

## **Diagnóstico laboratorial de casos clínicos suspeitos de infeção por *Toxoplasma gondii*, 2009-2020**

### *Laboratory diagnosis of suspected clinical cases of *Toxoplasma gondii* infection, 2009-2020*

Tânia Reis, Anabela Vilares, Susana Martins, Idalina Ferreira, Maria João Gargate

*m.joao.gargate@insa.min-saude.pt*

Laboratório Nacional de Referência de Infeções Parasitárias e Fúngicas. Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

#### **\_Resumo**

O estudo foi realizado com o objetivo de descrever as características demográficas de pacientes com quadro clínico suspeito de toxoplasmose. O diagnóstico laboratorial destes casos foi confirmado no Laboratório Nacional de Referência em Infeções Parasitárias e Fúngicas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, entre janeiro de 2009 e dezembro de 2020. *Toxoplasma gondii* é um protozoário intracelular obrigatório e o agente etiológico da toxoplasmose, que pode infetar a grande maioria dos vertebrados, incluindo humanos. A transmissão da infeção toxoplasmática ocorre pela ingestão de qualquer uma das formas de resistência (sejam os cistos contidos na carne de animais infetados ou os oocistos expelidos nas fezes de felinos que, no solo e após a esporulação, tornam-se infecciosos e contaminam os alimentos e a água), bem como a transmissão placentária, por meio da passagem dos taquizoítos da mãe para o feto. Para o diagnóstico laboratorial da infeção adquirida, foram utilizados métodos sorológicos (Aglutinação Direta (AD), Ensaio Fluorescente Enzimático (ELFA), Ensaio de Aglutinação Imunoabsorvente com Imunoglobulina (ISAGA), e Immunoblot (IB) e métodos moleculares (PCR em tempo real) amplificação da região repetida do REP-529pb. Para o diagnóstico laboratorial da infeção congênita (pré e pós-natal), foram realizadas as mesmas metodologias descritas anteriormente, bem como a inoculação em camundongos utilizando diferentes produtos biológicos, nomeadamente sangue materno e recém-nascido, líquido amniótico e placenta. Durante o período de estudo de 12 anos, foram analisadas amostras biológicas de 6.658 casos suspeitos de toxoplasmose, dos quais 1.663 casos positivos foram confirmados (25%). Destes, 1.638 (98,5%) correspondem a pacientes com infeção toxoplasmática adquirida e 25 (1,5%) a pacientes com infeção toxoplasmática congênita. Os resultados indicam que a identificação dos casos de toxoplasmose no estudo corrobora os resultados referenciados em estudos anteriores e demonstra a importância do diagnóstico laboratorial e da vigilância sistemática desta infeção. Essa vigilância é particularmente importante em gestantes e em indivíduos imunocomprometidos, por se tratar de grupos populacionais onde essa parasitose é responsável por elevados índices de morbidade e letalidade.

#### **\_Abstract**

*The study was carried out with the objective to describe the demographic characteristics of patients with a suspected clinical picture of toxoplasmosis. The laboratory diagnosis of these cases was confirmed at the National Reference Laboratory for Parasitic and Fungal Infections of the National Institute of Health Doctor Ricardo Jorge, between January 2009 and December 2020. *Toxoplasma gondii* is an obligate intracellu-*

