

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DESPORTOS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**

WALDEMAR NAVES DO AMARAL

“DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE FETAL MEDIANTE A IDENTIFICAÇÃO
DE ANTICORPOS ESPECIFICOS NO LÍQUIDO AMNIÓTICO”

Orientador: Prof. Dr. ROBERTO R. DAHER

Co-orientadora: Prof. Dra. MARIZA MARTINS AVELINO

Co-orientadora: Prof.Dra. ANA MARIA DE CASTRO

Tese de Doutorado

Goiânia - GO, 2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**

WALDEMAR NAVES DO AMARAL

“DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE FETAL MEDIANTE A IDENTIFICAÇÃO
DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS NO LÍQUIDO AMNIÓTICO”

Orientador: Prof. Dr. ROBERTO R. DAHER

Co-orientadora: Prof. Dra. MARIZA MARTINS AVELINO

Co-orientadora: Prof. Dra. ANA MARIA DE CASTRO

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, para obtenção do título de Doutor em Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Goiânia - GO, 2006

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese à minha família de origem, em especial meu Pai herói **Waldemar Lopes do Amaral Brito** (Já falecido), minha mãe **Nilza Naves do Amaral**, além de meus irmãos **Elias Naves Amaral e Fernando Naves Amaral**.

Ainda de maneira relevante esta dedicatória para minha esposa **Mara Sandra Coelho Bezerra do Amaral** e meus filhos **Waldemar Filho e Alexandre**.

Também a consideração para com dona **Cleide Coelho Bezerra** pelos cuidados especiais com minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao **Prof. Dr. Roberto Daher** meu orientador do mestrado e doutorado, pela grande experiência de vida, sensatez e noção do dever cumprido.

À minha amiga **Prof. Dra. Mariza Avelino** pela vibração que tem pela ciência, especialmente na transmissão vertical além da grande consideração mútua.

À Prof. **Ana Maria de Castro** pelo desprendimento no trabalho junto ao laboratório experimental, de extrema relevância. A nossa consideração por sua paixão pela imunologia e pelo *Toxoplasma gondii*.

À clinica **Fértil Diagnósticos**, Goiânia-GO, nas pessoas dos meus amigos **Dr. Luis Augusto A. Batista e Dr. Walter Pereira Borges** pelo entendimento de que a nossa instituição encontra-se acima de nós mesmos.

Aos professores **Maurício Viggiano e Rui Gilberto Ferreira** pelo entusiasmo, pela amizade e pela colaboração na correção deste material.

Agradecimento ao **Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública**, Goiânia-GO, onde foi possível desenvolver a parte teórica e prática deste doutorado.

Com relação a análise estatística agradeço à **Andréia Pereira Dias de Freitas** e ao **Prof. Gercino Monteiro Filho**, pelo carinho e paciência durante esta tese.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| RESUMO | ix |
| ABSTRACT | xi |
| 1. Introdução | 13 |
| 2. Revisão Bibliográfica | 18 |
| 2.1 Histórico | 19 |
| 2.2 Etiologia | 20 |
| 2.3 Ciclo assexuado do <i>Toxoplasma gondii</i> | 21 |
| 2.4 Ciclo sexuado do <i>Toxoplasma gondii</i> | 22 |
| 2.5 Vias de infecção | 24 |
| 2.6 Toxoplasmose Congênita | 26 |
| 2.7 Prevalência da Toxoplasmose em mulheres grávidas | 28 |
| 2.8 Prevalência da Toxoplasmose congênita na gestação | 29 |
| 2.9 Rastreamento Sistemático em Mulheres Grávidas | 30 |
| 2.10 Placentite | 31 |
| 2.11 Manifestações Clínicas da Toxoplasmose Congênita | 32 |
| 2.12 Imunologia - <i>Toxoplasma gondii</i> | 33 |
| 2.13 Diagnóstico Laboratorial | 33 |
| 2.13 (A) Testes parasitológicos | 34 |
| 2.13 A ₁) Inoculação em animais de laboratório | 34 |
| 2.13 A ₂) Estudo Histopatológico do cérebro do camundongo | 35 |
| 2.13 A ₃) PCR para <i>Toxoplasma gondii</i> | 35 |
| 2.13 (B) Testes sorológicos | 36 |
| 2.13 B ₁) Imunofluorescência Indireta | 36 |
| 2.13 B ₂) Teste Imunoenzimático de Elisa (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) | 37 |
| 2.13 A ₃) Teste de Avidéz do IgG | 38 |
| 2.13 B ₄) ELISA de Captura (duplo sanduíche) | 38 |
| 2.13 (C) Testes indiretos | 40 |
| 2.13 C ₁) Exame Hematológico | 40 |

