianças afetadas. Este estudo teve como objetivo estimar a prevalência de toxoplasmose aguda nas gestantes atendidas na maternidade de um hospital público em Porto Alegre, Brasil.

Métodos: O rastreamento sorológico, durante a gestação ou no momento do parto, em todas as gestantes atendidas na maternidade, entre outubro de 1998 e dezembro de 2005, identificou aquelas que apresentaram critérios de infecção aguda, de acordo com o sistema de classificação de Lebech *et al.*, com adaptações. Até dezembro de 2001, utilizou-se o método *microparticle enzyme immunoassay* – MEIA. Em janeiro de 2002 foi introduzida a técnica de captura de IgM e o teste de avidéz de IgG com o método *enzyme linked fluorescent assay* – ELFA (VIDAS[®]).

Resultados: Entre 41.112 gestantes atendidas, a prevalência de toxoplasmose aguda foi de 4,8 para cada 1.000 gestantes (IC95%: 4,2 a 5,6). Houve redução significativa na prevalência de toxoplasmose aguda nas gestantes deste hospital a partir do ano 2002 (P=0,008).

Conclusão: A prevalência de toxoplasmose aguda em gestantes incluídas neste estudo foi inferior à encontrada na França e na Bélgica, mas foi mais elevada quando comparada às descritas na Suécia, Noruega, Dinamarca e Nova Iorque. No Brasil resultado similar foi encontrado no Mato Grosso do Sul. Houve redução da prevalência da doença a partir do ano de 2002, o que não pode ser atribuível à introdução do teste de avidéz de IgG, porque a média de idade gestacional na realização deste exame foi tardia.

Palavras-chave: Toxoplasma, toxoplasmose, prevalência.

Introdução

A infecção pelo *Toxoplasma gondii* pode determinar infecção fetal através de passagem transplacentária quando a infecção é adquirida durante a gestação em mulheres imunocompetentes.¹ Embora a maioria das crianças com infecção congênita seja aparentemente normal ao nascimento, a coriorretinite pode se manifestar anos mais tarde.¹⁻⁴

O rastreamento sorológico pode identificar as pacientes suscetíveis para instituir medidas de prevenção primária.^{5,6} Em gestantes com perfil sorológico compatível com infecção aguda o tratamento deve ser iniciado visando reduzir a frequência e a gravidade das seqüelas de toxoplasmose congênita,⁷⁻⁹ mesmo que ainda não existam evidências de seu benefício em reduzir a transmissão vertical.^{8,10,11} Em recente metanálise os autores descreveram pequeno efeito do tratamento materno com início em três semanas da soroconversão na redução da transmissão vertical, quando comparado ao tratamento iniciado após oito semanas ou mais da soroconversão (OR=0,48;IC95%:0,28-0,80;P=0,05).¹²

Há variabilidade na frequência de soropositividade e de toxoplasmose primária em gestantes conforme regiões geográficas, características climáticas, culturais e hábitos alimentares.¹³⁻¹⁵ Em gestantes atendidas na maternidade do Hospital Nossa Senhora da Conceição, a soropositividade para toxoplasmose, medida com a detecção de anticorpos IgG com método MEIA quantitativo, foi de 59,8% (IC95%: 57,0% - 62,5%).¹⁶

A incidência de infecção aguda foi de 0,5/1.000 gestantes na Suécia¹⁷, 1,7/1.000 gestantes na Noruega¹⁸, 2,1/1.000 gestantes na Dinamarca¹⁹, 2/1.000

gestantes em Nova Iorque²⁰, 6,6/1.000 gestantes em Paris¹ e 8,5/1.000 gestantes na Bélgica²¹.

No Brasil ainda não existe um programa de vigilância epidemiológica da doença para avaliarmos a magnitude do problema no país. Entretanto, o estudo de Figueiró-Filho *et al.* demonstrou que a prevalência de toxoplasmose aguda em gestantes no Mato Grosso do Sul foi de 4,2/1.000 gestantes²² e em Brasília, na cidade de Guará, esta frequência atingiu 5,7/1.000 gestantes²³.

Este estudo teve como objetivo estimar a prevalência de toxoplasmose aguda em uma população de gestantes e avaliar possível diferença ao longo do período estudado. Este resultado permitirá avaliar a magnitude do problema entre gestantes usuárias do sistema público de saúde e obter um dos elementos para realizar estudos de custo-efetividade no nosso meio.

Pacientes e Métodos

A maternidade do HNSC se caracteriza pelo atendimento de gestantes de médio e alto risco exclusivamente pelo sistema único de saúde. O hospital é referência para investigação e acompanhamento de gestantes e bebês com possibilidade de infecção pelo *T. gondii*.

Foram revisados os prontuários de gestantes que preencheram critérios de infecção aguda avaliadas no momento da admissão obstétrica para parto, entre outubro de 1998 e dezembro de 2005. Os bebês expostos ao *T. gondii* intra-útero foram incluídos em estudo de coorte histórico, com seguimento até 12 meses de vida. Durante o período de seleção das gestantes foram introduzidos novos métodos sorológicos para o diagnóstico de toxoplasmose no laboratório desta instituição. Até

dezembro de 2001 (período 1), o método sorológico utilizado foi o *Microparticle enzyme immunoassay* – MEIA (*Abbott Diagnostics AxSYM[®] SYSTEM Toxo IgG e IgM versão 2.0*), com sensibilidade e especificidade de 93,3% e 97,3%, respectivamente, para detecção de anticorpos IgM.²⁴ O resultado de IgG foi reagente quando a concentração foi superior a 3 UI/mL e foi considerado IgM reagente quando o índice foi superior a 0,600 (Manual do fabricante – *Abbott AxSYM[®] SYSTEM* – Toxo IgG. August, 1999).

A partir de janeiro de 2002 (período 2), quando detectada IgM anti-toxoplasma com o método MEIA, a mesma amostra foi processada com a técnica de captura de IgM – *Enzyme linked fluorescent assay* – ELFA (VIDAS[®]) que, ao confirmar o teste reagente, desencadeou a realização do teste de avidéz de IgG, com o mesmo método ELFA (VIDAS[®]). Para o método ELFA com captura de IgM o resultado foi reagente quando detectado índice superior a 0,65. A sensibilidade e especificidade para anticorpos com captura de IgM comparadas ao kit Toxo ISAGA IgM (*Immunosorbent agglutination assay*) foram, respectivamente, 96% e 99,2% (Manual do fabricante – *BioMérieux – VIDAS[®] TOXO IgM, TXM*).

Os resultados do teste de avidéz de IgG realizado com o método ELFA foram descritos como baixa, alta e intermediária avidéz quando encontrados índices inferiores a 0,200, superiores a 0,300, e entre 0,200 e 0,300, respectivamente (Manual do fabricante – *BioMérieux – VIDAS[®] TOXO IgG Avidity, TXGA*).

A definição de caso na gravidez foi estabelecida considerando apenas os testes processados no laboratório do Hospital Nossa Senhora da Conceição.

Os critérios utilizados para o diagnóstico foram embasados no sistema de classificação e definição de caso elaborado por *experts* pertencentes ao “*European*

Research Network on Congenital Toxoplasmosis”, com adaptações devido a introdução do teste de avidéz de IgG nas rotinas atuais.²⁵ A probabilidade de infecção primária pelo *T. gondii* durante a gestação foi estratificada em quatro categorias – definitiva, provável, possível e improvável.

Foram excluídas as gestantes com IgM reagente e concentração de IgG persistentemente baixa, inferior a 300 UI/mL, se a primeira sorologia foi realizada na primeira metade da gestação, as gestantes com teste anti-HIV soro reagente e, também, aquelas com alta avidéz de IgG antes de 16 semanas de gestação.

Uma amostra fixa de 41.112 gestantes foi avaliada. Esperando uma prevalência de 7,0/1.000 gestantes e considerando $\alpha = 0,05$, o erro padrão calculado foi de 0,001%. A análise foi baseada na distribuição binomial através do cálculo de uma proporção simples e seu IC 95%. Para comparar proporções foi utilizado o teste qui-quadrado com correção de Yates e com tendência linear. Os dados foram analisados através do programa PEPI versão 4.0 (PM Gahlinger & JH Abramson 1993-2001) e SPSS versão 12.0 (*Statistical Package for the Social Sciences*).

Foi assinado termo de compromisso pelos pesquisadores para coleta de dados em prontuários e o estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Hospital Nossa Senhora da Conceição (HNSC).

Resultados

De um total de 41.112 gestantes atendidas na maternidade entre outubro de 1998 a dezembro de 2005 foram identificadas 241 gestantes com os critérios para definição de caso de toxoplasmose aguda na gestação. A distribuição da ocorrência de toxoplasmose aguda em gestantes entre 1998 e 2005 pode ser visualizada na

figura 1 e a prevalência acumulada está detalhada na tabela 1. Na categoria de diagnóstico improvável há pouca evidência para considerar os casos como infecção aguda, portanto, 42 casos foram excluídos para o cálculo da prevalência de infecção primária na gestação que atingiu, então, 4,8/1.000 gestantes (IC95%: 4,2 a 5,6).

Houve uma diferença significativa entre a prevalência de toxoplasmose aguda de 5,8/1.000 gestantes (IC95%: 4,8 a 6,9) encontrada no período 1 e a de 3,9/1.000 gestantes (IC95%: 3,1 a 4,9) no período 2 (diferença \pm EP = 1,9 \pm 0,7; IC95%: 0,5 a 3,3; P=0,008). Foi observada uma tendência significativa na redução das prevalências obtidas desde 2002 até 2005, ao compararmos com a prevalência obtida em 2001, momento em que houve mudança de métodos diagnósticos para medir este evento (χ^2 for trend; P<0,0001).

Como tentativa de avaliar se esta redução da prevalência da infecção a partir do ano de 2002 poderia ser explicada pela introdução de novas técnicas sorológicas, foram analisadas as variáveis relacionadas ao rastreamento sorológico nas 241 mulheres incluídas no estudo. Não houve diferença na ocorrência de critério diagnóstico definitivo entre os dois períodos (Diferença \pm erro padrão= -1,9% \pm 4,9%; IC95%: -12,4% a 8,5%; P=0,823), entretanto, houve predomínio significativo de diagnósticos improváveis no período 2 (Diferença \pm erro padrão=18,8% \pm 4,9%; IC95%: 8,4% a 29,2%; P<0,0001). A proporção de gestantes que realizou sorologia para toxoplasmose durante a gestação foi significativamente maior no período 2 (86,7%) quando comparada ao período 1 (64,1%) (Diferença \pm erro padrão=22,7% \pm 5,3%; IC95%: 11,4% a 33,9%; P<0,0001). Entretanto, em relação à idade gestacional em que o primeiro exame foi realizado, não observamos diferença

significativa na proporção de gestantes que realizou o exame até 16 semanas nos dois períodos (Diferença \pm erro padrão=1,0% \pm 4,6%; IC95%: -8,8% a 10,8%; P=0,971).

O teste de avidéz de IgG foi realizado por 84 gestantes entre as 113 gestantes do período 2 (74,3%), entretanto, apenas 7 destas 84 pacientes da amostra (8,3%) coletaram o exame antes de 16 semanas de gestação. Salienta-se que 5 pacientes foram excluídas do estudo por apresentarem resultado de alta avidéz antes de 16 semanas resultando em 12,7% de coletas no período recomendado. Além disso, a média e desvio padrão (DP) da idade gestacional, em semanas, na realização do exame, foi elevada (média \pm DP): 27,3 \pm 9,8 em 2002, 29,5 \pm 9,0 em 2003, 29,5 \pm 7,0 em 2004 e 32,1 \pm 7,4 em 2005. Houve redução na proporção de gestantes que realizou a primeira sorologia no serviço de referência, até 16 semanas: 20,5% em 2003, 13,6% em 2004 e, nenhum caso em 2005.

Finalmente, observamos que a ausência de pré-natal ocorreu em 8 de 226 gestantes (3,5%). Entre as 218 pacientes que realizaram pré-natal, em 42 casos (19,3%) não havia registro do *status* sorológico. Um único teste no pré-natal ou no momento do parto ocorreu em 13 (5,4%) e 62 (25,7%) das 241 gestantes, respectivamente.

Discussão e Conclusão

A alta prevalência de toxoplasmose aguda encontrada neste estudo já era esperada uma vez que foi demonstrada elevada freqüência de soropositividade para toxoplasmose nesta mesma população, em um estudo prévio realizado em 2000.¹⁶

A prevalência de toxoplasmose primária na população estudada foi inferior à encontrada em Paris¹ e na Bélgica,²¹ mas foi mais elevada quando comparada às

descritas na Suécia,¹⁷ Noruega,¹⁸ Dinamarca¹⁹ e Nova Iorque²⁰. Este resultado foi similar a de outros locais do Brasil, como Mato Grosso do Sul,²² mas inferior à obtida no Distrito Federal²³. Esta variabilidade nas estimativas pode estar relacionada com a população selecionada, com os diferentes métodos diagnósticos utilizados no rastreamento, ou ainda, com os diferentes fatores de risco envolvidos na transmissão da doença.

Em nosso estudo, a introdução do teste de avidéz de IgG não pode justificar a redução significativa da prevalência de toxoplasmose aguda a partir de 2002 porque um número reduzido de gestantes foi contemplado com realização desta sorologia antes de 16 semanas. Além disso, a média de idade gestacional na realização deste exame no serviço de referência foi progressivamente maior entre 2002 e 2005.

A expectativa em relação à introdução do teste de avidéz de IgG era a redução de casos falso-positivos quando consideramos anticorpos IgM, isoladamente, para definição de doença aguda em gestantes devido a sua persistência por um a dois anos ou mais.²⁶ A presença de IgM reagente é útil para a triagem inicial, mas impõe urgência em confirmar ou afastar a infecção a partir do teste de avidéz de IgG, desde que realizado em momento oportuno, o que não observamos na população estudada. O teste de avidéz de IgG apresenta a propriedade de afastar o diagnóstico de infecção aguda na gestação, quando ocorre resultado elevado até 16 semanas de gestação. Mas a baixa avidéz não significa infecção recentemente adquirida uma vez que este resultado pode persistir aproximadamente por 1 ano.²⁶ Conseqüentemente, com o uso adequado deste método ocorre diminuição de intervenções diagnósticas e terapêuticas desnecessárias, reduzindo os custos, a ansiedade associada aos futuros testes e a probabilidade de erro diagnóstico.²⁷ Há

relato de que entre 17,5% a 48,7% das gestantes com perfil sorológico de infecção aguda baseado apenas nos resultados de IgG, IgM, IgA e IgE receberiam espiramicina, enquanto o teste de avidéz de IgG afastaria este diagnóstico.²⁸

Observamos uma proporção significativamente maior de gestantes que realizaram a sorologia para toxoplasmose durante a gestação no período 2, o que poderia favorecer à maior precisão do diagnóstico. Entretanto, houve predomínio de gestantes com diagnóstico improvável neste mesmo período, sugerindo o acesso tardio ao serviço de referência para definição do caso.

Considerando a proporção de gestantes que, neste estudo, realizou um único teste no pré-natal (5,4%) ou no momento do parto (25,7%), conseqüentemente intervenções desnecessárias e onerosas foram desencadeadas. Resultados mais alarmantes foram encontrados por Castilho-Pellosso *et al.* quando um único teste (ELISA-IgM) conduziu o tratamento em 69% das gestantes.²⁹

A seleção de gestantes atendidas em uma maternidade pública permite generalizar os achados apenas para a população usuária do sistema único de saúde. Uma limitação para o estabelecimento do diagnóstico de infecção aguda em gestantes, especialmente no primeiro período deste estudo, foi a ausência do teste de avidéz de IgG e da detecção de anticorpos IgM por método de captura. Entretanto, esta limitação persistiu no segundo período devido à realização tardia destes testes mais específicos, o que prejudicou a possibilidade de descartar os casos falso-positivos. Portanto, utilizamos a padronização para definição de casos de infecção pelo *T. gondii* na gestação elaborada por Lebech *et al.*, com adaptações, com o objetivo de viabilizar comparações com outras populações e discriminar a precisão conforme a probabilidade do diagnóstico.²⁵ Lebech *et al.* consideraram que o

“diagnóstico definitivo” é absoluto e inequívoco. As outras três categorias são subjetivas. Existe forte evidência de infecção para o “diagnóstico provável”, mas há ausência de provas absolutas, enquanto que para o “diagnóstico possível” a evidência é sugestiva, mas incompleta. Na categoria de “infecção improvável” existe pouca evidência para o diagnóstico, mas este não pode ser completamente excluído.²⁵ A exclusão daquelas gestantes com diagnóstico improvável teve como objetivo uma abordagem mais exigente e precisa para a definição de casos agudos, embora todas as 241 gestantes inicialmente incluídas no estudo tenham colaborado na análise para comparar as características sorológicas que avaliaram a qualidade da assistência.

Concluimos que outros fatores podem estar envolvidos na redução da prevalência, uma vez que a dificuldade para estabelecimento do diagnóstico definitivo se manteve. Consideramos que a redução da prevalência no período estudado pode refletir uma falha na adesão à rotina previamente estabelecida de encaminhamentos dos casos suspeitos aos hospitais de referência da cidade de Porto Alegre. Além disso, há a possibilidade de que a introdução do teste de captura de IgM possa ter interferido nesta redução devido a sua maior especificidade, mas no presente estudo não foi possível confirmar esta hipótese.

O monitoramento desta infecção nos diferentes serviços de saúde desta cidade e a adoção de indicadores, tal como a proporção de gestantes com realização do teste de avidéz de IgG nas primeiras 16 semanas de gestação podem auxiliar na avaliação da magnitude do problema e da qualidade da assistência.

Infelizmente, a introdução do teste de avidéz de IgG não contribuiu definitivamente com a precisão em discriminar infecção aguda de infecção no passado recente. Parece claro que, além do incremento tecnológico, ainda é

necessário o incentivo ao acesso precoce ao serviço de referência e uma maior integração de serviços de saúde da rede pública.