*lar protozoan and the etiologic agent of toxoplasmosis, which can infect the vast majority of vertebrates, including humans. The transmission of toxoplasmic infection occurs by ingesting any of the forms of resistance (whether the cysts contained in the meat of infected animals or the oocysts expelled in the feces of felines that, in the soil and after sporulation, become infectious and contaminate food and water), as well as placental transmission, through the passage of the mother's tachyzoites to the fetus. For the laboratory diagnosis of acquired infection, serological methods were used (Direct Agglutination (AD), Enzyme-Linked Fluorescent Assay (ELFA), Immunoglobulin Immunosorbent Agglutination Assay (ISAGA), and Immunoblot (IB) and molecular methods (real-time PCR) amplification of the REP-529bp repeated region. For the laboratory diagnosis of congenital infection (pre and postnatal), the same methodologies described previously were carried out, as well as the inoculation in mice using different biological products, namely maternal and new-born blood, amniotic fluid and placenta. During the 12-year study period, biological samples from 6658 suspected cases of toxoplasmosis were analysed, of which 1663 positive cases were confirmed (25%). Of these, 1638 (98.5%) correspond to patients with acquired toxoplasmic infection and 25 (1.5%) to patients with congenital toxoplasmic infection. The results indicate that the identification of toxoplasmosis cases in the study corroborates the results referenced in previous studies and demonstrates the importance of the laboratorial diagnosis and the systematic surveillance of this infection. This surveillance is particularly important in pregnant women and in immunocompromised individuals, as they are population groups where this parasitosis is responsible for high rates of morbidity and lethality.*

#### **\_Introdução**

O *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) é um protozoário intracelular obrigatório, pertencente ao filo Apicomplexa, e um dos parasitas com maior distribuição geográfica à escala mundial, dada a sua capacidade de infetar a grande maioria dos vertebrados, incluindo a espécie humana (1,2). Estima-se que um terço da população mundial tenha já sido infetada com *T. gondii* pelo que a prevenção, o diagnóstico e o tratamento desta parasitose é de grande importân-



cia clínica e veterinária (2,3). O protozoário *T. gondii* apresenta um ciclo de vida de reprodução assexuada, que ocorre em diversos tecidos dos hospedeiros intermediários-mamíferos (Homem incluído) e aves, e de reprodução sexuada na mucosa intestinal dos gatos que são os hospedeiros definitivos deste protozoário (4).

A infecção nos humanos pode ser adquirida, por ingestão de carne malcozinhada contaminada com quistos de *T. gondii*, por ingestão de oócitos a partir de alimentos, solo ou águas contaminadas com fezes de gato, através de transfusões de sangue ou transplante de órgãos contaminados; por transmissão transplacentária e por inoculação acidental de taquizoítos (1).

Esta parasitose é quase sempre assintomática no caso dos pacientes imunocompetentes (4). Ainda assim, em algumas situações a infecção pode apresentar sintomas ligeiros tais como febre, fraqueza muscular e linfadenopatias (5). Nos indivíduos imunocomprometidos pode ocorrer a reativação de uma infecção latente por *Toxoplasma gondii*. Indivíduos com infecção por VIH e transplantados são exemplos em que a toxoplasmose é a causa mais comum de lesões cerebrais e uma das infecções oportunistas mais frequentes nos indivíduos imunocomprometidos podendo causar a morte. A coriorretinite surge também frequentemente nestes pacientes por reativação ocular (6).

A infecção por *T. gondii* pode ser transmitida congenitamente se a grávida adquirir a infecção durante a gestação, pois o parasita atravessa a placenta e pode infetar o feto. O risco de transmissão ao feto aumenta à medida que a gravidez progride, sendo que a gravidade da doença diminui (7,8). As principais manifestações clínicas da toxoplasmose congénita incluem: aborto espontâneo, prematuridade, recém-nascidos com hidrocefalia ou microcefalia, calcificações cerebrais, atraso mental e coriorretinites (9). Na maioria dos recém-nascidos a infecção é assintomática, mas muitos podem desenvolver sintomatologia neurológica ou ocular durante a infância ou adolescência.

Em Portugal, os últimos dados epidemiológicos relativos à seroprevalência da infecção por *T. gondii* datavam de 1979 e

apresentavam uma seroprevalência de 47% (10). Dado o défice de conhecimento da situação epidemiológica da toxoplasmose em Portugal reconhecido pela Direção-Geral da Saúde, na norma n.º 37/2011, de 30/09/11, foi efetuado um estudo sobre a evolução da prevalência dos anticorpos anti-*T. gondii* na população portuguesa desde 1979 até 2013, tendo se observado em 2013 uma prevalência de 22% na população em geral e de 18% nas mulheres em idade fértil.