| | |
|---|-----------|
| 2.14 Medicamentos para a terapêutica materna para toxoplasmose | 40 |
| 2.14.1 Espiramicina | 40 |
| 2.15 Medicamentos Específicos para a terapêutica fetal da toxoplasmose..... | 41 |
| 2.15.1 Pirimetamina (Daraprin®) | 41 |
| 2.15.2 Sulfonamidas (Sulfadiazina®) | 42 |
| 2.15.3 Medicação auxiliar - ácido fólico (Leucovorin) | 43 |
| 2.16 Esquema de Tratamento Medicamentoso da Toxoplasmose Congênita . | 43 |
| 3. Objetivos | 45 |
| 3.1 Objetivo Geral | 46 |
| 3.2 Objetivos Específicos | 46 |
| 4. Materiais e Métodos | 47 |
| 4.1 População em estudo | 48 |
| 4.2 Fluxograma das pacientes | 51 |
| 4.3 Processamento do Material | 52 |
| 4.4 Acompanhamento dos camundongos | 53 |
| 4.5 Punção cardíaca do camundongo | 53 |
| 4.6 Imunofluorescência Indireta em Soro de camundongo | 54 |
| 4.7 Análise Histopatológica do Encéfalo dos camundongos | 55 |
| 4.8 Imunofluorescência Indireta em líquido amniótico e sangue fetal (IgM e IgG) | 55 |
| 4.9 Reação em cadeia de polimerase (PCR) no líquido amniótico e sangue fetal | 56 |
| 4.10 Avaliação do recém-nascido | 57 |
| 4.11 Análise estatística | 57 |
| 5. Resultados | 59 |
| 6. Discussão | 65 |
| 7. Conclusões | 73 |
| 7.1 Conclusões gerais | 74 |
| 7.2 Conclusões específicas | 74 |
| 9. Referências Bibliográficas..... | 76 |
| 8. Anexos | 85 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Taxa de Transmissão e Prevalência do Toxoplasma na gestação... | 27 |
| Tabela 2. Incidência de infecção por <i>T. gondii</i> em mulheres grávidas (1990-2000) | 29 |
| Tabela 3. Incidência pré-natal por <i>T. gondii</i> em neonatos (1990-2000) | 30 |
| Tabela 4. Orientação para o tratamento por <i>T. gondii</i> na gestante e no neonato preconizado pelo grupo “U.S. (Chicago) Nacional Collaborative treatment Trial”..... | 44 |
| Tabela 5. Distribuição dos casos de toxoplasmose e gravidez segundo a idade materna, Goiânia – 2006 | 60 |
| Tabela 6. Distribuição dos casos de toxoplasmose e gravidez segundo a paridade, Goiânia – 2006 | 60 |
| Tabela 7. Distribuição dos resultados para toxoplasmose em Líquido amniótico e sangue fetal, tendo como padrão-ouro a Inoculação em camundongo e histopatológico | 64 |