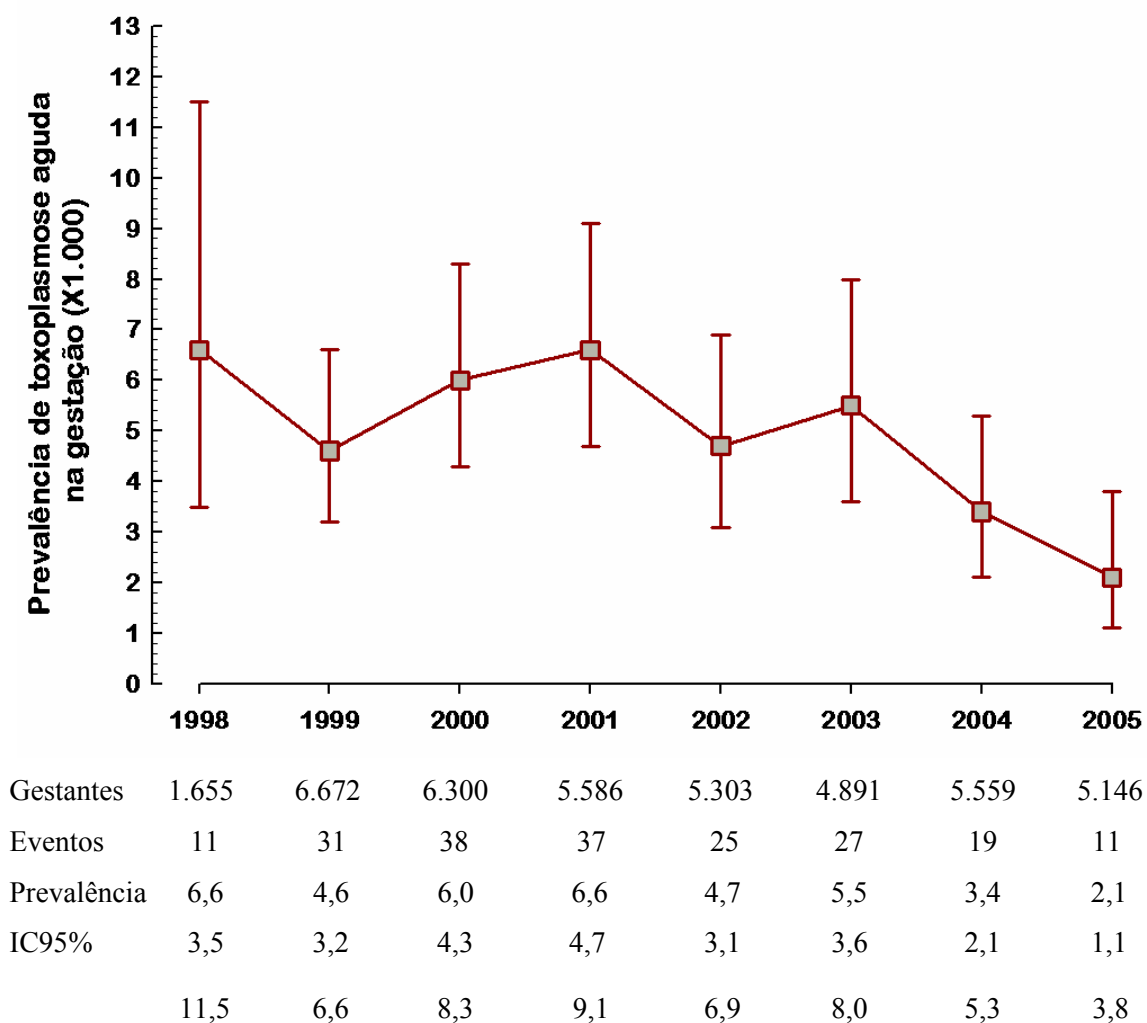


Figura 1: Prevalência de toxoplasmose aguda na gestação entre 1998 e 2005.

Tabela 1 – Prevalência acumulada de toxoplasmose aguda em gestantes de acordo com o sistema de classificação e definição de caso de infecção pelo *Toxoplasma gondii* em gestantes imunocompetentes (n=241).

Categoria diagnóstica e critérios para diagnóstico de infecção primária durante a gestação	N	Prevalência de toxoplasmose aguda acumulada¹ (/1.000)	IC95%
Diagnóstico definitivo	43	1,0	0,7 – 1,4
<ul style="list-style-type: none"> • Viragem sorológica • RN infectado² 			
Diagnóstico provável	72	2,8	2,3 – 3,3
<ul style="list-style-type: none"> • IgG superior a 300 UI/mL³ • Baixa avidéz de IgG³ • IgG materna aumentando três vezes ou mais³ 			
Diagnóstico possível	84	4,8	4,2 – 5,5
<ul style="list-style-type: none"> • Avidéz de IgG intermediária na segunda metade da gestação³ • IgG inferior a 300 UI/mL e apenas um exame no momento do parto³ • IgG inferior a 300 UI/mL e apenas um exame no pré-natal, na segunda metade da gestação³ 			
Diagnóstico improvável	42	5,9	5,2 – 6,6
<ul style="list-style-type: none"> • IgG inferior a 300 UI/mL e alta avidéz de IgG com idade gestacional superior a 16 semanas³ • IgG estável com exames realizados na segunda metade da gestação³ 			

¹ Em 41.112 gestantes.

² Inclui 1 caso de infecção fetal a partir de reação em cadeia da polimerase do líquido amniótico positiva.

³ Resultados associados à presença de IgM reagente.

Referências bibliográficas

1. Remington JS, McLeod R, Thulliez P, Desmonts G. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein JO, editors. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. 6th ed. Philadelphia: WB Saunders; 2005. p.947-1091.
2. Mombrò M, Perathoner C, Leone A, Nicocia M, Moiraghi Ruggenini A, Zotti C, et al. Congenital toxoplasmosis: 10-year follow up. *Eur J Pediatr* 1995;154:635-39.
3. Dunn D, Wallon M, Peyron F, Petersen E, Peckham C, Gilbert R. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *Lancet* 1999;353:1829-33.
4. Sáfadi MAP, Berzin EM, Farhat CK, Carvalho ES. Clinical presentation and follow up of children with congenital toxoplasmosis in Brazil. *Braz J Infect Dis* 2003;7(5):325-331.
5. Foulon W, Naessens A, Lauwers S, de Meuter F, Amy JJ. Impact of primary prevention on the incidence of toxoplasmosis during pregnancy. *Obstet Gynecol* 1988;72:363-6.
6. Foulon W: Congenital toxoplasmosis: Is screening desirable ? *Scand J Infect Dis Suppl* 1992;84:11-7.
7. Foulon W, Villena I, Stray-Pedersen B, Decoster A, Lappalainen M, Pinon JM, et al. Treatment of toxoplasmosis during pregnancy: a multicenter study of impact on fetal transmission and children's sequelae at age 1 year. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180:410-5.
8. Gilbert R, Dunn D, Wallon M, Hayde M, Prusa A, Lebech M, et al. Ecological comparison of the risks of mother-to-child transmission and clinical manifestations of congenital toxoplasmosis according to prenatal treatment protocol. *Epidemiol Infect* 2001;127:113-20.
9. Gras L, Wallon M, Pollak A, Cortina-Borja M, Evengard B, Hayde M, et al. Association between prenatal treatment and clinical manifestations of congenital toxoplasmosis in infancy: A cohort study in 13 european centres. *Acta Paediatr* 2005; 94:1721-31.
10. Peyron F, Wallon M, Liou C, Garner P. Treatments for toxoplasmosis in pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2000;(2):CD001684.
11. Foulon W, Naessens A, Ho-Yen D. Prevention of congenital toxoplasmosis. *J Perinat Med* 2000;28:337-45.
12. The Systematic Review on Congenital Toxoplasmosis (SYROCOT) study group. Effectiveness of prenatal treatment for congenital toxoplasmosis: a meta-analysis of individual patients' data. *Lancet* 2007;369:115-22.

13. Cook AJ, Gilbert RE, Buffolano W, Zufferey J, Petersen E, Jenum PA, et al. Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. *BMJ* 2000;321:142-7.
14. Buffolano W, Gilbert RE, Holland FJ, Fratta D, Palumbo F, Ades AE. Risk factors for recent toxoplasma infection in pregnant women in Naples. *Epidemiol Infect* 1996;116:347-351.
15. Spalding SM, Amendoeira MRR, Klein CH, Ribeiro LC. Serological screening and toxoplasmosis exposure factors among pregnant women in South of Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005;38(2):173-177.
16. Varella IS, Wagner MB, Darela AC, Nunes LM, Müller RW. Prevalência de soropositividade para toxoplasmose em gestantes. *J Pediatr* 2003;79(1):69-74.
17. Evengård B, Petersson K, Engman ML, Wiklund S, Ivarsson AS, Tear-Fahnehjelm K, et al. Low incidence of toxoplasma infection during pregnancy and newborns in Sweden. *Epidemiol Infect* 2001;127(1):121-7.
18. Jenum PA, Stray-Pedersen B, Melby KK, Kapperud G, Whitelaw A, Eskild A, et al. Incidence of *Toxoplasma gondii* infection in 35.940 pregnant women in Norway and pregnancy outcome for infected women. *J Clin Microbiol* 1998;36:2900-6.
19. Lebech M, Andersen O, Christensen NC, Hertel J, Nielsen HE, Peitersen B, et al. Feasibility of neonatal screening for toxoplasma infection in the absence of prenatal treatment. *Lancet* 1999;353:1834-7.
20. Centers for Disease Control and Prevention. CDC Recommendations Regarding Selected Conditions Affecting Women's Health. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report. Recommendations and Reports*. 2000 March 31;49(RR-2):57-75.
21. Naessens A. Screening for toxoplasmosis during pregnancy: the situation in Belgium. *Arch Pédiatr* 2003;10(1):18.
22. Figueiró-Filho EA, Lopes AHA, Senefonte FRA, Souza Júnior VG, Botelho CA, Figueiredo MS, Duarte G. Toxoplasmose aguda: estudo da frequência, taxa de transmissão vertical e relação entre os testes diagnósticos materno-fetais em gestantes em estado da Região Centro-Oeste do Brasil. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2005;27(8):442-9.
23. Nóbrega OT, Karnikowski MGO. An estimation of the frequency of gestational toxoplasmosis in the Brazilian Federal District. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005;38(4):358-360.
24. Wilson M, Remington JS, Clavet C, Varney G, Press C, Ware D. Evaluation of six commercial kits for detection of human immunoglobulin M antibodies to

- toxoplasma gondii: the FDA Toxoplasmosis ad hoc Working Group. J Clin Microbiol 1997;35:3112-5.
25. Lebech M, Joynson DHM, Seitz HM, Thulliez P, Gilbert RE, Dutton GN, Øvlisen B, Petersen E. Classification System and Case Definitions of *Toxoplasma gondii* Infection in Immunocompetent Pregnant women and their congenitally infected offspring. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1996;15:799-805.
 26. Remington JS, Thulliez P, Montoya JG. MINIREVIEW. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. J Clin Microbiol 2004;42(3):941-5.
 27. Liesenfeld O, Montoya JG, Kinney S, Press C, Remington JS. Effect of testing for IgG avidity in the diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women: experience in a US reference laboratory. J Infect Dis 2001;183:1248-53.
 28. Montoya JG, Liesenfeld O, Kinney S, Press C, Remington JS. VIDAS test for Avidity of *Toxoplasma*-specific immunoglobulin G for confirmatory testing of pregnant women. J Clin Microbiol 2002;40(7):2504-2508.
 29. Castilho-Pellosso MP, Falavigna DLM, de Araújo SM, Falavigna-Guilherme AL. Monitoramento de gestantes com toxoplasmose em serviços públicos de saúde. Rev Soc Bras Med Trop 2005;38(6):532-533.

8 ARTIGO 2

INCIDÊNCIA DE TOXOPLASMOSE CONGÊNITA E TAXA DE TRANSMISSÃO VERTICAL EM CRIANÇAS NASCIDAS EM UM HOSPITAL PÚBLICO NO SUL DO BRASIL

Congenital Toxoplasmosis incidence in children who was born in a public hospital in South of Brazil

Ivana Rosângela dos Santos Varella, Doutoranda em Epidemiologia pela UFRGS;

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL (UFRGS)

A ser enviado ao

International Journal of Epidemiology

Resumo

Introdução: A estimativa do risco de infecção congênita e de seqüelas tem sido importante para o aconselhamento clínico das gestantes, e orientar decisões sobre diagnóstico e tratamento. Em nosso estudo, o objetivo foi medir a incidência de toxoplasmose congênita e estimar a taxa de transmissão vertical para embasar o estabelecimento de melhores estratégias preventivas.

Métodos: Em um estudo de coorte histórico foram incluídos os recém-nascidos de mulheres que apresentaram critérios de infecção aguda durante a gestação. O tempo de acompanhamento dos bebês foi de, aproximadamente, doze meses. Para o diagnóstico de toxoplasmose aguda em gestantes e de toxoplasmose congênita foi utilizado o sistema de classificação e definição de caso elaborado por Lebech *et al.* (*European Research Network on Congenital Toxoplasmosis*), com adaptações.

Resultados: O diagnóstico de toxoplasmose congênita foi definitivo em 37 crianças entre 40.727 nascidos vivos no período estudado, atingindo uma incidência de 0,9 para cada 1.000 nascimentos (IC95%: 0,6 a 1,3). Logo após o nascimento, entre os 200 recém-nascidos expostos ao *T. gondii*, resultado de 199 gestantes, 25 bebês apresentaram critérios diagnósticos de toxoplasmose congênita, atingindo taxa de transmissão vertical de 12,5% (IC 95%: 8,2% - 17,9%). Após o seguimento foram detectados mais 12 casos, aumentando esta taxa para 18,5% (IC 95%: 13,4% - 24,6%).

Conclusão: A detecção de 12 casos adicionais de toxoplasmose congênita com o seguimento dos bebês reforça a necessidade de monitoramento sorológico durante o primeiro ano de vida, mesmo sem evidência de infecção congênita ao nascimento.

Palavras-chave: toxoplasmose congênita, transmissão de doença, parasitemia.

Introdução

A infecção adquirida durante a gestação pode causar toxoplasmose congênita com coriorretinite e defeitos neurológicos como freqüentes conseqüências (1). Numerosas variáveis influenciam a probabilidade de infecção congênita tais como a cepa e virulência do *T. gondii*, tamanho da inoculação e via de infecção, parasitemia materna, tempo de duração da gestação e imunocompetência da gestante (1).

A freqüência de toxoplasmose congênita foi de 0,07/1.000 na Suécia (2), 0,08/1.000 nascimentos em Massachusetts e em Londres (3,4), 0,12/1.000 nascidos vivos na Suíça (5), 0,3/1.000 nascimentos em Barcelona (6), 0,4/1.000 nascimentos na Dinamarca (7), 1,1/1.000 nascidos vivos na Polônia (8) e 1,9 a 3,2/1.000 em Paris (1).

Em estudo realizado com amostras de sangue do cordão, no sul do Brasil, a incidência de infecção congênita atingiu 0,8/1.000 nascimentos (IC95%:0,02-4,45) (9). Neto *et al.* identificaram uma prevalência de toxoplasmose congênita de 0,3/1.000 recém-nascidos, utilizando 140.914 amostras em papel filtro (10). Resultado similar foi obtido por Carvalheiro *et al.*, em uma população de 15.162 recém-nascidos atendidos no sistema público de saúde de 25 cidades na região de Ribeirão Preto, também avaliados com amostras em papel filtro (11). A ocorrência de toxoplasmose congênita em Uberlândia, Minas Gerais, atingiu 5,0/1.000 recém-nascidos (IC95%:1,4-12,7), com amostras em sangue do cordão (12).

O risco global de infecção fetal a partir de infecção aguda materna pelo *T. gondii* é de 20% a 50% (13). Há consistência entre os vários estudos que identificaram menor índice de acometimento fetal quando a infecção ocorre mais precocemente na gestação (1,14-17). Hohlfeldt *et al.* verificaram, adicionalmente,

que a doença foi mais grave quando adquirida durante o primeiro trimestre (14). Dunn *et al.* identificaram uma taxa de transmissão materno-fetal de 29% (IC 95%: 25%-33%) (15). Foulon *et al.* descreveram uma taxa de transmissão vertical entre as gestantes com soroconversão de 44% (16). Na Noruega, Jenum *et al.* encontraram uma taxa de transmissão vertical de 23,4% (IC 95%: 11,3 – 35,5%) (17).

Em gestantes com perfil sorológico compatível com infecção aguda o tratamento deve ser iniciado visando reduzir a frequência e a gravidade das seqüelas de toxoplasmose congênita, (18) mesmo que ainda não existam evidências de seu benefício em reduzir a transmissão vertical (19-21).

O objetivo deste estudo foi medir a incidência de toxoplasmose congênita utilizando os critérios de classificação e definição de caso de toxoplasmose congênita elaborados por Lebech *et al.*, com adaptações. Adicionalmente, a taxa de transmissão vertical foi obtida no momento do nascimento e aos 12 meses de vida. Com estes resultados estima-se avaliar a magnitude da doença nesta população.

Material e Métodos

Delineamento e população em estudo

Um estudo de coorte histórico foi desenvolvido entre outubro de 1998 e dezembro de 2005, com a inclusão de todos os recém-nascidos de gestantes que apresentaram critérios para o diagnóstico de toxoplasmose aguda na gestação, identificadas a partir de estudo transversal prévio.

O serviço de pré-natal e a maternidade do HNSC se caracterizam pelo atendimento de gestantes de médio e alto risco, com média de 5.000 partos ao ano, sendo referências para o atendimento de gestantes com suspeita ou comprovada

toxoplasmose primária no período gestacional. Os recém-nascidos destas pacientes foram acompanhados na Unidade de Prevenção da Transmissão Vertical do mesmo hospital.

Definição de caso

O diagnóstico em gestantes e recém-nascidos foi embasado no sistema de classificação e definição de caso elaborado por *experts* pertencentes ao “*European Research Network on Congenital Toxoplasmosis*”, com adaptações, devido a introdução do teste de avidéz de IgG nas rotinas atuais e de detecção do DNA do *T. gondii* com reação em cadeia da polimerase, método *Nested* (RCP-*Nested*) para avaliação neonatal (22). A probabilidade de infecção primária pelo *T. gondii* durante a gestação e de toxoplasmose congênita foi classificada em quatro categorias – definitiva, provável, possível e improvável.