Esta constatação indicia que cerca de 80% das mulheres em idade fértil são suscetíveis à infecção primária, correndo o risco de contrair toxoplasmose e consequentes sequelas. A inexistência de vacina para prevenir a toxoplasmose humana implica que a prevenção primária constitua a ferramenta fundamental para evitar a infecção neste grupo suscetível (11).

Na Europa, de acordo com o *Relatório Epidemiológico Anual de 2017* publicado em 2019 pelo *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) respeitante à toxoplasmose congénita foram confirmados 194 casos na União Europeia, sendo França responsável por 79% do total de casos devido ao programa ativo de vigilância implementado na gravidez. O número de casos notificados é de 5.3 por cada 100 000 nascimentos (12).

## **\_Objetivo**

Foi efetuada uma análise retrospectiva dos casos clínicos suspeitos de infecção por *T. gondii* recebidos no Laboratório Nacional de Referência de Infecções Parasitárias e Fúngicas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) entre janeiro de 2009 e dezembro de 2020, correlacionando os respetivos dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos, tendo sido avaliada a frequência de casos positivos.

## **\_Material e métodos**

Entre 2009 e 2020, o INSA realizou o diagnóstico laboratorial de 6658 amostras referentes casos clínicos suspeitos de infecção por *T. gondii*.



Para o diagnóstico laboratorial da infeção adquirida foram utilizados métodos serológicos (Aglutinação Direta (AD), *Enzyme-Linked Fluorescent Assay* (ELFA), *Immunoglobulin Immunosorbent Agglutination Assay* (ISAGA), e *Immunoblot* (IB) e métodos moleculares (PCR em tempo real) para amplificação da região repetida REP-529bp (13). Para o diagnóstico laboratorial da infeção congénita (pré e pós-natal) foram efetuadas as mesmas metodologias descritas anteriormente e, ainda, a inoculação em ratinhos utilizando diferentes produtos biológicos, nomeadamente sangue materno e do recém-nascido, líquido amniótico e placenta. Para a análise descritiva dos dados demográficos dos casos confirmados recorreu-se ao cálculo de frequências absolutas e relativas.

## \_Resultados

Durante o período de 12 anos em estudo foram analisadas amostras biológicas de 6.658 casos suspeitos de toxoplasmose, dos quais se confirmaram 1663 casos positivos (25%).

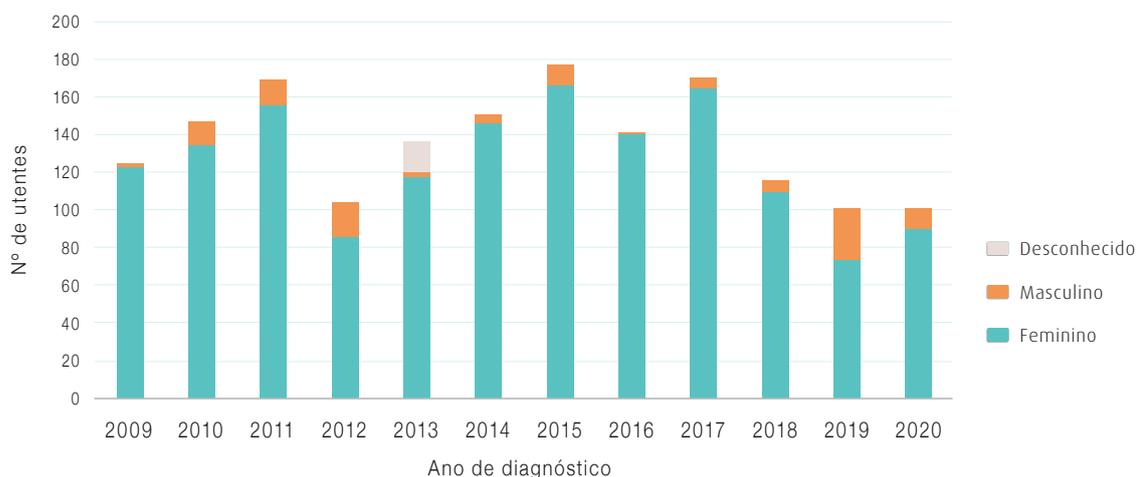
Destes, 1.638 (98,5%) correspondem a pacientes com infeção toxoplásmica adquirida e 25 (1,5%) a pacientes com infeção toxoplásmica congénita (gráfico 1).