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Ciclo vital do <i>T. gondii</i> , com as varias fontes de infecção para o homem | 23 |
| Figura 2. Ciclo biológico do <i>T. gondii</i> . Formas de transmissão e disseminação do parasita | 24 |
| Gráfico 1. Líquido Amniótico : Dosagem de anticorpos para <i>Toxoplasma gondii</i> (classes IgM e IgG) comparável a inoculação em camundongo com estudo histopatológico, considerado como padrão-ouro, Goiânia – Go, Brasil (2006)..... | 61 |
| Gráfico 2. Líquido Amniótico : Dosagem de anticorpos para <i>Toxoplasma gondii</i> (classes IgM e IgG) comparável ao recém – nascido, considerado como padrão-ouro, Goiânia – Go, Brasil (2006)..... | 61 |
| Gráfico 3. Sangue fetal : Dosagem de anticorpos para <i>Toxoplasma gondii</i> (classes IgM e IgG) comparável à inoculação em camundongo com estudo histopatológico, considerado como padrão-ouro, Goiânia – Go, Brasil (2006). | 62 |
| Gráfico 4. Sangue fetal : Dosagem de anticorpos para <i>Toxoplasma gondii</i> (classes IgM e IgG) comparável ao recém – nascido, considerado como padrão-ouro, Goiânia – Go, Brasil (2006)..... | 62 |
| Gráfico 5. Camundongo pós-inoculação : Dosagem de anticorpos para <i>Toxoplasma gondii</i> (classes IgM e IgG) comparável a inoculação em camundongo com estudo histopatológico, considerado como padrão-ouro, Goiânia – Go, Brasil (2006)..... | 63 |
| Gráfico 6. Camundongo pós-inoculação : Dosagem de anticorpos para <i>Toxoplasma gondii</i> (classes IgM e IgG) comparável ao recém-nascido, considerado como padrão-ouro, Goiânia – Go, Brasil (2006)..... | 63 |

Resumo:

Objetivo: Avaliação comparativa dos métodos invasivos (amniocentese e cordocentese) para o diagnóstico fetal de toxoplasmose, através da obtenção ao mesmo tempo (para cada grávida) de líquido amniótico e sangue fetal, o que melhora a precisão da comparação. Como inovação promove-se a realização de sorologia no líquido amniótico, que sempre foi metodologia exclusiva do sangue, sendo que a amniocentese (coleta de líquido amniótico) é procedimento mais simples que a cordocentese (sangue fetal).

Pacientes e métodos: 65 grávidas positivas para toxoplasmose. Foi realizada investigação fetal através de amniocentese (coleta de líquido amniótico) e cordocentese (coleta de sangue fetal). No IPTSP, realizaram-se sorologias para toxoplasmose IgM e IgG/ PCR / inoculação em cobaio. O número final completo foi de 37 pacientes (pois 28 grávidas não apresentavam a avaliação completa dos resultados incluindo os testes no recém-nascido). Posteriormente, avaliou-se o resultado do material biológico do concepto comparando com a inoculação em camundongo (padrão-ouro), e em seguida com os dados do recém-nascido.

Resultados: Para o líquido amniótico (IgM⁺ e/ou IgG⁺), obteve-se sensibilidade de 78,57%, especificidade de 85,47%, valor preditivo positivo de 91,66%, valor preditivo negativo de 89,47% e falso positivo de 06,66%. Para a cordocentese (IgM⁺ e/ou IgG > 1/250) obteve-se sensibilidade de 80,00% , especificidade de 34,78%, valor preditivo positivo de 44,44%, valor preditivo negativo de 72,73% e falso positivo de 39,47%. Para o plasma do camundongo (IgM⁺ e/ou IgG > 1/20)

obteve-se sensibilidade de 78,57%, especificidade de 89,47%, valor preditivo positivo de 91,66% e valor preditivo negativo de 89,47%. **Conclusão:** A pesquisa de anticorpos no líquido amniótico (classes IgM e IgG) pode ser utilizado no rastreamento e diagnóstico da infecção fetal por toxoplasmose, pois mostra alta sensibilidade e especificidade, e com baixo resultado falso positivo. O sangue fetal (anticorpos da classe IgM+ e/ou IgG > 1/250) apresentou alta sensibilidade, baixa especificidade, e elevado resultado falso positivo. A identificação isolada do anticorpo da classe IgM no sangue fetal teve elevada especificidade, com baixo resultado falso positivo de 5%. Após ser inoculado material biológico fetal em comundongos, a sorologia dos mesmos apresentou alta sensibilidade e alta especificidade. A pesquisa de anticorpos para *Toxoplasma gondii* no líquido amniótico deve ser incorporada à propedêutica obstétrica na investigação da toxoplasmose fetal, por ser simples e apresentar altos índices de correlação com a infecção e/ou doença no concepto.