Nas crianças expostas ao *T. gondii* intra-útero a infecção foi considerada “definitiva” na presença de aumento na concentração de IgG, ou persistentemente positiva, nos primeiros 12 meses de vida, com ou sem sinais clínicos da tríade clássica - hidrocefalia ou microcefalia, retinocoroidite e calcificações cerebrais; IgM positivo nos primeiros 6 meses de vida, excluindo as amostras dos primeiros 2 dias de vida. Os autores deste estudo incluíram nesta categoria, a RCP do líquido amniótico positiva.

Infecção “provável” foi definida quando houve IgM positivo entre 6 e 12 meses de idade, sem testes sorológicos prévios para comparação; retinocoroidite e/ou hidrocefalia/calcificações cerebrais e infecção primária materna definida durante a gestação sem outros resultados disponíveis; incluímos a RCP em amostra sérica ou líquórica no neonato positiva.

Considerou-se infecção “possível” quando detectada retinocoroidite e/ou hidrocefalia/calcificações cerebrais, IgG positivo, sem testes sorológicos ou conhecimento de infecção materna.

A infecção foi classificada como “improvável” quando houve diminuição da concentração de IgG nos primeiros seis meses de vida, na ausência de tratamento, e estes casos não foram considerados no cálculo da incidência da infecção congênita.

Medidas

Os métodos sorológicos utilizados em gestantes foram o *Microparticle enzyme immunoassay* – MEIA – *Abbott Diagnostics AxSYM*[®] SYSTEM Toxo IgG e IgM versão 2.0, método de captura de IgM – *Enzyme linked fluorescent assay* – ELFA (VIDAS[®]) e o teste de avidéz de IgG, com o mesmo método ELFA (VIDAS[®]).

Logo após o nascimento, os recém-nascidos foram avaliados utilizando um rastreamento composto de hemograma com plaquetas, sorologia para toxoplasmose (IgG e IgM) com o método MEIA, exame do líquido cefalorraquidiano, ecografia transfontanelar, reação em cadeia da polimerase para detecção do DNA do *T. gondii* em amostra sérica e/ou líquórica com o método *Nested* e exame de fundo de olho. Os resultados IgM reagentes foram confirmados com coleta de segunda amostra entre o quinto e o sétimo dia de vida.

Consideramos como valores de referência para o método MEIA, IgG reagente quando a concentração foi superior a 3 UI/mL e IgM reagente quando o índice foi superior a 0,600 (Manual do fabricante – *Abbott AxSYM*[®] SYSTEM – Toxo IgG. August, 1999). Para o método ELFA com captura de IgM o resultado foi considerado reagente com índice superior a 0,65.

Os bebês foram acompanhados por um período aproximado de 12 meses para identificar os casos com persistência ou elevação significativa da concentração de anticorpos IgG, bem como para avaliar o aparecimento de seqüelas. O período de seguimento foi menor quando houve o desaparecimento destes anticorpos, na ausência de tratamento, o que definitivamente afastou o diagnóstico.

Amostra

Para estimar a incidência de toxoplasmose congênita foi considerada uma amostra fixa, com registro de 34.225 nascimentos, uma incidência estimada da doença de 1/1.000 nascidos vivos, com intervalo de confiança de 95% e diferença máxima aceitável de 0,1/1.000. O tamanho de amostra calculado foi de 31.423 recém-nascidos. Para estimar o parâmetro de taxa de transmissão vertical, a consideramos em torno de 30%, fixando-se $\alpha = 0,05$ e $\beta = 0,20$, aceitou-se erro padrão de 4,5% e margem de erro de 9%. O tamanho amostral mínimo calculado foi de 100 recém-nascidos.

Análise

Inicialmente foi realizado o cálculo de uma proporção simples baseado na distribuição binomial e seu respectivo intervalo de confiança de 95%. Foi realizada análise bivariável com os testes qui-quadrado com correção de Yates, exato de Fisher e t de Student para comparação entre médias de amostras independentes, com distribuição normal. Os dados foram analisados através do programa PEPI versão 4.0 (PM Gahlinger & JH Abramson 1993-2001) e SPSS versão 12.0 (*Statistical Package for the Social Sciences*).

Foi assinado termo de compromisso pelos pesquisadores para coleta de dados nos prontuários e o estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Hospital Nossa Senhora da Conceição (HNSC).

Resultados

De um total de 41.112 partos ocorridos no período estudado foram identificadas 199 gestantes com critérios de toxoplasmose aguda atingindo uma prevalência de 4,8 para cada 1.000 gestantes (IC95%: 4,2 a 5,6).

Observamos que os critérios diagnósticos definitivo, provável, e improvável para toxoplasmose congênita foram identificados em 34 (17,0%), 3 (1,5%), e em 11 (5,5%) dos 200 bebês, respectivamente. Um caso com diagnóstico possível, logo após o nascimento, foi identificado como não infectado com o seguimento. A ausência de anticorpos IgG, após a suspensão do tratamento empírico afastou o diagnóstico nos demais casos. Considerando as crianças com critério definitivo e provável para a doença, entre o total de 40.727 recém-nascidos vivos atendidos na maternidade neste período, a incidência de toxoplasmose congênita foi de 0,9/1.000 nascidos vivos no período (IC95%:0,6 a 1,3). As taxas de transmissão vertical de toxoplasmose congênita de acordo com o momento do diagnóstico estão descritas na tabela 1. O seguimento proporcionou um aumento de 48% na detecção dos casos de toxoplasmose congênita (25/37).

Tabela 1

As taxas de transmissão vertical conforme categorias e critérios diagnósticos de infecção primária materna estão descritas na tabela 2.

Tabela 2

Em 47 bebês (23,5%) não foi possível definir o diagnóstico de toxoplasmose congênita devido às perdas no seguimento. Para avaliar o efeito destas perdas na validade do estudo, comparamos as características da população de gestantes e de recém-nascidos, quanto ao retorno para acompanhamento dos bebês, demonstradas na tabela 3. As características das gestantes e dos bebês foram semelhantes nos dois grupos.

Tabela 3

A ocorrência de toxoplasmose congênita não foi associada com bebês pequenos para a idade gestacional (RR=0,81; IC95%: 0,32 – 2,03; P=0,783). A média e desvio padrão do peso de nascimento dos bebês com toxoplasmose congênita foi de 2945g±519g, enquanto que entre os bebês sem a doença foi de 3017g±680g, sem diferença significativa do peso entre os dois grupos (Dif= -72g; IC95%: -312g a 169g; P=0,558). A média e desvio padrão da idade gestacional tanto entre os bebês com toxoplasmose congênita quanto aqueles sem a infecção foi de 38,5±1,9 semanas (P=0,994).

Houve presença de sinais ou sintomas em 17 dos 36 bebês com toxoplasmose congênita, avaliados conforme o protocolo (47,2%). Entre 25 bebês com diagnóstico de toxoplasmose congênita e avaliados logo após o nascimento, 12 (48%) já apresentavam sinais ou sintomas. Entre os 29 bebês com avaliação oftalmológica logo após o nascimento 8 já haviam desenvolvido coriorretinite (27,6%). Este achado foi bilateral em 50% destes casos. Mais dois casos foram identificados aos 5 meses de vida, 1 caso com 23 meses e outro caso com 47 meses.

Calcificações intracranianas foram observadas em 6 dos 36 recém-nascidos com infecção, submetidos à ecografia transfontanelar (16,6%). Hepatoesplenomegalia ocorreu em apenas 1 caso (2,8%).

Quanto aos achados laboratoriais observamos que a hiperproteínoorraquia foi encontrada em 5 dos 31 recém-nascidos nos quais foi possível a realização da punção lombar (16,1%), com resultados entre 238 mg/dL e 1317 mg/dL. A eosinofilia foi demonstrada em 1 bebê (2,7%), a neutropenia em 1 caso (2,7%) e plaquetopenia em 2 casos de toxoplasmose congênita definitiva (5,4%).

Discussão e conclusão

A incidência de toxoplasmose congênita é comparável a de outros locais do Rio Grande do Sul, como a encontrada em Passo Fundo (10), cidade situada em região com alta prevalência de toxoplasmose ocular, que atingiu 21,3% dos indivíduos com 13 anos de idade ou mais (23). Comparando com outros países, esta estimativa foi similar à encontrada na Polônia (8), e foi superior às relatadas na Suécia (2), Massachussets (3), Londres (4), Suíça (5), Barcelona (6) e Dinamarca (7). Apenas em Paris foi observada uma incidência maior (1).

A detecção de 12 casos adicionais, viabilizada com o seguimento e dependente da dosagem seriada de anticorpos IgG, reforça a sua necessidade até os 12 meses de vida, pelo menos, e aponta para a introdução de métodos com melhor desempenho quanto à sensibilidade no momento do nascimento possibilitando o diagnóstico mais precoce.

Neste estudo identificamos alta frequência de toxoplasmose congênita e elevada taxa de transmissão vertical de, pelo menos, 18,5%. Esta frequência pode

estar subestimada devido às perdas no seguimento. E isto agrava ainda mais o quadro, uma vez que os indivíduos que não completaram o seguimento podem somente tornar-se casos. Na prática clínica, um dos maiores desafios é estabelecer o diagnóstico definitivo de infecção aguda materna a partir de testes sorológicos não seriados e com a utilização apenas da dosagem de IgM (24). Em bebês há dificuldade para estabelecer o diagnóstico precoce, logo após o nascimento, considerando a baixa sensibilidade dos testes utilizados (25) e reduzida frequência de sinais ou sintomas (1,16), apesar de que, neste estudo, 48% dos bebês infectados já apresentaram sinais ou sintomas da doença ao nascimento.

Os critérios para inclusão na categoria de diagnóstico definitivo são considerados absolutos e sem qualquer dúvida para definição de caso. As demais categorias são subjetivas (22). A taxa de transmissão vertical foi obtida incluindo todos os critérios diagnósticos de infecção aguda na gestação, considerando a dificuldade, em nossa população, de estabelecer o diagnóstico mais precoce e, portanto, com maior precisão. Neste contexto, esta taxa de transmissão global poderia estar subestimada devido à inclusão de gestantes com diagnóstico provável e possível, uma vez que a taxa de transmissão vertical observada entre os casos de mães com viragem sorológica confirmada foi maior, com resultado muito semelhante ao encontrado por Foulon *et al.* (16). Entretanto, não podemos desprezar a possibilidade de transmissão na categoria de diagnóstico possível, o que foi observado entre aquelas 5 pacientes que não realizaram rastreamento sorológico durante o pré-natal e que, no momento do parto, apresentaram concentração de IgG inferior a 300mg/dL e índice de IgM positivo. Por outro lado, a população estudada foi constituída por usuárias do sistema público de saúde e esta estimativa poderia

estar superestimada, principalmente porque esta medida se relaciona a um hospital de referência. Em uma população composta de 805 amostras de sangue de cordão, Segundo *et al.* demonstraram o predomínio significativo na frequência de toxoplasmose congênita em hospital público (0,8%) quando comparada ao hospital privado (0%) (26).

Um achado surpreendente foi a frequência de bebês que já apresentaram coriorretinite ao nascimento (27,6%), ao compararmos com um estudo de coorte recente, onde os autores encontraram que 24% das crianças desenvolveram pelo menos uma lesão de retinocoroidite, durante um tempo mediano de acompanhamento de seis anos. Quanto à idade no diagnóstico da primeira lesão retiniana, os autores observaram que 3% ocorreram no primeiro mês, 12% no primeiro ano de vida, 58% antes dos 2 anos, 76% antes dos 5 anos, e 95% antes dos 10 anos (27). Em nosso estudo o período de seguimento foi mais curto e a frequência de retinocoroidite poderia ser ainda maior.

O desenvolvimento de sinais clínicos é fortemente associado ao período da gestação em que houve a soroconversão materna (15,28). Em recente metanálise foi demonstrada fraca evidência na associação entre o tratamento materno precoce e redução do risco de toxoplasmose congênita (OR=0,48; IC95%:0,28-0,80;P=0,05) (29). Estudos subseqüentes em nosso meio, multicêntrico permitindo uma amostra maior, e com delineamento apropriado poderão avaliar o efeito do tratamento materno e da idade gestacional na detecção do diagnóstico na taxa de transmissão vertical e no desenvolvimento de seqüelas que foi, também, substancialmente elevada nesta população, principalmente entre gestantes com soroconversão confirmada.

Finalmente, consideramos que o rastreamento antenatal é útil para identificar a população de recém-nascidos exposta ao *T. gondii*, e conseqüentemente viabilizar o seguimento de crianças em que não foi possível determinar o diagnóstico no período neonatal.

Tabela 1 – Taxa de transmissão vertical de toxoplasmose em dois momentos de diagnóstico (n=200).

Momento do diagnóstico de toxoplasmose congênita	n°	Taxa de transmissão vertical (%)	IC95% (%)
Ao nascimento	25	12,5	8,2 – 17,9
Aos 12 meses	37	18,5	13,4 – 24,6

Tabela 2 – Taxa de transmissão vertical conforme categorias e critérios para diagnóstico de infecção primária na gestação (n=200).

Categoria diagnóstica e critérios para diagnóstico de infecção primária durante a gestação	n°	Taxa de transmissão vertical (%)	IC95%
Diagnóstico definitivo (n=16) <ul style="list-style-type: none"> • Viragem sorológica • RN infectado¹ 	8	50,0	24,6 – 75,3
Diagnóstico provável (n=94) <ul style="list-style-type: none"> • IgG superior a 300 UI/mL² • Baixa avidéz de IgG² • IgG materna aumentando três vezes ou mais² 	24	25,5	17,1 – 35,6
Diagnóstico possível (n=90) <ul style="list-style-type: none"> • Avidéz de IgG intermediária na segunda metade da gestação² • IgG inferior a 300 UI/mL e apenas um exame no momento do parto² • IgG inferior a 300 UI/mL e apenas um exame no pré-natal, na segunda metade da gestação² 	5	5,6	1,8 – 12,5

¹ Para a classificação dos casos maternos definitivos foi considerado o critério RN infectado. Entretanto, para avaliar a transmissão vertical de acordo com a categoria diagnóstica, os 27 casos, inclusive um caso de infecção fetal a partir de RCP-*Nested* do líquido amniótico positivo, foram redistribuídos nas demais categorias, de acordo com as características sorológicas maternas.

² Resultados associados à presença de IgM reagente.

Tabela 3 – Comparação das características de gestantes e de recém-nascidos quanto ao completo seguimento para o diagnóstico (n=200).

Características maternas	Com diagnóstico definido (n=153) n* (%)	Sem diagnóstico definido (n=47) n* (%)	P
Procedência de POA	64 (41,8)	23 (48,9)	0,490
Escolaridade inferior a 9 anos	112 (73,2)	37 (78,7)	0,570
Com sorologia no pré-natal	112 (73,2)	28 (59,6)	0,109
Ausência de pré-natal (n=186)	4 (2,8)	4 (9,5)	0,078
Realização de amniocentese (n=96)	17 (21,3)	1 (6,3)	0,291
Tratamento durante gestação (n=196)	68 (45,3)	21 (45,7)	1,000
Idade materna [‡]	24,6±6,6	25,0±6,2	0,666
Peso de nascimento (g) [‡]	2.999±644	2.955±558	0,670
Idade gestacional por Capurro (semanas) [‡] (n=198)	38,5±2,0	38,2±2,4	0,397

* Categoria de referência

[‡] Valores expressos como média e desvio padrão

Referências bibliográficas

1. Remington JS, McLeod R, Thulliez P, Desmots G. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein JO, editors. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. 6th ed. Philadelphia: WB Saunders; 2005. p.947-1091.
2. Evengård B, Petersson K, Engman ML, Wiklund S, Ivarsson AS, Tear-Fahnehjelm K, et al. Low incidence of toxoplasma infection during pregnancy and newborns in Sweden. *Epidemiol Infect* 2001;127(1):121-7.
3. Guerina NG, Hsu HW, Meissner HC, Maguire JH, Lynfield R, Stechenberg B, et al. Neonatal Serologic screening and early treatment for congenital toxoplasma gondii infection: The New England Regional Toxoplasma Working Group. *N Engl J Med* 1994;330:1858-63.
4. Gilbert RE, Stanford MR, Jackson H, Holliman RE, Sanders MD. Incidence of acute symptomatic toxoplasma retinochoroiditis in south London according to country of birth. *BMJ* 1995;310:1037-1040.
5. Signorell LM.; Seitz D.; Merkel S.; Berger R.; Rudin C. Cord blood screening for congenital toxoplasmosis in northwestern Switzerland. *Pediatr Infect Dis J* 2006;25(2):123-8.
6. Muñoz BC, Guardiola LC, Juncosa MT, Viñas DL, Sierra SM, Sanfeliu SI, et al. Toxoplasmosis y embarazo. Estudio multicéntrico realizado em 16.362 gestantes de Barcelona. *Méd Clin (Barc)* 2004;123(1):12-6.
7. Lebech M, Andersen O, Christensen NC, Hertel J, Nielsen HE, Peitersen B, et al. Feasibility of neonatal screening for toxoplasma infection in the absence of prenatal treatment. *Lancet* 1999;353:1834-7.
8. Paul M, Petersen E, Szczapa J. Prevalence of congenital *Toxoplasma gondii* infection among newborns from the Poznan region of Poland: validation of a new combined enzyme immunoassay for *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin A and immunoglobulin M antibodies. *J Clin Microbiol* 2001;39(5):1912-6.
9. Mozzatto L, Procianoy RS. Incidence of congenital toxoplasmosis in Southern Brazil: a prospective study. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2003;45(3):147-151.
10. Neto EC, Anele E, Rubim R, Brites A, Schulte 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):941-7).
11. Carvalheiro CG, Mussi-Pinhata MM, Yamamoto AY, De Souza CBS, Maciel LMZ. Incidence of congenital toxoplasmosis estimated by neonatal screening: relevance of diagnostic confirmation in asymptomatic newborn infants. *Epidemiol Infect* 2005;133(3):485-91.