Nos doentes com infeção adquirida verificou-se que 91,9% (1505/1638) pertenciam ao sexo feminino, 7,1% (117/1638) ao masculino e em 1,0% (16/1638) dos casos o sexo não foi conhecido (gráfico 2).

Gráfico 1: ▾ Distribuição anual dos casos de infeção toxoplásmica adquirida e congénita, 2009-2020.



Gráfico 2: ▾ Distribuição anual dos casos de infeção toxoplásmica adquirida por sexo, 2009-2020.





No que se refere à toxoplasmose congénita, a frequência de casos foi de 1,5%, (25/1663), sendo 14 crianças pertencentes ao sexo masculino ([gráfico 3](#)).

Em relação à distribuição dos casos de infeção toxoplásmica por grupo etário, observou-se que 71,6% (1190/1663) pertencia à faixa etária dos 25-44 anos de idade seguido do grupo etário dos 15-24 anos com 16,4% (273/1663) ([gráfico 4](#)).

Em relação à distribuição dos casos de infeção toxoplásmica adquirida por grupo etário, observou-se que a maioria 75,3% (1141/1505) das mulheres pertencia à faixa etária dos 25-44 anos de idade seguido do grupo etário dos 15-24 anos com 16,8% (253/1505). A maioria dos homens com infeção toxoplásmica adquirida são pertencentes ao grupo etário entre os 25 e os 64 anos ([gráfico 5](#)).

Gráfico 3: Distribuição anual dos casos de infeção toxoplásmica congénita por sexo, 2009-2020.

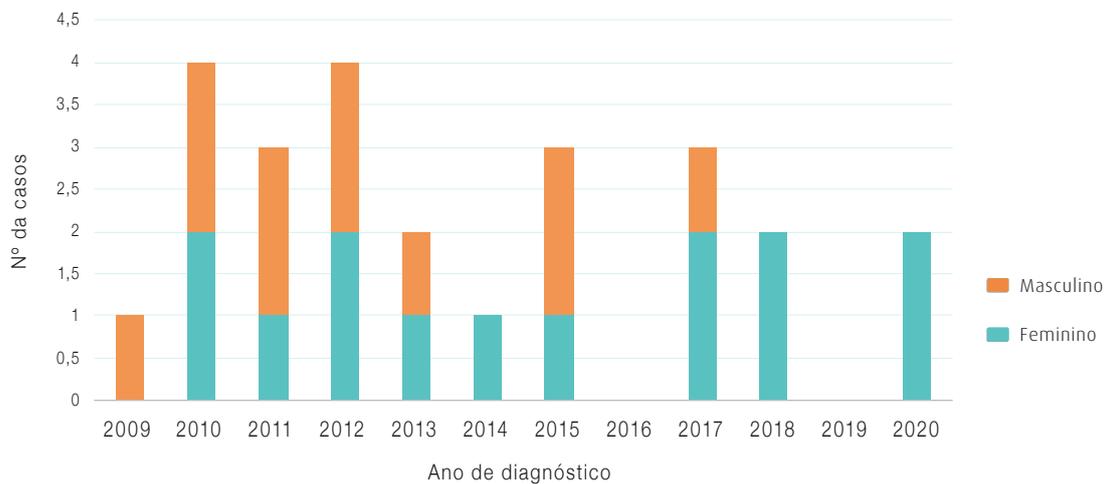


Gráfico 4: Distribuição anual da infeção toxoplásmica total por grupo etário, 2009-2020.

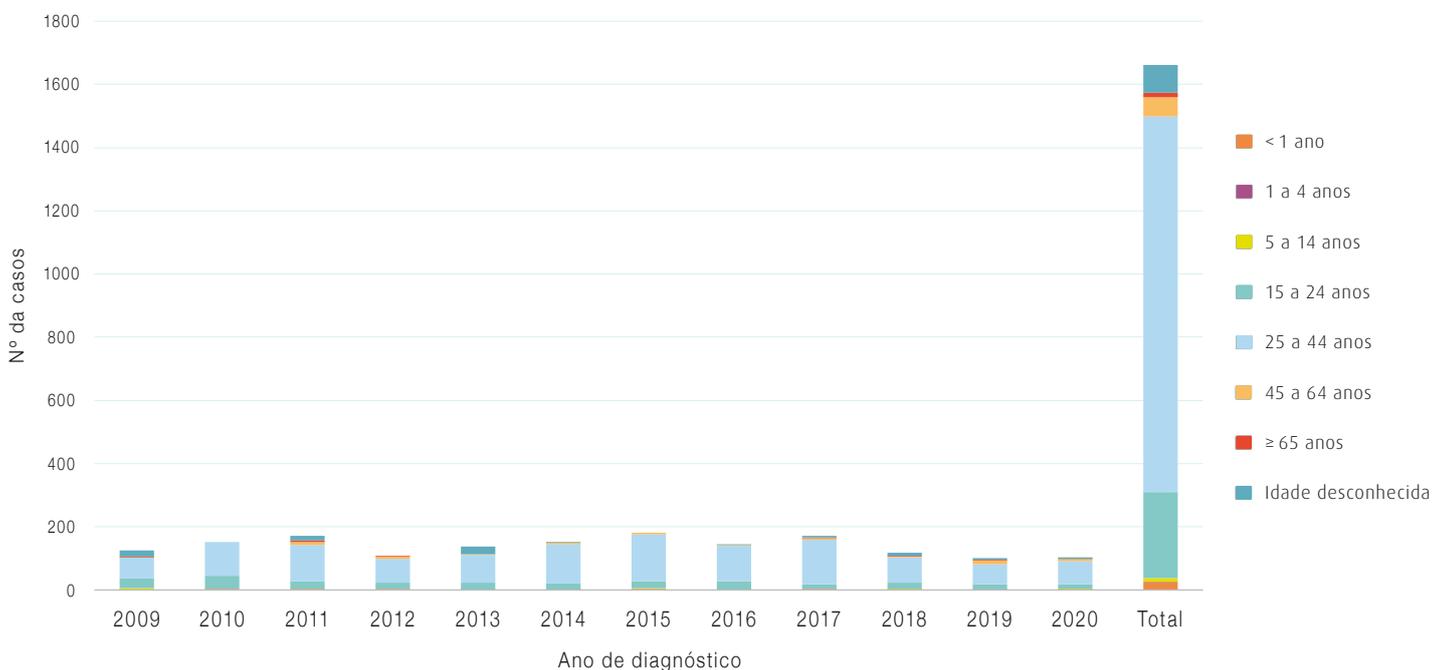