12. Segundo GRS, Silva DA, Mineo JR, Ferreira MS. Congenital toxoplasmosis in Uberlândia, MG, Brazil. *J Trop Pediatr* 2004;50(1):50-3.
13. Jones JL, Lopez A, Wilson M, Schulkin J, Gibbs R. Congenital toxoplasmosis: a review. *Obstet Gynecol Surv* 2001;56:296-305.
14. Hohlfeld P, Daffos F, Thulliez P, Aufrant C, Couvreur J, Mac Aleese J, et al. Fetal toxoplasmosis: outcome of pregnancy and infant follow-up after in utero treatment. *J Pediatr* 1989;115:765-9.
15. Dunn D, Wallon M, Peyron F, Petersen E, Peckham C, Gilbert R. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *Lancet* 1999 ;353:1829-33.
16. Foulon W, Villena I, Stray-Pedersen B, Decoster A, Lappalainen M, Pinon JM, et al. Treatment of toxoplasmosis during pregnancy: a multicenter study of impact on fetal transmission and children's sequelae at age 1 year. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180:410-5.
17. Jenum PA, Stray-Pedersen B, Melby KK, Kapperud G, Whitelaw A, Eskild A, et al. Incidence of *Toxoplasma gondii* infection in 35.940 pregnant women in Norway and pregnancy outcome for infected women. *J Clin Microbiol* 1998;36:2900-6.
18. Foulon W, Villena I, Stray-Pedersen B, Decoster A, Lappalainen M, Pinon JM, et al. Treatment of toxoplasmosis during pregnancy: a multicenter study of impact on fetal transmission and children's sequelae at age 1 year. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180:410-5.
19. Peyron F, Wallon M, Liou C, Garner P. Treatments for toxoplasmosis in pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2000;(2):CD001684.
20. Gilbert R, Dunn D, Wallon M, Hayde M, Prusa A, Lebech M, et al. Ecological comparison of the risks of mother-to-child transmission and clinical manifestations of congenital toxoplasmosis according to prenatal treatment protocol. *Epidemiol Infect* 2001;127:113-20.
21. Foulon W, Naessens A, Ho-Yen D. Prevention of congenital toxoplasmosis. *J Perinat Med* 2000;28:337-45.
22. Lebech M, Joynson DHM, Seitz HM, Thulliez P, Gilbert RE, Dutton GN, Øvlisen B, Petersen E. Classification System and Case Definitions of *Toxoplasma gondii* Infection in Immunocompetent Pregnant women and their congenitally infected offspring. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;15:799-805.
23. Glasner PD, Silveira C, Kruszon-Moran D, Martins MC, Burnier Jr M, Silveira S, et al. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in Southern Brazil. *Am J Ophthalmol* 1992;114:136-44.

24. Remington JS, Thulliez P, Montoya JG. MINIREVIEW. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 2004;42(3):941-5.
25. Naessens A, Jenum P, Pollak A, Decoster A, Lappalainen A, Villena I, Lebech M, Stray-Pedersen B, Hayde M, Pinon JM, Petersen E, Foulon W. Diagnosis of congenital toxoplasmosis in the neonatal period: a multicenter evaluation. *J Pediatr* 1999;135:714.
26. Segundo GRS, Silva DAO, Mineo JR, Ferreira MS. A comparative study of congenital toxoplasmosis between public and private hospitals from Uberlândia, MG, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004;99(1):13-17.
27. Wallon M, Kodjikian L, Binquet C, Garweg J. Long-term ocular prognosis in 327 children with congenital toxoplasmosis. *Pediatrics* 2004;113:1567-1572.
28. Montoya JG, Lisenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet* 2004;363:1965-1976.
29. The Systematic Review on Congenital Toxoplasmosis (SYROCOT) study group. Effectiveness of prenatal treatment for congenital toxoplasmosis: a meta-analysis of individual patient's data. *Lancet* 2007;369(9556):115-22.

9 ARTIGO 3

DESEMPENHO DE TESTES DIAGNÓSTICOS EM TOXOPLASMOSE CONGÊNITA, COM ÊNFASE NA DETECÇÃO DO DNA DO *T. gondii* UTILIZANDO REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM AMOSTRA SÉRICA

*Assessing the accuracy of screening tests of congenital toxoplasmosis with emphasis on DNA's *T. gondii* detection using Polymerase Chain Reaction-Nested in blood sample*

Ivana Rosângela dos Santos Varella, Doutoranda em Epidemiologia pela UFRGS;

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL (UFRGS)

A ser enviado ao

International Journal of Epidemiology

Resumo

Introdução: Diferentes estratégias preventivas são utilizadas em toxoplasmose congênita incluindo o rastreamento na gestação e no período neonatal. O objetivo deste estudo é avaliar a acurácia de testes diagnósticos em toxoplasmose congênita (TC) aplicados logo após o nascimento.

Métodos: Duzentos bebês expostos ao *T. gondii* intra-útero foram incluídos em estudo de coorte histórico para identificar TC utilizando a detecção seriada de anticorpos IgG, como padrão ouro. Foram obtidos resultados de sensibilidade, especificidade, razões de verossimilhança positiva e negativa dos testes diagnósticos – hemograma, exame do líquido, ecografia transfontanelar, exame de fundo de olho (EFO) e a detecção de anticorpos IgM para toxoplasmose e do DNA do toxoplasma com reação em cadeia da polimerase – método *Nested* (RCP-*Nested*) séricos.

Resultados: Os testes que apresentaram melhor desempenho, isoladamente, foi a detecção de anticorpos IgM específicos e RCP-*Nested* atingindo razões de verossimilhança positivas de 119,3 (IC95%: 7,40 – 1923,92) e 24,8 (IC95%: 3,22 – 190,35), respectivamente. A razão de verossimilhança negativa para IgM foi 0,4 (IC95%: 0,3 – 0,6), mas para RCP-*Nested* foi apenas 0,7 (IC95%: 0,6 – 0,9).

Conclusão: A detecção de anticorpos IgM específicos no sangue do neonato e RCP-*Nested* sérico demonstraram melhor desempenho para discriminar os bebês com TC. Para afastar este diagnóstico apenas o resultado não reagente de anticorpos IgM específicos apresentou maior utilidade, mas com efeito de pequena magnitude.

Palavras-chave: Toxoplasmose Congênita; reação em cadeia da polimerase; testes sorológicos.

Introdução

A maioria das crianças infectadas pelo *T. gondii* no período pré-natal não apresenta sintomas ao nascimento, mas há possibilidade de desenvolverem seqüelas no futuro, especialmente a coriorretinite. Portanto, o diagnóstico depende do rastreamento realizado no momento do nascimento e do acompanhamento dos bebês ao longo do primeiro ano de vida, quando não detectado intra-útero (1,2).

Os anticorpos IgG são transmitidos passivamente pela mãe ao feto e progressivamente desaparecem, na ausência de TC. Desta forma, é possível confirmar ou afastar o diagnóstico da infecção congênita mais tardiamente a partir da persistência ou do desaparecimento de anticorpos IgG aos 12 meses de vida, respectivamente (1), sendo considerado o padrão ouro para discriminar os bebês com infecção congênita, classicamente reconhecido na literatura (3). A presença de anticorpos IgM, IgA ou IgE no cordão umbilical ou sangue do neonato é evidência de síntese específica de anticorpos pelo feto infectado intra-útero. Entretanto, resultados negativos não afastam a possibilidade de infecção congênita e o acompanhamento do bebê é fundamental para o diagnóstico definitivo. A taxa de soropositividade destes anticorpos quando a infecção materna ocorre na 10^a, na 20^a, ou na 30^a semana de gestação, aproximadamente, é de 10%, 20% e 60%, respectivamente (1).

Vários métodos sorológicos estão disponíveis para o diagnóstico da infecção congênita. Com o teste *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) a sensibilidade para anticorpos IgM foi 72,7% (4) e para anticorpos IgA pode atingir até 89% (1,5,6). O teste *Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (*capture ELISA*) é um método acurado no diagnóstico de toxoplasmose aguda em adultos e na

forma congênita (7). Com o teste *Enzyme-Linked Immunofiltration Assay* (ELIFA) a sensibilidade e a especificidade foram 94,1% e 98,6%, respectivamente (8). A combinação deste método com imunocaptura quantitativo para a detecção de anticorpos IgM e IgA permitiu o diagnóstico de TC em 90% dos bebês infectados até 1 mês de vida (9). A soropositividade para IgM ocorreu em 40% e em 70% dos neonatos cujas mães apresentaram soroconversão nos primeiros dois trimestres e no 3º trimestre, respectivamente, com o teste *Immunsorbent agglutination assay* (ISAGA). A combinação dos testes IgM ou IgA reagentes resultou em aumento da sensibilidade para 73% com 1,6% de resultados falso-positivos para IgM e IgA (10). Foi observada melhor sensibilidade e especificidade da análise de *Western Blot* em relação ao IgM-ISAGA atingindo 65,2% e 96,1%, respectivamente, mas resultados falso-negativos podem ocorrer após o tratamento materno (11).

Numerosos estudos avaliaram o desempenho da RCP em líquido amniótico para o diagnóstico de infecção fetal (12-16), mas poucos foram desenvolvidos para avaliar a técnica no período pós-natal, porém com resultados promissores (17-19).

O objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho dos testes diagnósticos para TC aplicados no momento do nascimento – hemograma, exame do líquido, ecografia transfontanelar, exame de fundo de olho (EFO) e a detecção de anticorpos IgM para toxoplasmose e do DNA do toxoplasma com RCP-*Nested* séricos.

Material e Métodos

Um estudo transversal desenvolvido entre outubro de 1998 e dezembro de 2005 identificou 199 gestantes com infecção primária na gestação entre 41.112 gestantes atendidas no período, sendo que todas realizaram rastreamento sorológico. Os seus bebês foram incluídos em estudo de coorte histórico com tempo de seguimento entre 9 a 12 meses de vida. A definição de caso de infecção aguda na gravidez foi embasada no sistema de classificação e definição de caso descrito por Lebech *et al.*, com adaptações, conforme quadro 1 (20).

Quadro 1

A avaliação inicial dos recém-nascidos incluiu a sorologia para toxoplasmose (IgG e IgM) com o método *microparticle enzyme immunoassay* (MEIA) – Abbott *Diagnostics AxSYM*® SYSTEM Toxo IgG e IgM versão 2.0, e a reação em cadeia da polimerase para detecção do DNA do *T. gondii* com método *Nested*, em amostra sérica. Também foi solicitado o hemograma com plaquetas para avaliar presença de eosinofilia, exame do líquido cefalorraquidiano para detectar hiperproteínoorraquia, além de ecografia transfontanelar e exame de fundo de olho para detectar calcificações e coriorretinite, respectivamente. Os resultados de IgM reagentes no sangue do neonato foram confirmados com coleta de segunda amostra entre o quinto e o sétimo dia de vida. Para o exame RCP-*Nested* foi realizada coleta de 1 mL de amostra sérica, antes do início da antibioticoterapia empírica, quando indicada. O processamento desta técnica seguiu a descrição previamente realizada por Fuentes *et al.*, sendo realizado em três laboratórios diferentes (19).

O padrão ouro foi a medida de concentração de IgG entre 9 e 12 meses de idade. Um bebê infectado deve ter concentrações iguais ou mais elevadas de IgG

nesta idade quando comparadas às encontradas no nascimento. Houve comparação independente e cega dos métodos diagnósticos avaliados em relação ao padrão ouro (21).

Análise

Para avaliar a acurácia dos testes diagnósticos no momento do nascimento foram obtidos resultados de sensibilidade, especificidade, razões de verossimilhança positiva e negativa (21-23). Os testes qui-quadrado com correção de Yates e exato de Fisher foram utilizados para avaliar possíveis associações.

Quanto à força relativa das razões de verossimilhança, consideramos forte evidência para presença ou ausência de doença resultados acima de 10 e abaixo de 0,1, respectivamente. Razões de verossimilhança de 5 a 10 e de 0,1 a 0,2 refletem moderada variação da probabilidade pré-teste para pós-teste. Resultados de 2 a 5 e de 0,5 a 0,2 indicam pequena variação na probabilidade, mas algumas vezes importante. Razões de verossimilhança de 1 a 2 e de 0,5 a 1 indicam pequena variação na probabilidade pré-teste para pós-teste, raramente importante (22,23).

Os dados foram analisados através dos programas Epi Info 6.04, PEPI versão 4.0 (PM Gahlinger & JH Abramson 1993-2001) e SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) for Windows versão 12.0, Chicago, IL.

Após assinatura de termo de compromisso, pelos pesquisadores, para utilização de dados coletados em prontuários, esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética do Hospital Nossa Senhora da Conceição. Os autores declaram não haver conflito de interesse na realização desta pesquisa.

Resultados

De um total de 41.112 gestantes atendidas na maternidade no momento do parto entre outubro de 1998 a dezembro de 2005, 199 delas apresentaram critérios para toxoplasmose aguda, resultando em uma prevalência de 4,8/1.000 gestantes (IC95%: 4,2 a 5,6). Entre os seus 200 bebês, considerando uma gestação gemelar, 64 (32,0%) não completaram o seguimento ambulatorial. Assim, os demais 136 bebês constituíram o grupo que compôs a coorte. O diagnóstico de toxoplasmose congênita de acordo com o padrão ouro foi confirmado em 31 crianças (22,8%). O desempenho dos testes diagnósticos em toxoplasmose congênita avaliados no momento do nascimento em relação ao padrão ouro está detalhado na tabela 1.

Tabela 1

A detecção de anticorpos IgM específicos ocorreu em 18 de 30 crianças (60,0%) que realizaram o teste. A mediana dos índices de IgM foi de 3,205 com amplitude entre 0,703 a 10,840. Nos percentis 25 e 75, os índices de IgM atingiram 1,043 e 4,475, respectivamente.

As combinações dos testes em série e em paralelo estão nas tabelas 2 e 3. Adicionalmente, as razões de verossimilhança foram obtidas, considerando uma estratificação desde a ausência até 3 ou mais resultados positivos dos testes para toxoplasmose congênita (tabela 4).

A frequência de soropositividade de anticorpos IgM entre os bebês com toxoplasmose congênita quando a infecção materna foi detectada no 1º, 2º ou 3º trimestre da gestação foi de 11,1%, 16,7% e 72,2%, respectivamente. A detecção do DNA do *T. gondii* com RCP-*Nested* em amostra sérica também aumentou com a idade gestacional no

momento da detecção do diagnóstico materno: nenhum caso foi positivo quando a infecção materna foi detectada no primeiro trimestre, houve 28,6% de testes positivos no segundo trimestre e 71,4% no terceiro trimestre.

Finalmente, ao compararmos as proporções de resultados falso-negativos de anticorpos IgM entre recém-nascidos de mães que realizaram tratamento (7/8) com a de recém-nascidos de mães sem tratamento durante a gestação (5/22) observamos uma diferença significativa entre estes grupos (dif=64,8%; EP=14,7%; IC95%:27,4% - 102,1%; P=0,005). Já, com o RCP-*Nested*, a proporção de resultados falso-negativos nos recém-nascidos de mães tratadas atingiu 100% (8/8) e no outro grupo foi de 65,2% (15/23), mas a comparação entre os dois grupos não atingiu significância estatística (dif=34,8%; EP=9,9%; IC95%:6,9 - 62,7%; P=0,142).

Discussão

Para detectar o diagnóstico de TC de forma precoce e acurada deve-se priorizar a sensibilidade no rastreamento, e assim, evitar os resultados falso-negativos com conseqüente demora ou ausência de tratamento com risco de futuras seqüelas nas crianças afetadas (24-28).

Numerosos testes são disponíveis para o diagnóstico de TC. Entretanto, neste estudo, alguns não demonstraram muita utilidade para seu rastreio, como o hemograma, o exame do líquido e a ecografia transfontanelar, embora possam ser complementares para uma abordagem mais completa, contribuindo na escolha terapêutica mais adequada (1, 29,30). O mesmo se aplica ao exame de fundo de olho para detectar a coriorretinite, pois embora tenha apresentado um bom desempenho,

pode estar refletindo, principalmente, a alta frequência de seqüelas na população estudada.

O desempenho do método MEIA para a detecção de anticorpos IgM e do RCP-*Nested* foram pouco estudados na abordagem diagnóstica em TC. Neste estudo foi possível observar maior sensibilidade para anticorpos IgM, isoladamente, em relação aos demais, sendo muito semelhante ao desempenho do teste IgM ISAGA e da análise *Western blot* para IgG, IgM e IgA, ao nascimento (10,11). Porém, 40% dos casos foram dependentes de uma revelação diagnóstica mais tardia com a demonstração seriada de anticorpos IgG crescentes ou persistentes.

O estudo também sugere forte evidência para o diagnóstico de toxoplasmose congênita tanto na presença de anticorpos IgM quanto com a RCP-*Nested* positivo, isolados, considerando a grande variação da probabilidade pré-teste para a pós-teste. Mas existem limitações na interpretação destes resultados devido à pequena amostra analisada. Já a combinação destes dois testes em paralelo demonstrou ainda forte evidência para a possibilidade diagnóstica (RV positiva=43,3), com melhora no seu desempenho para afastar a possibilidade da doença congênita na ausência de resultados positivos para anticorpos IgM ou para RCP-*Nested* (RV negativa=0,3). A combinação em série, com os testes IgM e RCP-*Nested* positivos concomitantes, prejudicou a sensibilidade no rastreamento da infecção e, também, a possibilidade de ausência de doença quando os dois testes são negativos.