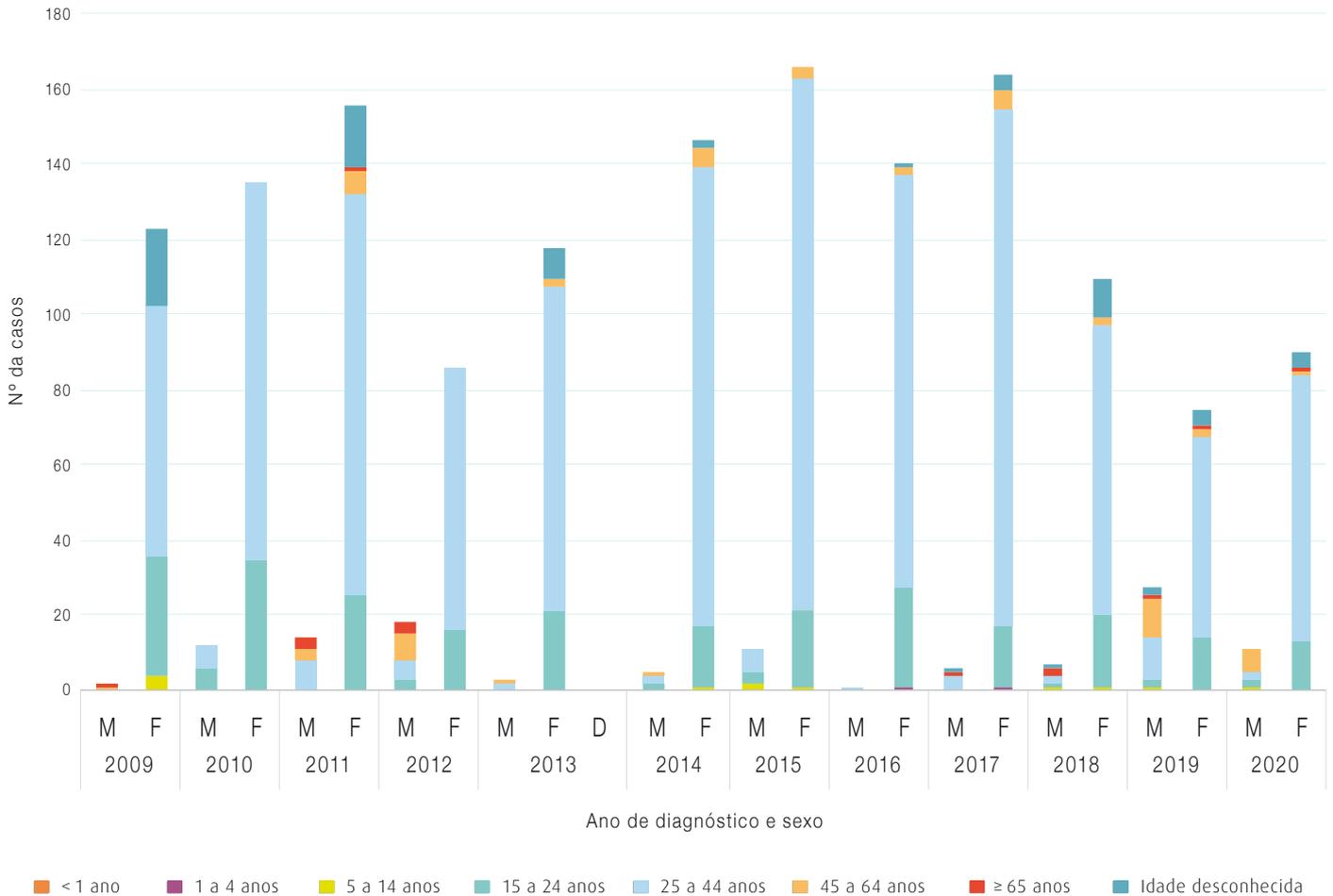




Gráfico 5: Distribuição anual da infeção toxoplásmica adquirida sexo e grupo etário, 2009-2020.



Dos 25 casos de toxoplasmose congénita diagnosticados durante os 12 anos em análise verificou-se que 24 eram crian-

ças com idade inferior a um ano e um correspondia a uma criança entre 1-4 anos (tabela 1).

Tabela 1: Número de casos por ano de diagnóstico.

Grupo etário	Ano de diagnóstico												Total
	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	
<1 ano	1	4	3	4	2	0	3	0	3	2	0	2	24
1 a 4 anos	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
5 a 14 anos	4	0	0	0	0	1	3	0	0	2	1	1	12
15 a 24 anos	32	41	25	19	21	18	23	26	18	19	16	15	273
25 a 44 anos	66	106	115	75	88	124	147	112	140	80	64	73	1190
45 a 64 anos	1	0	9	7	3	6	4	2	6	2	12	7	59
>65 anos	1	0	4	3	0	0	0	0	1	3	6	1	15
Idade desconhecida	21	0	16	0	24	2	0	1	5	10	6	4	89
Total	126	151	172	108	138	152	180	141	173	118	101	103	1663



## **\_Discussão e conclusão**

À semelhança de outros países europeus, este estudo demonstra que a grande maioria de casos de toxoplasmose adquirida ocorreu no sexo feminino e na faixa etária dos 25 aos 44 anos, o que seria expetável, pois Portugal é um dos países da União Europeia onde é preconizado o rastreio laboratorial da toxoplasmose em todas as mulheres grávidas ou que pretendem engravidar (14).

Observou-se ao longo dos 12 anos em estudo que as infeções adquiridas são numericamente muito superiores às congénitas, 1,5% (25/1663), tendo ocorrido maioritariamente em mulheres grávidas que podem dar origem a casos de toxoplasmose congénita, devido à transmissão mãe/filho. Este facto reforça a enorme importância da vigilância laboratorial quer no período pré-concepcional, quer durante o decorrer da gravidez.

Para se considerar que estamos na presença de um caso de toxoplasmose congénita o feto, recém nascido ou criança com idade inferior a um ano deve obedecer a pelo menos um dos quatro critérios: a) Confirmação da presença de *Toxoplasma gondii* em tecidos ou fluidos corporais (recém-nascido); b) Detecção de ácido nucleico de *Toxoplasma gondii* numa amostra biológica (fluidos corporais do recém-nascido); c) Resposta de anticorpos específicos para *Toxoplasma gondii* (Ig M, IgG e IgA) num recém-nascido; d) Títulos sempre estáveis de IgG de *Toxoplasma gondii* em crianças com menos de 12 meses (15). Os 25 casos detetados de toxoplasmose congénita foram positivos quer por técnicas serológicas, por técnicas moleculares e ainda por inoculação nos ratinhos, obedecendo assim aos critérios anteriormente descritos. O número de novos casos de infeção congénita obtidos é similar aos observados nos restantes países da Europa, com uma média de 0-4 casos por ano, com exceção da França, Polónia e Alemanha que registam números mais elevadas, entre 7 e 153 casos reportados em 2017 (12).

De acordo com os dados obtidos no mais recente estudo realizado em Portugal, a taxa de 18% de seroprevalência obtida nas mulheres em idade fértil indicou que cerca de 80% das mulheres portuguesas entre os 15 e os 45 anos não estão imunes à infeção por *Toxoplasma gondii*, ficando

estas assim suscetíveis à infeção primária durante a gravidez e ao elevado risco de toxoplasmose congénita (11).

O decréscimo que se tem observado na seroprevalência de anticorpos de *Toxoplasma gondii* na população portuguesa também se verifica em outros países desenvolvidos. A ingestão de carne crua ou mal cozinhada é o principal fator de risco na Europa para esta infeção. É possível que este decréscimo possa estar associado com vários fatores tais como: o hábito de congelar a carne, as alterações de hábitos alimentares em Portugal e na Europa nos últimos anos com o fácil acesso a refeições processadas e pré-cozinhadas assim como fatores inerentes a maior informação em saúde pública quer dos profissionais de saúde, quer da população em geral possam também ser um fator crucial na diminuição do risco de infeção por esta parasitose (16).