Concluimos que a aplicação dos testes MEIA para detecção de anticorpos IgM e da RCP-*Nested*, isoladamente, são apropriados para o rastreamento da doença congênita, na ausência de diagnóstico antenatal, com vantagem ainda maior quando consideramos a combinação de resultados negativos para os anticorpos IgM ou para

RCP-*Nested* para sugerir a ausência de doença. Mas a probabilidade de resultados falso-negativos com o uso de tratamento materno, mesmo que importante para prevenção de seqüelas (31), pode diminuir a sensibilidade dos testes. Outro fator que deve ser considerado na interpretação dos resultados é o momento da detecção do diagnóstico materno. Naessens A. *et al.* relataram que a detecção de anticorpos IgM variou entre 0% quando a infecção ocorreu antes de 20 semanas de gestação a 100% quando a infecção ocorreu após 34 semanas ($P<0,001$). Após a análise multivariável, os autores observaram que quanto mais precoce ocorreu a infecção materna, menos freqüente foi a detecção de IgM positiva no sangue neonatal ($P<0,001$). Porém, o tratamento antenatal não interferiu na sensibilidade do teste ($P=0,19$) (32). Este efeito não foi demonstrado neste estudo devido a limitação da amostra analisada. Consideramos que nestas duas situações é imprescindível reforçar a manutenção do completo seguimento do bebê para afastar definitivamente o diagnóstico da infecção congênita. Thalib L, *et al.*, em estudo multicêntrico, encontraram que a mudança da probabilidade pré para pós-teste foi máxima com resultados de RCP positivas no líquido amniótico na soroconversão após o primeiro trimestre. E não houve associação entre sensibilidade e tipo ou duração do tratamento. Houve diferenças na especificidade do teste quando considerados os diferentes centros ($P<0,001$) (33). Observamos um caso com resultado falso-positivo em RCP-*Nested* sérico. E Pelloux H *et al.* alertam sobre a falta de homogeneidade entre os protocolos e desempenho da RCP em amostra de líquido amniótico com as técnicas denominadas “*in house*”, reforçando a necessidade de controle de qualidade externo com amostras de “referência” (34). Uma nova perspectiva em biologia molecular tem surgido com o uso do *Real-time* PCR que permite a fácil quantificação do número de cópias de um

gen na amostra, além de ser um método rápido e automatizado limitando o risco de contaminação (35) e, também, com alta reprodutibilidade (36).

A proporção de perdas no seguimento dos bebês foi elevada, mas em estudo prévio foi demonstrado que as características dos grupos de bebês que completaram o seguimento não foram diferentes em relação àqueles que não completaram. Portanto, é improvável que as propriedades dos testes possam ser diferentes nesta sub-população em que não foi possível avaliar os critérios para a infecção congênita definitiva (22).

Existe grande interesse em conhecer as estratégias preventivas mais efetivas em toxoplasmose congênita. Os estudos atualmente disponíveis apontam para a fraca evidência do tratamento antenatal na redução da transmissão vertical (37). Entretanto, o benefício do tratamento pós-natal está demonstrado (24-28). As estratégias seletivas, isto é, a aplicação de rastreamento na presença de sintomas compatíveis com a doença ou de fatores de risco reconhecidos é capaz de identificar apenas 48% dos casos (38). E, em nosso estudo concluímos que os testes utilizados são altamente específicos, portanto os resultados positivos fazem acuradamente o diagnóstico (21). Se considerarmos que o contexto para rastreamento de toxoplasmose congênita exige testes de alta sensibilidade, é possível concluir que este grupo de exames ainda não é eficaz para excluir o diagnóstico no momento do nascimento. Portanto, a aplicação do rastreamento neonatal isolado nesta população, na ausência de rastreamento antenatal, identificaria, no máximo, 75,9% dos casos, com a associação dos testes detecção de anticorpos IgM, do DNA do *T. gondii* utilizando RCP e EFO, sem grande prejuízo da especificidade.

Concluimos que é fundamental que o rastreamento sistemático antenatal seja reforçado como medida preventiva importante na identificação de recém-nascidos expostos para evitar as seqüelas incapacitantes que acometem os bebês não tratados ao longo do seu primeiro ano de vida.

Categorias diagnósticas e critérios para diagnóstico de infecção primária durante a gestação¹
Diagnóstico definitivo <ul style="list-style-type: none">• Viragem sorológica• RN infectado
Diagnóstico provável <ul style="list-style-type: none">• IgG superior a 300 UI/mL²• Baixa avidéz de IgG²• IgG materna aumentando três vezes ou mais²
Diagnóstico possível <ul style="list-style-type: none">• Avidéz de IgG intermediária na segunda metade da gestação²• IgG inferior a 300 UI/mL e apenas um exame no momento do parto²• IgG inferior a 300 UI/mL e apenas um exame no pré-natal, na segunda metade da gestação²
Diagnóstico improvável <ul style="list-style-type: none">• IgG inferior a 300 UI/mL e alta avidéz de IgG com idade gestacional superior a 16 semanas²• IgG estável com exames realizados na segunda metade da gestação²

¹ Métodos sorológicos utilizados em gestantes – *Microparticle enzyme immunoassay* – MEIA (*Abbott Diagnostics AxSYM*[®] SYSTEM Toxo IgG e IgM versão 2.0), método de captura de IgM – *Enzyme linked fluorescent assay* – ELFA (VIDAS[®]) que, ao confirmar o teste reagente, desencadeou a realização do teste de avidéz de IgG, ainda na mesma amostra, com o método ELFA (VIDAS[®]).

² Resultados associados à presença de IgM reagente.

Quadro 1: Categorias diagnósticas e critérios para o diagnóstico de infecção primária durante a gestação. Adaptado de Lebech *et al.* (15).

Tabela 1 – Desempenho dos testes diagnósticos em Toxoplasmose Congênita – hemograma, ecografia transfontanelar, exame do líquido, exame de fundo de olho, detecção de anticorpos IgM para toxoplasmose e do DNA do *T. gondii* com reação em cadeia da polimerase.

Teste	Sensibilidade (%) (IC95%)	Especificidade (%) (IC95%)	RV Positiva (IC95%)	RV Negativa (IC95%)
HMG	3,2 (0,2 – 18,5)	99,0 (94,0 – 99,9)	3,35 (0,22 – 52,10)	0,98 (0,91 – 1,04)
ETF	9,7 (2,5 – 26,9)	99,0 (93,8 – 99,9)	9,77 (1,05 – 90,64)	0,91 (0,81 – 1,03)
LCR	15,4 (5,0 – 35,7)	94,6 (87,2 – 98,0)	2,83 (0,82 – 9,79)	0,89 (0,75 – 1,06)
RCP	25,8 (12,5 – 44,9)	99,0 (93,5 – 99,9)	24,77 (3,22 – 190,35)	0,75 (0,61 – 0,92)
EFO	27,6 (13,4 – 47,5)	100 (94,7 – 100,0)	49,86 (2,97 – 838,25)	0,72 (0,58 – 0,90)
IgM	60,0 (40,7 – 76,8)	100,0 (95,3 – 100,0)	119,35 (7,40 – 1923,92)	0,405 (0,26 – 0,62)

HMG = Hemograma; ETF = Ecografia transfontanelar; LCR = Líquido cefalorraquidiano; RCP = Reação em cadeia da polimerase; EFO = Exame de fundo de olho; IgM = Anticorpos IgM

RV = Razão de verossimilhança

Tabela 2 – Desempenho dos testes diagnósticos em Toxoplasmose Congênita em paralelo – hemograma, ecografia transfontanelar, exame do líquido, exame de fundo de olho, detecção de anticorpos IgM para toxoplasmose e do DNA do *T. gondii* com reação em cadeia da polimerase.

Teste	Sensibilidade (%) (IC95%)	Especificidade (%) (IC95%)	RV Positiva (IC95%)	RV Negativa (IC95%)
IgM ou RCP	67,7 (48,5 – 82,7)	94,8 (93,9 – 99,7)	43,3 (10,7 – 175,2)	0,3 (0,2 – 0,5)
IgM, RCP ou EFO	75,9 (56,1 – 89,0)	98,2 (92,9 – 99,7)	41,3 (10,3 – 165,7)	0,25 (0,13 – 0,47)
IgM, RCP, EFO, ETF, LCR ou HMG	88,9 (67,7 – 97,1)	90,7 (82,7 – 95,4)	9,6 (5,1 – 18,1)	0,1 (0,04 – 0,4)

HMG = Hemograma; ETF = Ecografia transfontanelar; LCR = Líquido cefalorraquidiano; RCP = *Reação em cadeia da polimerase*; EFO = Exame de fundo de olho; IgM = Anticorpos IgM.

RV = Razão de verossimilhança.

Tabela 3 – Desempenho dos testes diagnósticos em Toxoplasmose Congênita em série – hemograma, ecografia transfontanelar, exame do líquido, exame de fundo de olho, detecção de anticorpos IgM para toxoplasmose e do DNA do *T. gondii* com reação em cadeia da polimerase.

Teste	Sensibilidade (%) (IC95%)	Especificidade (%) (IC95%)	RV Positiva (IC95%)	RV Negativa (IC95%)
IgM e RCP	33,3 (13,0 – 61,3)	100,0 (96,3 – 100,0)	87,3 (5,1 – 1506,5)	0,7 (0,5 – 0,9)
IgM, RCP e EFO	22,2 (3,9 – 59,8)	100,0 (95,7 – 100,0)	134,6 (1,5 – 12219,6)	0,75 (0,5 – 1,1)
IgM, RCP, EFO, ETF, LCR e HMG	NO	NO	NO	NO

HMG = Hemograma; ETF = Ecografia transfontanelar; LCR = Líquido cefalorraquidiano; RCP = *Reação em cadeia da polimerase*; EFO = Exame de fundo de olho; IgM = Anticorpos IgM.

RV = Razão de verossimilhança.

NO = Não foram obtidos resultados devido ausência de resultados positivos com todos os testes.

Tabela 4 – Razões de verossimilhança para os seis testes realizados para o diagnóstico de toxoplasmose congênita ao nascimento, estratificadas de acordo com o número de testes positivos.

Nº de testes positivos	RV	(IC95%)
0	0,2	(0,1 – 0,5)
1	7,9	(3,3 – 18,8)
2	16,9	(2,0 – 139,6)
3 ou mais*	36,4	(2,1 – 641,4)

* Correção de Agresti (Agresti A. Categorical Data Analysis, 1990)

Referências bibliográficas

1. Remington JS, McLeod R, Thulliez P, Desmonts G. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein JO, editors. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. 6th ed. Philadelphia: WB Saunders; 2005. p.947-1091.
2. Jones JL, Lopez A, Wilson M, Schulkin J, Gibbs R. Congenital toxoplasmosis: a review. *Obstet Gynecol Surv* 2001;56:296-305.
3. Pelloux H, Brenier-Pinchart MP, Fricker-Hidalgo H. Protozoan infections in humans: congenital toxoplasmosis. *Eur J of Protistology* 2003;39:444-448.)
4. Naot Y, Desmonts G, Remington JS. IgM enzyme-linked immunosorbent assay test for the diagnosis of congenital toxoplasma infection. *J Pediatr* 1981;98:32-6.
5. Stepick-Biek P, Thulliez P, Araújo FG, Remington JS. IgA antibodies for diagnosis of acute congenital and acquired toxoplasmosis. *J Infect Dis* 1990;162:270-3.
6. Ecochard R, Landrison G, Colin C, Creac'h P, Wallon M, Gandilhon F, et al. Analyse de decision dans la toxoplasmose congénitale en l'absence de connaissance exacte des bénéfices et effets secondaires de la thérapeutique. *Rev Epidemiol Santé Publique* 1996;44:145-54.
7. Naot Y, Remington JS. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of IgM antibodies to toxoplasma gondii: use for diagnosis of acute acquired toxoplasmosis. *J Infect Dis* 1980;142:757-66.
8. Zufferey J, Hohlfeld P, Bille J, Fawer CL, Blanc D, Pinon JM, et al. Value of the comparative enzyme-linked immunofiltration assay for early neonatal diagnosis of congenital toxoplasma infection. *Pediatr Infect Dis J* 1999;18:971-5.
9. Pinon JM, Chemla C, Villena I, Foudrinier F, Aubert D, Puygauthier-Toubas D, et al. Early neonatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: value of comparative enzyme-linked immunofiltration assay immunological profiles and antitoxoplasma gondii immunoglobulin M (IgM) or IgA immunocapture and implications for postnatal therapeutic strategies. *J Clin Microbiol* 1996;34:579-83.
10. Wallon M, Dunn D, Slimani D, Girault V, Gay-Andrieu F, Peyron F. Diagnosis of congenital toxoplasmosis at birth: what is the value of testing for IgM and IgA? *Eur J Pediatr* 1999;158:645-649.
11. Tissot Dupont D, Fricker-Hidalgo H, Brenier-Princhart MP, Bost-Bru C, Ambroise-Thomas P, Pelloux H. Usefulness of Western Blot in Serological Follow-Up of Newborns Suspected of Congenital Toxoplasmosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003;22:122-125.

12. 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.
13. Gratzl R, Hayde M, Kohlhauser C, Hermon M, Burda G, Strobl W, Pollak A. Follow-up of infants with congenital toxoplasmosis detected by polymerase chain reaction analysis of amniotic fluid. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17(12):853-8.
14. Foulon W, Pinon JM, Stray-Pedersen B, Pollak A, Lappalainen M, Decoster A, Villena I, Jenum PA, Hayde M, Naessens A. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: A multicenter evaluation of different diagnostic parameters. *Am J Obstet Gynecol* 1999;181(4):843-847.
15. 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;97:296-300.
16. Remington JS, Thulliez P, Montoya JG. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 2004;42(3):941-945.
17. van de Ven E, Melchers W, Galama J, Camps W, Meuwissen J. Identification of *Toxoplasma gondii* infections by BI gene amplification. *J Clin Microbiol* 1991;29(10):2120-4.
18. Gross U, Müller J, Roos T, Schrod L, Heesemann J. Possible reasons for failure of conventional tests for diagnosis of fatal congenital toxoplasmosis: report of a case diagnosed by PCR and immunoblot. *Infection* 1992;20(3):149-52.
19. Fuentes I, Rodriguez M, Domingo CJ, Castillo F, Juncosa T, Alvar J. Urine sample used for congenital toxoplasmosis diagnosis by PCR. *J Clin Microbiol* 1996;34: 2368-71.
20. Lebech M, Joynson DHM, Seitz HM, Thulliez P, Gilbert RE, Dutton GN, Øvlisen B, Petersen E. Classification System and Case Definitions of *Toxoplasma gondii* Infection in Immunocompetent Pregnant women and their congenitally infected offspring. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;15:799-805.
21. Sackett DL, Straus SE, Richardson WS, Rosenberg W, Haynes RB, editors. *Medicina baseada em evidências – prática e ensino*. 2nd ed. Porto Alegre: Artmed; 2003.
22. Jaeschke R, Guyatt GH, Sackett DL, for the Evidence-Based Medicine Working Group. Users' Guides to the Medical Literature, III: how to use an article about a Diagnostic Test, B: What are the results and will they help me in caring for my patients? *JAMA*. 1994;271(9):703-7.

23. Deeks JJ, Altman DG. Diagnostic tests 4: likelihood ratios. *BMJ* 2004;329:168-169.
24. Mets MB, Holfels E, Boyer KM, Swisher CN, Roizen N, Stein L, et al. Eye manifestations of congenital toxoplasmosis. *Am J Ophthalmol* 1996;122:309-24.
25. McAuley J, Boyer KM, Patel D, Mets M, Swisher C, Roizen N, et al. Early and longitudinal evaluations of treated infants and children and untreated historical patients with congenital Toxoplasmosis: The Chicago Collaborative Treatment Trial. *Clin Infect Dis* 1994;18:38-72.
26. Wallon M, Kodjikian L, Binquet C, Garweg J. Long-term ocular prognosis in 327 children with congenital toxoplasmosis. *Pediatrics* 2004;113:1567-1572.
27. Roizen N, Swisher CN, Stein MA, Hopkins J, Boyer KM, Holfels E, et al. Neurologic and developmental outcome in treated congenital toxoplasmosis. *Pediatrics* 1996; 96(1):11-20.
28. Patel DV, Holfels EM, Vogel NP, Boyer KM, Mets MB, Swisher CN, et al. Resolution of intracranial calcifications in infants with treated congenital toxoplasmosis. *Radiology* 1996;199(2):433-40.
29. Sáfadi MAP, Farhat CK. Toxoplasmose. In: Farhat CK, Carvalho ES, Carvalho LHFR, Succi RCM. *Infectologia pediátrica*. 2ª ed. São Paulo: Atheneu; 1999. p. 612-9.
30. Guerina NG. Toxoplasmose. In: Cloherty JP, Stark AR, editors. *Manual de Neonatologia*. 4ª edição. Rio de Janeiro: MEDSI; 2000.p.333-343.
31. Foulon W, Villena I, Stray-Pedersen B, Decoster A, Lappalainen M, Pinon JM, et al. Treatment of toxoplasmosis during pregnancy: a multicenter study of impact on fetal transmission and children's sequelae at age 1 year. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180:410-5.
32. Naessens A, Jenum P, Pollak A, Decoster A, Lappalainen A, Villena I, Lebech M, Stray-Pedersen B, Hayde M, Pinon JM, Petersen E, Foulon W. Diagnosis of congenital toxoplasmosis in the neonatal period: a multicenter evaluation. *J Pediatr* 1999;135:714.
33. 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* 2005;112(5):567-74.
34. Pelloux H, Guy E, Angelici MC, Aspöck H, Bessières MH, Blatz R et al. A second European collaborative study on polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii*, involving 15 teams. *FEMS Microbiol Lett* 1998;165(2):231-7.

35. Yera H, Tzen M, Dupouy-Camet J. Molecular biology for detection and characterization of protozoan infections in humans. *Eur J Protistol* 2003;39(4):435-43.
36. Lin MH, Chen TC, Kuo TT, Tseng CC, Tseng CP. Real-time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol* 2000;38(11):4121-5.
37. The Systematic Review on Congenital Toxoplasmosis (SYROCOT) study group. Effectiveness of prenatal treatment for congenital toxoplasmosis: a meta-analysis of individual patient's data. *Lancet* 2007;369(9556):115-22.
38. Boyer KM, Holfels E, Roizen N, Swisher C, Mack D, Remington JS *et al*. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in mothers of infants with congenital toxoplasmosis: implications for prenatal management and screening. *Am J Obstet Gynecol* 2005;192:564-71.

10 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

10.1 Artigo 1 – Prevalência de Toxoplasmose aguda em gestantes

A infecção congênita pelo *T. gondii* ocorre por transmissão transplacentária quando a mãe adquire a infecção aguda durante a gestação. Para a detecção de doença materna é necessário o rastreamento preferencialmente antes da gestação para distinguir as pacientes imunes das suscetíveis à infecção (1). Esta abordagem preventiva é adotada em diferentes países como estratégias dependentes de vários fatores, mas principalmente, da sua frequência na população (2).

Aspectos metodológicos

a. Delineamento

O desenho transversal foi escolhido para o cálculo de uma proporção simples com o objetivo de medir a prevalência de toxoplasmose aguda em gestantes e, simultaneamente contemplar a factibilidade do estudo. Em termos ideais os eventos agudos devem ser estudados a partir de estudos de coorte, quando um grupo de indivíduos, expostos e não expostos a um determinado fator são acompanhados por um período de tempo adequado até o aparecimento ou não de um desfecho de interesse (3,4). Entretanto, como o fator exposição e o desfecho foram coletados simultaneamente houve algum prejuízo no estabelecimento definitivo de infecção aguda na gestação e na taxa de soroconversão, uma vez que para tal seria necessário identificar precocemente as gestantes suscetíveis, realizar as sorologias seriadas até o final da gestação para identificar, com certeza, a soroconversão. Em nosso meio, esta situação não faz parte da realidade, por vários fatores: desconhecimento do *status* sorológico em 23% dos casos antes do parto; o acesso ao serviço de referência ocorre com a suspeição diagnóstica e, portanto, após a soroconversão; a média da idade

gestacional no momento da primeira sorologia no serviço de referência é tardia. Para compensar esta limitação utilizamos os critérios estabelecidos por Lebech *et al.* que permitiu distribuir as gestantes em categorias diagnósticas de acordo com a probabilidade de doença aguda.

O período prolongado de captação de gestantes (1998-2005) permitiu estudar uma amostra de 41.112 gestantes, mas novas tecnologias foram introduzidas neste período e, assim, poderiam ter influenciado na medida da frequência ao longo do tempo. O estudo mostrou que a introdução do teste de avidéz de IgG não explicou a redução da frequência no período 2, e apontou para a hipótese de que o teste de captura de IgM poderia explicar este efeito. Futuros estudos em uma amostra desta população poderão avaliar esta associação.

Pode-se concluir que a prevalência estimada nesta população foi elevada e que esta questão de pesquisa pode ser ampliada para a identificação de fatores de risco e análise de custo-efetividade do rastreamento, para embasar e definir as estratégias de prevenção em gestantes usuárias do sistema público.

10.2 Artigo 2 – Incidência de toxoplasmose congênita e taxa de transmissão vertical

O objetivo principal no manejo clínico e epidemiológico da infecção pelo *T. gondii* em gestantes é identificar as pacientes suscetíveis e reduzir a ocorrência de infecção aguda, a transmissão vertical, a frequência e a gravidade das seqüelas entre crianças afetadas (2).

Atualmente, os pesquisadores e as autoridades em saúde pública visam responder uma questão relacionada às estratégias preventivas com melhor custo-efetividade em toxoplasmose congênita. Esta resposta depende de uma série de fatores e apresenta variabilidade em diferentes populações. Então, o objetivo nesta pesquisa foi identificar a magnitude do problema nesta população para fornecer substrato aos futuros estudos que possam auxiliar no estabelecimento de estratégias preventivas em nosso meio.

Delineamento

O estudo de coorte tem a vantagem de selecionar indivíduos que ainda não desenvolveram o evento de interesse e, portanto, avaliar a relação entre a exposição e o desfecho. Neste estudo, este desenho foi selecionado para obter o diagnóstico definitivo de toxoplasmose congênita e avaliar a taxa de transmissão vertical em dois momentos – ao nascimento e aos 12 meses de vida. Portanto, o seguimento dos bebês permitiu apenas o estabelecimento do diagnóstico e a detecção de seqüelas, embora a transmissão da doença já tivesse ocorrido intra-útero entre os afetados.

Uma das maiores fontes de erro em estudos de coorte se encontra no grau de acurácia com que os sujeitos são classificados quanto à exposição e ao *status* de doença (3).

A definição de caso de toxoplasmose congênita tem apoio nos critérios de Lebech *et al.* e na realização do padrão ouro com a medida de IgG no final do primeiro ano de vida. Portanto, não apresentando problemas na acurácia do diagnóstico uma vez que a amostra foi composta de 92% de bebês com diagnóstico definitivo.

A categoria de exposição dos bebês foi dependente da definição de caso de infecção aguda materna. Para tal, também adotamos os critérios de Lebech *et al.*, com adaptações, que inclui diferentes graus de precisão diagnóstica. Como isto, incluímos na categoria de exposição, aqueles bebês cujas mães apresentaram baixo grau de suspeição – categoria possível. Entretanto, estaríamos apenas subestimando os resultados, pois o número de mulheres com infecção aguda poderia ser menor, aumentando ainda mais a taxa de transmissão. Por outro lado, a estratificação quanto aos graus de suspeição diagnóstica permitiu medir a taxa de transmissão vertical conforme as diferentes categorias de gestantes. E demonstrou, ainda, que não se deve desprezar a possibilidade de toxoplasmose congênita na categoria de diagnóstico materno possível, embora a probabilidade de doença seja menor. Além disso, permitiu representar a realidade das gestantes atendidas em hospital público e, que ainda tem o diagnóstico tardio em serviço de referência e, portanto, menos preciso.

Um outro aspecto metodológico está relacionado ao efeito das perdas. Como observado, não houve diferença entre as características dos bebês que completaram o seguimento, comparadas àqueles que não retornaram. O aspecto que deve ser enfatizado é que a taxa de transmissão foi calculada considerando toda a população incluída no início do seguimento, portanto, esta taxa pode ser ainda maior, o que agrava ainda mais o quadro, pois os indivíduos que não completaram o seguimento somente podem tornar-se casos.

Concluimos que a taxa de transmissão vertical foi elevada, e o achado de 12 casos adicionais aos 12 meses de vida, que representam aproximadamente 40% dos casos de toxoplasmose congênita, reforça a necessidade de seguimento para estabelecer o diagnóstico definitivo.

10.3 Artigo 3 – Desempenho dos testes diagnósticos em toxoplasmose congênita

A toxoplasmose congênita é uma doença que é, geralmente, assintomática ou subclínica ao nascimento. Entretanto, as crianças podem desenvolver, posteriormente, incapacidades graves, como o déficit neurológico e a coriorretinite (1,5).

O padrão ouro para o diagnóstico definitivo de toxoplasmose congênita é a persistência de anticorpos IgG específicos em torno de doze meses de vida, o que determina uma definição tardia do caso (1,6). Conseqüentemente, é importante estabelecer a acurácia dos métodos atualmente utilizados no momento do nascimento, ou seja, diagnóstico precoce ou rastreamento, uma vez que eles se constituem a base para a tomada de decisões relacionadas ao tratamento dos recém-nascidos expostos ao parasito.

Algumas doenças não são candidatas adequadas para a aplicação de um programa de rastreamento. Para ser apropriada para rastreamento a doença deve ser grave e o tratamento antes do aparecimento de sintomas deve ser mais benéfico quanto à morbimortalidade do que se aplicado após o seu desenvolvimento (3). Deve-se considerar, então, que o tratamento do bebê com toxoplasmose congênita ao longo do primeiro ano de vida tem importante efeito protetor quanto ao possível desenvolvimento de seqüelas irreversíveis, e sua recrudescência (7-11). Todavia, não podem ser desprezados os efeitos colaterais que podem surgir com o uso de medicamentos (1). Portanto, o manejo adequado dos recém-nascidos exige discriminar com maior precisão possível os bebês doentes entre os não doentes. Este cenário predispõe a maioria dos pediatras e neonatologistas a enfrentarem um dilema

diante destas situações inconclusivas exigindo uma análise criteriosa na interpretação dos testes diagnósticos em toxoplasmose congênita.

A contínua proliferação de novas tecnologias impõe constante atualização de conhecimentos para avaliar estes testes e, principalmente, os artigos com enfoque diagnóstico com o objetivo de extrair a melhor informação que eles podem fornecer (12).

10.3.1 Aspectos metodológicos relacionados à validade dos resultados

Questões primárias

a. Características do padrão ouro:

O padrão ouro utilizado neste estudo foi, também, adotado na maioria dos artigos publicados o que permite estabelecer as comparações. Adicionalmente, por se tratar de um teste automatizado, apresenta precisão e reprodutibilidade. A desvantagem no seu uso é que ele exige um longo tempo de seguimento o que favorece as perdas.

b. Comparação independente e cega com o padrão ouro:

Houve comparação independente e cega de todos os testes diagnósticos aplicados no momento do nascimento em relação ao padrão ouro. O teste de referência foi aplicado de forma seriada até os doze meses de vida, aproximadamente, sendo o seu processamento automatizado e o técnico responsável no setor de imunologia do hospital não recebia informações a respeito das condições clínicas e resultados laboratoriais anteriores.

c. Espectro de pacientes:

Uma das grandes dificuldades no início do estudo foi determinar qual o critério de seleção das gestantes e, conseqüentemente, quais os recém-nascidos expostos, considerando um cenário heterogêneo de gestantes quanto aos recursos diagnósticos e idade gestacional no momento da investigação. A maioria dos estudos adota o critério soroconversão confirmada o que promove maior precisão de seus resultados. Optamos pelo sistema de classificação e definição de caso de toxoplasmose aguda e congênita elaborados por Lebech *et al.*, com adaptações realizadas pelos autores da pesquisa, o que permitiu estudar um espectro mais amplo de pacientes, com diferentes graus de suspeição diagnóstica. A justificativa para a adequação dos critérios utilizados tem como base a introdução de novas tecnologias diagnósticas como o teste de avidéz de IgG. Assim obtivemos três categorias diagnósticas para a infecção aguda por *T. gondii* em gestantes: definitiva, provável e possível obtendo três níveis de precisão diagnóstica. Isto poderia influenciar os resultados dos testes avaliados. A inclusão de recém-nascidos cujas mães apresentaram diagnóstico possível poderia aumentar a proporção de recém-nascidos não doentes, quando na realidade se tratariam de bebês cujas mães poderiam não ter a doença aguda no momento da gestação. Para controlarmos este possível viés de seleção poderíamos avaliar o desempenho dos testes estratificando por grupos de acordo com os três níveis de probabilidade de infecção aguda materna, o que foi inviabilizado devido ao pequeno tamanho da amostra. Então, quando incluímos uma amostra que abrange um espectro tão amplo quanto aos diferentes graus de suspeição diagnóstica permitimos a aplicabilidade e a reprodutibilidade na prática clínica considerando a clara definição dos critérios adotados no estudo. É importante

salientar que observamos a transmissão da doença mesmo na categoria de diagnóstico possível o que reforçou a sua inclusão na população em estudo.

Questões secundárias

a. Os resultados dos testes aplicados no momento do nascimento influenciaram na decisão de realizar o padrão ouro?

Todos os bebês em acompanhamento ambulatorial realizaram o teste de referência até que seus resultados fossem não reagentes ou persistentemente reagentes após os doze meses de vida, independente do resultado dos testes iniciais, o que evitaria “*verification bias*”. Mas houve um grupo de recém-nascidos (32%) que não retornou para o acompanhamento, impedindo a realização do “teste de referência” e definição do caso. Embora esta proporção de casos não seja pequena, as suas características são semelhantes ao grupo de bebês com seguimento, portanto, é improvável que as propriedades dos testes possam ser diferentes nesta subpopulação. Além disso, as perdas no seguimento não estavam relacionadas ao fator exposição ou desfecho (3).

b. Descrição dos detalhes metodológicos:

Os testes mais enfatizados no estudo foram a detecção de anticorpos IgM específicos e do DNA do *T. gondii* com RCP-*Nested*. Foi importante detalhar a confirmação dos resultados positivos de IgM após os 5 dias de vida e a introdução de tratamento empírico somente após a coleta de sangue do RN para RCP-*Nested*.

Para que possamos avaliar o desempenho diagnóstico de um teste primeiramente deve-se estabelecer um critério de positividade, o que foi contemplado, principalmente, em relação aos valores de referência para a detecção de anticorpos IgM-MEIA e IgG-MEIA, quantitativos. O resultado da RCP-*Nested* é apresentado pelos laboratórios utilizados como positivo ou negativo.

10.3.2 Aspectos metodológicos relacionados aos resultados do estudo – acurácia

A evidência da importância de um exame diagnóstico depende do grau de sua acurácia em distinguir entre o grupo com e sem a doença-alvo, tanto em termos dos conceitos sensibilidade e especificidade, quanto em razões de verossimilhança (12).

a. Sensibilidade e Especificidade

Colocando a ênfase na detecção de anticorpos IgM específicos e RCP-*Nested* observamos que houve baixa sensibilidade para ambos. Por outro lado se mostraram mais úteis pelas suas especificidades. Assim, quando os testes são altamente específicos, como observado nesta pesquisa, os resultados positivos fazem acuradamente o diagnóstico (12). Se considerarmos que o contexto para rastreamento de toxoplasmose congênita exige testes de alta sensibilidade, podemos concluir que este grupo de exames ainda não é suficientemente acurado para excluir definitivamente o diagnóstico no momento do nascimento. Portanto, os testes foram úteis para discriminar doentes quando os seus resultados foram positivos, mas os resultados negativos não puderam excluir o diagnóstico, devido as suas baixas sensibilidades.

b. Razões de verossimilhança

As razões de verossimilhança são alternativas estatísticas para sumarizar a acurácia diagnóstica que tem várias propriedades particularmente poderosas que as tornam mais úteis clinicamente do que as outras estatísticas, e por isso foram mais enfatizadas no artigo (15).

Cada teste tem suas próprias razões de verossimilhança, que sumariza quantas vezes é mais (ou menos) provável que os pacientes tenham a doença com determinado resultado de um teste, quando comparados aqueles sem a doença (15).

Outra vantagem na utilização de razões de verossimilhança é que se torna possível medir a magnitude desta mudança da probabilidade pré-teste em relação à pós-teste. Quanto mais distante do 1 for seu resultado, mais forte é a evidência para a presença ou ausência de doença. Além disso, as razões de verossimilhança são razões de probabilidades e podem ser tratadas da mesma forma como risco relativo para o cálculo dos intervalos de confiança (15). A partir dos intervalos de confiança alargados encontrados na pesquisa, observamos a limitada amostra estudada, o que determinou maior imprecisão das estimativas. A expectativa é de que futuros estudos com métodos estatísticos mais robustos como a metanálise possam proporcionar maior precisão destes achados.

10.3.3 Aspectos práticos dos testes estudados

a. Reprodutibilidade, disponibilidade, acurácia:

O processamento do método MEIA para a detecção de anticorpos IgM e IgG específicos não depende da avaliação de observadores, portanto, não foi necessário

avaliar a sua concordância. É um teste automatizado, reproduzível, considerando esta característica, e adaptado para grandes rotinas. O aparelho deve ser periodicamente calibrado e o laboratório dispõe de amostras para realizar o controle de qualidade, também, periodicamente.

No laboratório do Hospital Nossa Senhora da Conceição ainda não é possível realizar o teste de detecção do DNA do *T. gondii* com *Polymerase Chain Reaction*, portanto, durante o período de estudo (1998-2005), este teste foi realizado em três diferentes laboratórios externos. Consideramos uma importante limitação do estudo relacionada à especificidade do teste, uma vez que observamos resultados falso-positivos. Vários autores têm relatado a importância de aderir rigorosamente aos protocolos quando se utilizam métodos moleculares para o diagnóstico enfatizando que resultados falso-positivos são evitados com técnica apropriada (15). Yera H *et al.* relatam as vantagens na utilização da biologia molecular para diagnóstico de infecções por protozoários – não requer grandes amostras, é rápido e permite associar genótipos com virulência e, conseqüentemente, ampliar nossos conhecimentos sobre a transmissão da doença. Acrescenta que os altos custos e a falta de padronização de kits diagnósticos resultando em resultados discrepantes entre laboratórios, podem limitar o seu uso (17).

Concluímos que houve limitação na interpretação dos resultados devido às características inerentes da técnica RCP-*Nested* que apresenta prejuízo na sua reprodutibilidade com conseqüente aparecimento de resultados falso-positivos. Além disso, o fato de utilizarmos três laboratórios diferentes pode também ter colaborado para a imprecisão dos resultados. Um estudo multicêntrico europeu para testar a técnica em amostra de líquido amniótico, também identificou as mesmas

dificuldades, com prejuízo significativo na especificidade do teste ao comparar o desempenho deste conforme os nove diferentes centros ($P < 0,001$) (18).

Pelloux H *et al.* também detectaram a falta de homogeneidade entre os protocolos de RCP ao comparar seu desempenho em líquido amniótico em 15 laboratórios europeus incluídos no estudo e reforçam a necessidade de um controle de qualidade externo para estabelecer e manter a acurácia de teste diagnóstico com base em RCP (19).

b. Os resultados dos testes mudam o manejo dos pacientes?

Considerando o menor valor do intervalo de confiança de 95%, observamos que a probabilidade de doença na presença de IgM-MEIA reagente ou RCP-*Nested* positivo é, no mínimo, 7 e 3 vezes maiores do que a probabilidade de toxoplasmose congênita quando seus resultados são negativos, respectivamente. A magnitude destes efeitos é moderada e pequena, mas às vezes importante, respectivamente.