Em conclusão, este estudo vem demonstrar a importância da vigilância ativa e do diagnóstico sistemático desta parasitose, em particular do diagnóstico pré-natal na mulher grávida e pós-natal no recém-nascido, assim com nos indivíduos imunocomprometidos onde esta parasitose pode causar complicações clínicas graves e elevadas taxas de morbilidade. A não existência de vacina para prevenir a toxoplasmose, reforça a importância das medidas de prevenção primária continua como ferramenta crucial para evitar a infeção em particular nos grupos suscetíveis.

### **Agradecimento:**

À Doutora Cristina Furtado pela revisão científica do artigo.

### **Referências bibliográficas:**

- (1) Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int J Parasitol. 2000 Nov;30(12-13):1217-58. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(00\)00124-7](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(00)00124-7). Erratum in: Int J Parasitol 2001 Feb;31(2):217-20. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(00\)00124-7](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(00)00124-7)
- (2) Innes EA. A brief history and overview of *Toxoplasma gondii*. Zoonoses Public Health. 2010 Feb;57(1):1-7. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2009.01276.x>
- (3) Weiss LM, Dubey JP. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. Int J Parasitol. 2009 Jul 1;39(8):895-901. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.02.004>
- (4) Holliman RE. Toxoplasmosis. In: Cook GC, Zumla AI (eds). Manson's tropical diseases. 21st ed. Philadelphia: WB. Saunders, 2003:1365-71.
- (5) Ho-Yen DO. Toxoplasmosis. Medicine. 2009 Dec 1;37(12):665-67. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2009.09.006>
- (6) Luft BJ, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. Clin Infect Dis. 1992 Aug;15(2):211-22. <https://doi.org/10.1093/clinids/15.2.211>



- (7) Dunn D, Wallon M, Peyron F, et al. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *Lancet*. 1999 May 29;353(9167):1829-33. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)08220-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)08220-8)
- (8) Cook AJ, Gilbert RE, Buffolano W, et al. Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. *BMJ*. 2000 Jul 15;321(7254):142-7. <https://doi.org/10.1136/bmj.321.7254.142>
- (9) Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect*. 2002 Oct;8(10):634-40. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2002.00485.x>
- (10) Ângelo MH. Inquérito Serológico Nacional, Portugal continental, 1979/80: prevalência dos anticorpos anti-toxoplasmose. *Arq Ins Nac Saúde*. 1983;8:105-11.
- (11) Gargaté MJ, Ferreira I, Vilares A, et al. *Toxoplasma gondii* seroprevalence in the Portuguese population: comparison of three cross-sectional studies spanning three decades. *BMJ Open*. 2016 Oct 5;6(10):e011648. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2016-011648>
- (12) European Centre for Disease Prevention and Control. Congenital toxoplasmosis. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2017. Stockholm: ECDC, 2019. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/toxoplasmosis-annual-epidemiological-report-2017.pdf>
- (13) Kasper DC, Sadeghi K, Prusa AR, et al. Quantitative real-time polymerase chain reaction for the accurate detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009 Jan;63(1):10-5. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.09.009>
- (14) Direção-Geral da Saúde. Norma nº 037/2011, de 30/09/2011 (atualiz. a 20/12/2013). Exames laboratoriais na Gravidez de Baixo Risco. <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0372011-de-30092011-jpg.aspx>
- (15) Despacho n.º 5681-A/2014, 21 de abril. DR 2º série (1ºsupl.), n.º 82 (29/4/20149:11374-(2-20). Notificação obrigatória de doenças transmissíveis e outros riscos em saúde pública. <https://dre.pt/application/file/25697650>
- (16) Nowakowska D, Stray-Pedersen B, Spiewak E, et al. Prevalence and estimated incidence of *Toxoplasma* infection among pregnant women in Poland: a decreasing trend in the younger population. *Clin Microbiol Infect*. 2006 Sep;12(9):913-7. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01513.x>