Atualmente, existem protocolos que sugerem o tipo de tratamento empírico com base em critérios diagnósticos maternos e clínicos do recém-nascido. Porém, devemos considerar que existe um grupo de recém-nascidos assintomáticos, com diagnóstico materno de infecção aguda inconclusivo (critério provável e possível) e que seria beneficiado com a aplicação do teste IgM-MEIA e RCP-*Nested*, que modificariam significativamente a probabilidade de doença na presença de resultado reagente. Então, poderia-se inferir que a escolha entre um tratamento mais efetivo, mas que ao mesmo tempo predispõe com maior frequência aos efeitos adversos, poderia ser escolhido na presença de resultados positivos dos testes que apresentaram a máxima razão de verossimilhança positiva - IgM-MEIA, EFO e RCP-*Nested*. Mas

deve-se enfatizar que seus resultados negativos, isoladamente, não afastam com segurança a possibilidade de ausência de doença, principalmente, quando é realizado tratamento materno durante a gestação. Por outro lado, observamos que a presença de resultados negativos nos seis testes sugere o uso de um esquema de tratamento menos efetivo, mas também menos agressivo quanto aos efeitos colaterais, até que se comprove definitivamente a ausência de doença (RV=0,2; IC 95%:0,1 – 0,5).

Em resumo, a aplicabilidade dos resultados encontrados no estudo se encontra na escolha do tratamento empírico no momento do nascimento, considerando a baixa sensibilidade dos testes estudados.

Finalmente, apesar das limitações relacionadas às baixas sensibilidades dos testes estudados, o rastreio pré-natal, com a identificação de gestantes com infecção aguda permite a identificação dos bebês expostos ao *T. gondii*. Portanto, permite que os casos inicialmente falso-negativos sejam definidos como doença congênita com o seguimento até os 12 meses de vida. Esta possibilidade não seria vivável com o tratamento neonatal isolado.

Referências bibliográficas das considerações finais e conclusão

1. Remington JS, McLeod R, Thulliez P, Desmonts G. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein JO, editors. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. 6th ed. Philadelphia: WB Saunders; 2005. p.947-1091.
2. Symposium Européen sur la toxoplasmose congénitale. Arch Pédiatr 2003;10(1):1-48.
3. Hennekens CH, Buring JE, Mayrent SL, editors. Epidemiology in medicine. Boston: Little, Brown and Company; 1987.
4. Gordis L. Measuring the occurrence of disease. In: Gordis L, editor. Epidemiology. Philadelphia: WB Saunders; 1996. p.30-57.
5. Jones JL, Lopez A, Wilson M, Schulkin J, Gibbs R. Congenital toxoplasmosis: a review. Obstet Gynecol Surv 2001;56:296-305.
6. Pelloux H, Brenier-Pinchart MP, Fricker-Hidalgo H. Protozoan infections in humans: congenital toxoplasmosis. Eur J of Protistology 2003;39:444-448.
7. Mets MB, Holfels E, Boyer KM, Swisher CN, Roizen N, Stein L, et al. Eye manifestations of congenital toxoplasmosis. Am J Ophthalmol 1996;122:309-24.
8. McAuley J, Boyer KM, Patel D, Mets M, Swisher C, Roizen N, et al. Early and longitudinal evaluations of treated infants and children and untreated historical patients with congenital Toxoplasmosis: The Chicago Collaborative Treatment Trial. Clin Infect Dis 1994;18:38-72.
9. Wallon M, Kodjikian L, Binquet C, Garweg J. Long-term ocular prognosis in 327 children with congenital toxoplasmosis. Pediatrics 2004;113:1567-1572.
10. Roizen N, Swisher CN, Stein MA, Hopkins J, Boyer KM, Holfels E, et al. Neurologic and developmental outcome in treated congenital toxoplasmosis. Pediatrics 1996; 96(1):11-20.
11. Patel DV, Holfels EM, Vogel NP, Boyer KM, Mets MB, Swisher CN, et al. Resolution of intracranial calcifications in infants with treated congenital toxoplasmosis. Radiology 1996;199(2):433-40.
12. Sackett DL, Straus SE, Richardson WS, Rosenberg W, Haynes RB, editors. Medicina baseada em evidências – prática e ensino. 2nd ed. Porto Alegre: Artmed; 2003.
13. Jaeschke R, Guyatt GH, Sackett DL, for the Evidence-Based Medicine Working Group. Users' Guides to the Medical Literature, III: how to use an

- article about a Diagnostic Test, A: Are the results of study valid? JAMA. 1994; 271(5):389-91.
14. Jaeschke R, Guyatt GH, Sackett DL, for the Evidence-Based Medicine Working Group. Users' Guides to the Medical Literature, III: how to use an article about a Diagnostic Test, B: What are the results and will they help me in caring for my patients? JAMA. 1994;271(9):703-7.
 15. Deeks JJ, Altman DG. Diagnostic tests 4: likelihood ratios. BMJ 2004;329:168-169.
 16. Bhalla M, Johnson JD, Holliman RE, Savva D. Misdiagnosis of toxoplasma infection by PCR: fears unfounded. J Clin Pathol. 1999;52:468-70.
 17. Yera H, Tzen M, Dupouy-Camet J. Molecular biology for detection and characterization of protozoan infections. Eur J Protistol. 2003;39(4):435-43.
 18. 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 2005;112(5):567-74.
 19. Pelloux H, Guy E, Angelici MC, Aspöck H, Bessièrès MH, Blatz R et al. A second European collaborative study on polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii*, involving 15 teams. FEMS Microbiol Lett 1998;165(2):231-7.

ANEXOS

- a. Projeto de Pesquisa [versão aprovada na defesa de projeto]
- b. Aprovação pelo Comitê da Ética e Pesquisa
- c. Questionários / Formulários

ANEXO A – PROJETO DE PESQUISA

Prevalência de Toxoplasmose Aguda em gestantes, Incidência de Toxoplasmose Congênita e Desempenho de Testes Diagnósticos em Toxoplasmose Congênita

1. Introdução

O *Toxoplasma gondii* pode determinar infecção fetal através de passagem transplacentária quando a mãe adquire infecção durante a gestação ou, menos comumente, quando mulheres cronicamente infectadas têm um imunocomprometimento importante (1,2).

1.1. Magnitude do problema

A incidência de toxoplasmose durante a gestação é variada em diferentes populações e foi estimada numa faixa de três a seis casos por 1.000 nativos nos países de alto risco e de um a dois casos por 1.000 nativos nos países de baixo risco (3).

A freqüência de toxoplasmose congênita varia entre 0,1/1.000 nascimentos nos Estados Unidos (4), 0,42/1.000 nascimentos na Dinamarca (5) e até 1,9 a 3,2/1.000 em Paris (1).

Na população de gestantes do Hospital Nossa Senhora da Conceição, em Porto Alegre, inicialmente foi identificada a prevalência de soropositividade para toxoplasmose atingindo 59,8% (IC95%:57,0%-62,5%). Este dado sugere que as gestantes suscetíveis estão expostas a um elevado risco de infecção aguda considerando a alta prevalência nesta população, semelhante à França (6). Outro

estudo aponta prevalência de soropositividade para toxoplasmose em gestantes, tão elevada quanto 74,5% na região noroeste do Rio Grande do Sul (7).

1.2. Transcendência

A morbidade observada, como consequência da infecção congênita, é o dano neurológico tal como hidrocefalia ou microcefalia, retardo neuropsicomotor e epilepsia, ou déficit visual progressivo e irreversível em qualquer época da vida (1,4,8).

Um dos problemas da toxoplasmose congênita é que a forma de manifestação mais comum é subclínica ao nascimento em 76% dos casos observados em um período de seguimento de seis meses a quatro anos (1,8,9).

Portanto, o diagnóstico da toxoplasmose congênita depende inicialmente do rastreamento sorológico em gestantes para identificar ocorrência de soroconversão e posteriormente proceder à avaliação diagnóstica do recém-nascido.

1.3. Vulnerabilidade

O objetivo do rastreamento em gestantes é instituir medidas de prevenção primária para mulheres soronegativas promovendo uma redução de 63% nas taxas de soroconversão (10) e assegurar o diagnóstico precoce e tratamento da gestante com infecção aguda para prevenir a ocorrência e a gravidade das seqüelas (11).

É amplamente aceito que os rastreamentos, como ações preventivas secundárias, devem ser direcionados a problemas de saúde freqüentes e graves. A importância do problema em saúde está, intimamente, relacionada com sua freqüência na população (10). Assim, é fundamental que se conheça a prevalência da

toxoplasmose aguda em gestantes da nossa população para estimar a magnitude do problema e permitir a avaliação das estratégias diagnósticas adotadas até o momento no diagnóstico de toxoplasmose congênita (12).

2. Justificativa

O desenvolvimento deste projeto tem como base aspectos que envolvem as estratégias preventivas em toxoplasmose congênita. Estas medidas têm como objetivo reduzir a incidência de infecção aguda na gestação, detecção precoce e instituição de tratamento na gestante e no recém-nascido. Conseqüentemente haveria redução da transmissão vertical, da ocorrência de seqüelas freqüentes como as oculares e neurológicas, bem como a gravidade destas (10).

Um dos maiores problemas para a implementação da abordagem preventiva da doença é que o custo para diagnóstico e tratamento é elevado e as evidências dos benefícios das intervenções são limitadas à categoria de recomendação intermediária (categoria B). Embora os autores que defendem a sua implementação argumentem que estas evidências já são suficientes, pois os estudos disponíveis mostraram, a partir de análise multivariável, a redução da freqüência e gravidade das seqüelas, mesmo sem redução da transmissão vertical com a instituição do tratamento materno (13,14,15). Além disso, já foram implantados outros programas de rastreamentos perinatais que apresentam incidência semelhante à toxoplasmose congênita (Tabela 1). A diferença se observa no tempo mais prolongado para o aparecimento das seqüelas da toxoplasmose congênita, que ocorrem em torno de 10 a 15% das crianças afetadas ao nascimento. Entretanto, aproximadamente 50% das crianças afetadas perdem a acuidade visual em torno dos 18 anos de idade (14).

Tabela 1 - Programas de rastreamentos perinatais

Doença	Incidência	Seqüelas	Possibilidades de tratamento	Resultados do tratamento
Fenilcetonúria neonatal	1/6.000 a 1/15.000	Grave retardo mental	Restrição da ingestão de fenilcetonúria	Prevenção de doença neurológica em crianças tratadas
Fibrose cística neonatal	1/2.000 a 1/4.000 (caucasianos)	Doença pulmonar crônica Insuficiência pancreática	Tratamento precoce das complicações pulmonares	Aumento da sobrevida*
Hipotireoidismo neonatal	1/4.000	Retardo mental	Tiroxina	Melhor crescimento e desenvolvimento intelectual

* Segundo Reis FJC *et al.* Fibrose Cística. J Pediatr. (Rio J.). 1998;74 (Supl.1):S76-S94.

O desempenho de testes diagnósticos em recém-nascidos logo após o nascimento não mostra, também, um desempenho suficiente. E com a instituição de tratamento empírico aos bebês, são expostos aos efeitos colaterais das medicações. A sensibilidade para IgM atinge 40% aproximadamente, ao nascimento (16). Portanto, ainda é necessário longo período de seguimento destes bebês para afastar ou determinar o diagnóstico definitivo a partir do desaparecimento de anticorpos IgG, considerado como padrão ouro. Este evento costuma ocorrer entre 8 a 12 meses de vida. Pretende-se avaliar, com este estudo, a detecção de DNA do *Toxoplasma* a partir do teste reação em cadeia da polimerase, que foi pouco estudado em amostras séricas e líquóricas dos recém-nascidos.

No Brasil ainda não foram oficialmente implantadas estratégias preventivas para redução da toxoplasmose congênita e, ainda não existe um programa de vigilância epidemiológica da doença para avaliarmos a magnitude do problema no país.

A partir do conhecimento da prevalência de toxoplasmose aguda em gestantes, da incidência de toxoplasmose congênita e avaliação do desempenho de testes diagnósticos em recém-nascidos, que sumariza os objetivos deste estudo é possível obter elementos que permitirão realizar estudos de custo-efetividade no nosso meio. Assim pretende-se auxiliar no estabelecimento das estratégias mais apropriadas a população de gestantes atendidas no Sistema Único de Saúde, no município de Porto Alegre.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

- Medir a incidência de Toxoplasmose Congênita e taxa de transmissão vertical em recém-nascidos na maternidade do Hospital Nossa Senhora da Conceição.

3.2. Objetivos Específicos

- Medir a prevalência de Toxoplasmose Aguda em gestantes utilizando testes enzimáticos.

- Identificar possíveis associações entre presença de Toxoplasmose Congênita e fatores maternos como variáveis preditoras: momento do diagnóstico materno e realização de tratamento durante a gestação.

- Avaliar o desempenho dos testes utilizados para diagnóstico de toxoplasmose congênita quanto à sensibilidade, especificidade e razões de verossimilhança.

4. Planejamento da pesquisa

4.1. Delineamento

Será realizado um estudo transversal para medir a prevalência de toxoplasmose aguda na gestação, seguido de estudo de coorte histórico para estimar a incidência de toxoplasmose congênita. Assim, a partir da identificação da população de gestantes com toxoplasmose aguda serão selecionados todos os seus recém-nascidos para seguimento durante um período de 12 meses, para realizar o diagnóstico definitivo com a medida de IgG sérica específica para toxoplasmose considerada como padrão-ouro. Será avaliado, então, o desempenho de testes diagnósticos utilizados como rastreamento, logo após o nascimento. Será estimada, também, a taxa de transmissão vertical de toxoplasmose em recém-nascidos.

4.2. Critérios de inclusão

- Recém-nascidos de mães que apresentaram teste sorológico para toxoplasmose com índices de IgM persistentemente reagentes durante a gestação ou soro reagente no momento do parto, na ausência de teste sorológico durante o pré-natal, no período de outubro de 1998 a dezembro de 2005.

- Recém-nascidos de mães que apresentaram teste sorológico para toxoplasmose com índices de IgM reagentes durante a gestação e baixa avidéz de IgG ou, ainda, alta avidéz de IgG, quando realizada após 16 semanas de idade gestacional.

- Recém-nascidos que apresentaram sinais clínicos ou laboratoriais compatíveis com toxoplasmose congênita, independente dos testes sorológicos iniciais.

4.3. Critérios de exclusão

- Recém-nascidos de mães HIV positivas.

- Recém-nascidos de mães com IgM soro reagente durante a gestação, mas com alta avidéz de IgG até 16 semanas de gestação.

4.4. Amostra

Os cálculos de amostra, para cada objetivo do estudo, foram realizados com base em estudo prévio realizado entre outubro de 1998 e fevereiro de 2001.

De um total de 16.174 nascimentos ocorridos neste período, foram identificados 114 RNs cujas mães apresentaram índices de IgM persistentemente reagentes durante a gestação ou reagentes no momento do parto, sugestivos de toxoplasmose aguda na gestação. A prevalência de gestantes com anticorpos IgM reagentes foi de 7,3 para cada 1000 gestantes (IC95%:5,9-8,6/1000). 15 RNs preencheram os critérios para diagnóstico de infecção congênita ao nascimento. A prevalência de toxoplasmose congênita identificada foi de 0,9/1000 (IC95%:0,54-1,49/1000). Destes, 54 RNs não retornaram para acompanhamento ambulatorial e assim, por enquanto, os demais 60 constituíram o grupo básico que compôs a coorte deste estudo prévio. Tabela 1.

Para avaliar o efeito do momento do diagnóstico materno quanto à idade gestacional na taxa de transmissão vertical foram utilizados dados da literatura: 29%

(IC 95%: 25%-33%), no estudo desenvolvido por Dunn *et al.* na França, entre 1987 e 1995.

4.4.1. Cálculo amostral para medir a prevalência de toxoplasmose aguda em gestantes

Considerando os dados do Arquivo Médico da instituição, foram registrados 35.966 partos de RNs vivos entre outubro de 1998 e dezembro de 2004. Todas as gestantes foram testadas quanto à sorologia para toxoplasmose. Com base no estudo prévio, que estimou uma prevalência de toxoplasmose aguda em gestantes de 7,3/1000, e considerando intervalo de confiança de 95% e diferença máxima aceitável de 0,1/1000 o tamanho de amostra calculado foi de 31.595 gestantes (PEPI version 4.0. PM Gahlinger & JH Abramson 1993-2001).

4.4.2. Cálculo amostral para medir a prevalência de toxoplasmose congênita

Considerando, ainda, os dados do Arquivo Médico da instituição, com registro de 35.860 nascimentos entre outubro de 1998 e dezembro de 2004 e com base no estudo prévio, que estimou uma prevalência de toxoplasmose congênita de 1/1000, e considerando intervalo de confiança de 95% e diferença máxima aceitável de 0,1/1000 o tamanho de amostra calculado foi de 18.457 recém-nascidos (PEPI version 4.0. PM Gahlinger & JH Abramson 1993-2001).

4.4.3. Cálculo amostral para medir a sensibilidade e especificidade dos testes utilizados para diagnóstico de toxoplasmose congênita

O padrão ouro utilizado é a medida de concentração de IgG entre 8 e 12

meses de idade. Espera-se que um bebê infectado tenha concentrações iguais ou mais elevadas nesta idade quando comparadas às concentrações de IgG ao nascimento. Conseqüentemente o bebê não infectado apresentaria IgG para toxoplasmose soro não reagente neste período, afastando definitivamente o diagnóstico de toxoplasmose congênita.

Os testes utilizados para estabelecer o diagnóstico de toxoplasmose congênita logo após o nascimento são dosagem de IgM para toxoplasmose (método MEIA) e RCP (reação em cadeia da polimerase) sérica.

Com base no estudo prévio, com uma amostra de 60 recém-nascidos, foram realizados os seguintes cálculos amostrais com estimativas individualizadas para cada teste.

- Dosagem de IgM para toxoplasmose congênita:

Esperando encontrar que 60% dos pacientes com toxoplasmose congênita tenham resultados positivos estima-se que 40 recém-nascidos com infecção serão necessários para estimar uma sensibilidade de 60% com margem de erro de 16% e um intervalo de confiança de 95% para testar o desempenho deste exame.

Para avaliar a especificidade será considerada margem de erro aceitável de 8%. Conforme cálculo abaixo, a amostra necessária é de 56 pacientes, considerando uma especificidade de 90%.

O erro padrão refere-se à precisão da estimativa da sensibilidade e especificidade. O erro padrão de uma proporção é estimado através da fórmula:

$$EP(p) = \sqrt{p \times q / n}$$

$$4 = \sqrt{90 \times 10 / n}$$

$$n = 56$$

- Detecção do DNA do *Toxoplasma gondii* em amostra sérica (RCP – reação em cadeia da polimerase):

Esperando encontrar que 30% dos pacientes com toxoplasmose congênita tenham resultados positivos estima-se que 43 recém-nascidos com infecção serão necessários para estimar uma sensibilidade de 30%, com margem de erro de 14% e um intervalo de confiança de 95% para testar o desempenho deste exame.

Para avaliar a especificidade será considerada margem de erro aceitável de 8%. Se considerarmos especificidade de 95%, a amostra necessária é de 30 pacientes com toxoplasmose congênita.

4.4.4. Cálculo amostral para medir a taxa de transmissão vertical de toxoplasmose

Considerando uma taxa de transmissão vertical de 30%, fixando-se $\alpha = 0,05$ e $\beta = 0,20$ estimou-se um tamanho amostral mínimo de 100 recém-nascidos. Aceitou-se erro padrão de 4,5% e margem de erro de 9%, para estimar o parâmetro de taxa de transmissão vertical (entre 21 e 39%). No presente estudo, se for considerada uma taxa de transmissão vertical de 30%, se obterá aproximadamente os seguintes resultados:

$$EP(p) = \sqrt{30 \times 70 / 100} = 4,5\%$$

$$\text{Intervalo de confiança de uma proporção} = p \pm 1,96 \times EP$$

$$\text{Margem de erro} = 2 \times EP = 9\%.$$

Os cálculos de tamanho da amostra podem ser observados na tabela 2.

Tabela 2. Cálculo do tamanho de amostra para medir prevalência de toxoplasmose congênita, de toxoplasmose aguda em gestantes, para avaliar desempenho de testes diagnósticos e medir taxa de transmissão vertical, considerando intervalo de confiança de 95%.

	Diferença máxima	Erro Padrão (%)	Resultado estudo prévio	Amostra calculada	Amostra fixa
Prevalência de TC	0,1/1000	-	1/1000	31423	34225
Prevalência de TA	0,1/1000	-	7,3/1000	33791	34225
Desempenho dos testes					
IgM					
Sensibilidade	-	8	60%	40	30
	-	4	90%	56	215
Especificidade					
RCP					
Sensibilidade	-	7	30%	43	30
	-	4	95%	30	215
Especificidade					
Taxa de transmissão vertical	-	4,5	30%	100	121

4.4.5. Cálculo amostral para avaliar associações:

- Efeito do tratamento materno na taxa de transmissão vertical de toxoplasmose

Como o número de participantes disponíveis para o estudo é limitado para estimar o tamanho do efeito, fixando-se $\alpha = 0,05$ e $\beta = 0,10$ e se o desvio padrão esperado na taxa de transmissão vertical ao comparar as médias de tempo de tratamento for de 5 pontos no grupo com toxoplasmose congênita e no grupo sem toxoplasmose congênita utilizou-se a tabela para cálculo do tamanho de amostra

(Hulley & Cummings, 2003), obtendo-se 28 pacientes em cada grupo para detectar um tamanho de efeito de 0.80.

Inicialmente a comparação estabelecida seria medir a taxa de transmissão vertical entre recém-nascidos de mães com tratamento para toxoplasmose na gestação e entre recém-nascidos de mães que não realizaram tratamento (variável dicotômica). Entretanto, para aumentar o poder do estudo devido à amostra fixa, foi estabelecido como objetivo a comparação entre médias de tratamento entre os dois grupos.

- Efeito da idade gestacional no momento da infecção materna na taxa de transmissão vertical de toxoplasmose

Considerando uma taxa de transmissão vertical de 72% na 36^a semana, fixando-se $\alpha = 0,05$ e $\beta = 0,20$ estimou-se um tamanho amostral mínimo de 100 recém-nascidos. Aceitou-se erro padrão de 4,5% e margem de erro de 9%, para estimar o parâmetro de taxa de transmissão vertical no final da gestação.

4.5. Medidas

Será utilizado um banco de dados no programa ACCESS do ambulatório de referência em toxoplasmose congênita, contendo as seguintes variáveis:

Dados maternos:

- Identificação: nome, registro.
- Procedência: foi considerada como região metropolitana de Porto Alegre a composição de 31 municípios, incluindo Porto Alegre, distantes no máximo a 79Km da capital – Alvorada, Cachoeirinha, Campo Bom, Canoas, Estância Velha, Esteio, Gravataí, Guaíba, Novo Hamburgo, Porto Alegre, São Leopoldo, Sapiranga,

Sapucaia do Sul, Viamão, Eldorado do Sul, Glorinha, Nova Hartz, Dois Irmãos, Ivoti, Parobé, Portão, Triunfo, Charqueadas, Nova Santa Rita, Araricá, Montenegro, Taquara, São Jerônimo, Santo Antônio da Patrulha, Arroio dos Ratos e Capela de Santana.

- Dados maternos gerais: idade, escolaridade, data do parto, local do pré-natal.

- Dados sorológicos: resultados dos exames sorológicos para toxoplasmose (IgG/IgM), quando (idade gestacional em semanas) e onde coletou. Resultado do teste anti-HIV.

- Tratamento materno realizado:

Esquema 1: espiramicina

Esquema 2: sulfadiazina + pirimetamina + ácido folínico

- Tempo de tratamento: em meses.

Dados do RN:

- Identificação: nome, registro.

- Data de nascimento

- Peso de nascimento: medido como variável contínua em gramas

- Classificação quanto ao peso e idade gestacional: AIG, PIG, GIG

- Idade gestacional: avaliada pelo método de Capurro, em semanas.

- Sexo

Exames para avaliação do RN:

- Hemograma com plaquetas

- Exame completo do líquido céfalo-raquidiano

- Ecografia transfontanelar

- Avaliação oftalmológica
- Sorologia para toxoplasmose (IgG e IgM) - Método MEIA
- Reação em cadeia da polimerase para toxoplasmose no sangue – Método *Nested*.

4.6. Logística

4.6.1. População em estudo:

Recém-nascidos atendidos na maternidade do Hospital Nossa Senhora da Conceição, cujas mães apresentaram teste sorológico para toxoplasmose com índices de IgM persistentemente reagentes durante a gestação ou no momento do parto, na ausência de teste sorológico durante o pré-natal.

Período do estudo: a partir de outubro de 1998 até dezembro de 2005, para inclusão no estudo com acompanhamento até 8 a 12 meses de idade, ou em menor tempo, se houver concentração de IgG soro não reagente.

4.6.2. Instrumento para coleta de dados:

Será utilizado banco de dados em ACCESS do ambulatório de referência em toxoplasmose congênita e dados de prontuários das gestantes após atendimento no Centro Obstétrico do hospital.

A maioria das informações coletadas está contida em questões fechadas, com codificação das respostas.

4.6.3. Coleta de dados:

- O banco de dados foi desenvolvido pela pesquisadora desde outubro de 1998. Algumas informações que não estavam disponíveis, por falta de retorno dos pacientes, foram resgatadas em prontuário hospitalar e/ou computador da unidade. Será realizado contato telefônico ou por carta registrada com aquelas mães de pacientes que não retornaram às consultas de acompanhamento.
- Inicialmente serão identificadas todas as gestantes com suspeita de toxoplasmose durante a gestação, atendidas na maternidade do HNSC a partir de outubro de 1998 até dezembro de 2005, utilizando como documento fonte a planilha de doenças de notificação compulsória. Esta planilha é, habitualmente preenchida pelos médicos pediatras da Unidade Neonatal da maternidade do HNSC.
- Será realizada revisão de todos os prontuários das gestantes e recém-nascidos identificados e serão selecionados aqueles recém-nascidos cujas mães preencheram os critérios para inclusão no estudo.
- Os dados de exames laboratoriais e radiológicos do RN, coletados logo após o nascimento, serão preenchidos conforme resultados armazenados em sistema informatizado do hospital.
- Conforme protocolo da instituição, após início do tratamento empírico, quando necessário, estas crianças são acompanhadas no ambulatório, através de testes sorológicos seriados para afastar ou estabelecer diagnóstico definitivo, o que ocorre, geralmente, do 8º ao 12º mês de vida (Anexo 2).

4.6.4. Treinamento:

- Será apresentado o projeto de pesquisa e o formulário do banco de dados à médica residente em Pediatria, com área de concentração em neonatologia. E cada item do formulário com sua interpretação e codificação será amplamente discutido. As dúvidas serão esclarecidas pela pesquisadora.
- Estudo prévio: Já foi elaborado no período de outubro de 1998 a fevereiro de 2001. A análise preliminar permitiu calcular o tamanho amostral para associações.
- A equipe de trabalho é formada pela médica residente, 1 bioquímica da área de imunologia para apoio nas questões que surgirem relacionadas aos testes sorológicos, 1 assistente social e 1 médica da área de ginecologia e obstetrícia. Será realizada reunião mensal com a equipe para discussão da coleta de dados, em andamento.

4.6.5. Controle de qualidade:

Pesquisas com enfoque diagnóstico são válidas quando promovem a comparação dos testes em estudo com um teste considerado padrão ouro. Neste caso, o desempenho da RCP em amostra sérica será comparado à dosagem de IgG por método enzimático realizado entre 8 e 12 meses de idade. Esta última dosagem, isto é a presença de anticorpos IgG, é considerada definitiva no diagnóstico de toxoplasmose congênita. Por outro lado a ausência de anticorpos IgG nesta faixa etária afasta o diagnóstico em questão. Outro cuidado para preservar a validade do estudo é que apenas o pesquisador principal terá acesso aos resultados dos exames de RCP sérica permitindo uma comparação cega entre os testes. Além disso, as

requisições para solicitação deste exame seguem um padrão onde não se registram resultados de outros testes que poderiam influenciar na decisão do examinador quanto ao resultado da RCP, teste que será avaliado.

4.6.6. Análise e processamento dos dados:

Os dados serão analisados utilizando o programa SPSS.

Inicialmente será estimada a prevalência de toxoplasmose aguda na gestação e de toxoplasmose congênita através do cálculo de uma proporção simples e seu intervalo de confiança de 95% baseado na distribuição binomial.

A validação dos testes diagnósticos (IgM e RCP séricos) será feita contra a sorologia IgG para toxoplasmose pelo método MEIA, considerada o padrão-ouro. O padrão ouro é um teste automatizado, o que favorece sua reprodutibilidade, é um teste independente, exige um tempo adequado de seguimento e é realizado pela equipe do setor de imunologia, que desconhece as demais condições clínicas e laboratoriais do recém-nascido (cegamento) (17).

O desempenho dos testes contra o padrão-ouro poderá ser avaliado a partir de das propriedades: sensibilidade, especificidade, razões de verossimilhança (positiva e negativa) com seus respectivos intervalos de confiança de 95% (17).

$$\text{Sensibilidade} = [A/(A+C)]$$

$$\text{Especificidade} = [D/(B+D)]$$

$$\text{Razão de Verossimilhança Positiva} = \text{Sensibilidade} / (1 - \text{Especificidade})$$

$$\text{Razão de Verossimilhança Negativa} = (1 - \text{Sensibilidade}) / \text{Especificidade}$$

As propriedades de um teste diagnóstico ou rastreamento são descritas usando sensibilidade, especificidade, e valores preditivos. Razões de verossimilhança (Likelihood ratios) são estatísticas alternativas para sumarizar acurácia diagnóstica e que podem ser muito úteis na prática clínica. Cada teste tem sua própria razão de verossimilhança que sumariza o quanto é mais (ou menos) provável para o paciente ter a doença com um determinado resultado do teste em relação aos pacientes sem a doença. É a razão da probabilidade de um resultado de teste específico entre indivíduos que tem a doença em relação a probabilidade deste resultado entre os que não tem a doença. Likelihood ratio maior do que 1 indica que o resultado é associado com presença de doença enquanto que likelihood ratio menor do que 1 indica que o resultado do teste é associado com ausência de doença. Likelihood ratios são razões de probabilidades e podem ser tratados da mesma forma como risco relativo para o cálculo de intervalos de confiança.

4.6.7. Período do estudo:

Serão incluídos pacientes atendidos na maternidade do HNSC entre outubro de 1998 a dezembro de 2005.

5. Questões Éticas

Será assinado termo de compromisso pelos pesquisadores para utilização de dados coletados em prontuários, referentes a pacientes atendidas no Hospital Nossa Senhora Conceição. As informações serão utilizadas única e exclusivamente com finalidade científica preservando-se o anonimato das pacientes (Anexo 3).

Será aplicado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para as mães de recém-nascidos que não compareceram às consultas de acompanhamento, e que retornarão após contato telefônico ou por carta.

6. Cronograma Básico

- Preparação: Março a Junho/2004
- Seleção e treinamento: Junho/2004
- Coleta de dados: Julho/2004 a Agosto/2005
- Processamento de dados: Março a Agosto/2005
- Análise: Setembro a Novembro/2005
- Redação: Dezembro/2005 a Julho/2006
- Apresentação: Outubro/2006

7. Recursos necessários

- Computador, impressora, disquetes e material de escritório serão fornecidos pelo pesquisador, bem como despesas com cartas e contatos telefônicos.
- Testes diagnósticos para toxoplasmose congênita são realizados de rotina na Unidade Neonatal do HNSC, quando indicados conforme protocolo.

8. Referências bibliográficas do projeto

1. Remington JS, McLeod R, Thulliez P, Desmonts G. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein JO, editors. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. 6th ed. Philadelphia: WB Saunders; 2005. p.947-1091.
2. Minkoff H, Remington JS, Holman S, Ramirez R, Goodwin S, Landesman S. Vertical transmission of toxoplasma by human immunodeficiency virus-infected women. *Am J Obstet Gynecol* 1997;176:555-9.
3. Matsui D. Prevention, diagnosis, and treatment of fetal toxoplasmosis. *Clin Perinatol* 1994;21:675-89.
4. Wilson CB, Remington JS, Stagno S, Reynolds DW. Development of adverse sequelae in children born with subclinical congenital toxoplasma infection. *Pediatrics* 1980;66:767-74.
5. Lebech M, Andersen O, Christensen NC, Hertel J, Nielsen HE, Peitersen B, et al. Feasibility of neonatal screening for toxoplasma infection in the absence of prenatal treatment. *Lancet* 1999;353:1834-7.
6. Varella IS, Wagner MB, Darela AC, Nunes LM, Müller RW. Prevalência de soropositividade para toxoplasmose em gestantes. *J Pediatr* 2003;79(1):69-74.
7. Spalding SM; Amendoeira MRR.; Ribeiro LC.; Silveira C.; Garcia AP.; Camillo-Coura L. Estudo prospectivo de gestantes e seus bebês com risco de transmissão de toxoplasmose congênita em município do Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003;36(4):483-491.
8. Foulon W, Villena I, Stray-Pedersen B, Decoster A, Lappalainen M, Pinon JM, et al. Treatment of toxoplasmosis during pregnancy: a multicenter study of impact on fetal transmission and children's sequelae at age 1 year. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180:410-5.
9. Sáfyadi MAP, Farhat CK. Toxoplasmose. In: Farhat CK, Carvalho ES, Carvalho LHFR, Succi RCM. *Infectologia pediátrica*. 2^a ed. São Paulo: Atheneu; 1999. p. 612-9.
10. Foulon W, Naessens A, Ho-Yen D. Prevention of congenital toxoplasmosis. *J Perinat Med* 2000;28:337-45.
11. Jones JL, Lopez A, Wilson M, Schulkin J, Gibbs R. Congenital toxoplasmosis: a review. *Obstet Gynecol Surv* 2001;56:296-305.
12. Wilson M, Remington JS, Clavet C, Varney G, Press C, Ware D. Evaluation of six commercial kits for detection of human immunoglobulin M antibodies to toxoplasma gondii: the FDA Toxoplasmosis ad hoc Working Group. *J Clin Microbiol* 1997;35:3112-5.

13. Peyron F, Wallon M, Liou C, Garner P. Treatments for toxoplasmosis in pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2000;(2):CD001684.
14. Foulon W, Naessens A, Ho-Yen D. Prevention of congenital toxoplasmosis. *J Perinat Med* 2000;28:337-45.
15. Wallon M, Liou C, Garner P, Peyron F. Congenital toxoplasmosis: systematic review of evidence of efficacy of treatment in pregnancy. *BMJ* 1999;318:1511-4.
16. Naessens A, Jenum P, Pollak A, Decoster A, Lappalainen A, Villena I, Lebech M, Stray-Pedersen B, Hayde M, Pinon JM, Petersen E, Foulon W. Diagnosis of congenital toxoplasmosis in the neonatal period: a multicenter evaluation. *J Pediatr* 1999;135:714.
17. Sackett DL, Straus SE, Richardson WS, Rosenberg W, Haynes RB. Diagnóstico e rastreamento. In: *Medicina Baseada em Evidências – Prática e ensino.* 2ª ed. Porto Alegre: Artmed;2003.p.83–108.
18. Deeks JJ, Altman DG. Diagnostic tests 4:likelihood ratios. *BMJ* 2004;329:168-9.

ANEXO B - APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA PELO COMITÊ DE ÉTICA



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO GRUPO HOSPITALAR CONCEIÇÃO CEP - GHC

RESOLUÇÃO

Porto Alegre, 15 de junho de 2001.


O Comitê de Ética em Pesquisa-CEP-GHC, em reunião ordinária em 13/06/2001 analisou o projeto de pesquisa:

Nº 11/2001

Título: Incidência de toxoplasmose congênita: diagnóstico através de IgG e IgM por micropartícle enzyme immunoassay e polymerase chain reaction sérica

Pesquisador: Ivana Santos Varela

Este trabalho, bem como o Termo de Consentimento Pós Informado, no aspecto ético e metodológico, por estarem de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas envolvendo Seres Humanos (Resolução 196/96) obtiveram o parecer APROVADO. O autor deverá encaminhar relatórios semestrais sobre o andamento do projeto. Projetos de áreas temáticas especiais não podem ser iniciados sem a aprovação da CONEP.


Dr. Mario Roberto Silveira
Coordenador
Comitê de Ética do GHC