Abstract:

Objective: Comparative evaluation of the invasive methods (amniocentesis and cordocentesis) for the fetal diagnosis of toxoplasmosis, through the attainment at the same time (for each pregnant woman) of amniotic fluid and fetal blood, which improves the precision of the cited comparison. As innovation one promotes accomplishment of serology in the amniotic liquid, that always was exclusive methodology of the blood, since amniocentesis (collection of amniotic liquid) is simpler than cordocentesis (fetal blood). **Patients and methods:** 65 positive pregnant for toxoplasmosis. Fetal inquiry through amniocentesis (collection of amniotic liquid) and cordocentesis was carried through (collection of fetal blood). In the IPTSP, serology for toxoplasmosis IgM and IgG/PCR had been become fulfilled/inoculation in guinea pig. The complete final number was 37 patients (including the tests in the just-been born). Later, the result of the biological material of concepto was evaluated comparing with the inoculation in mouse (Gold-stand), and after that with the data of the just been born. **Results:** For the amniotic liquid (IgM+ and/or IgG+), one got sensitivity of 78,57%, specificity of 85,47%, positive predictive value of 91,66%, negative predictive value of 89,47% and false positive of 06,66%. For cordocentesis (IgM+ and/or IgG > 1/250) 80,00% sensitivity was gotten specificity of 34,78%, positive predictive value of 44,44%, negative predictive value of 72,73% and false positive of 39,47%. For the plasma of the mouse (IgM+ and/or IgG > 1/20) 78,57% sensitivity was gotten, specificity of 89,47%, positive predictive value of 91,66% and negative predictive value of

89,47%. **Conclusion:** The amniotic fluid (antibodies IgM and IgG) can be used in the tracking and diagnosis of the fetal infection for toxoplasmosis, therefore it shows high sense and specificity, and with low positive false result. Fetal blood (antibodies of the classroom IgM+ and/or IgG > 1/250) presented high sense, low specificity, and raised false positive result. The isolated identification of the antibody of the IgM class in the fetal blood raises the specificity, with low false positive result of 05,00%. After inoculating biological fetal in mice, their serology presented high sense and high specificity. The serology in the amniotic fluid must be incorporated to the obstetrical propaedeutics in the inquiry of fetal toxoplasmosis, because it is simple and presents indices of correlation with the infection and/or illness in conceptus.

1. Introdução

A toxoplasmose é uma zoonose amplamente difundida na natureza, causada pelo *Toxoplasma gondii*, um protozoário intracelular, que tem como hospedeiro definitivo o gato, e intermediário o homem. Apresenta também como reservatórios os pássaros e animais domésticos (Frenkel 1996). A transmissão da infecção ao homem, ocorre de forma acidental, através do contato direto com a forma infectante do parasita.

É variável a incidência da infecção na população dependendo da imunidade contra o agente agressor, conforme a região geográfica considerada (Zuber & Jaquier 1995). Depende de condições ambientais favoráveis à sobrevivência dos oocistos que são eliminados com as fezes dos gatos na natureza (Maisonneuve et al. 1984, Frenkel 1985, Couvreur & Desmonts 1988). Dessa forma, a sua ocorrência é maior em populações migrantes de regiões de baixa para elevada prevalência da doença; em grupos populacionais com ausência de anticorpos que habitam áreas de alta prevalência; e em povos com hábitos alimentares de ingestão de carne crua ou mal cozidas (Dubey 1986).

A transmissão da infecção aos humanos ocorre por via oral, transfusional, por transplante de órgãos (de doadores soropositivos para receptores soronegativos), acidental em laboratório e transplacentária ou congênita. A transmissão oral pode acontecer em função da ingestão de alimentos contaminados com cistos presentes nos tecidos dos animais infectados que são utilizados como fonte nutricional (carne crua) ou oocistos que são carregados por veículos de transmissão (invertebrados coprofágicos). Estes contaminam os alimentos que, ingeridos sem higienização adequada (verduras mal lavadas, ovos

crus e leite de vaca ou de cabra não pasteurizado), podem transmitir a infecção (Forestier et al. 1991, Fortier et al. 1991, Frenkel et al. 1995, Remington et al. 1995). O cozimento ou preparo adequado dos alimentos é suficiente para destruir as formas infectantes do parasita (Ferreira 1981).

A toxoplasmose é bastante disseminada no mundo, mas torna-se importante apenas nos indivíduos imunologicamente comprometidos (Ruskin & Remington 1976, Farhat et al. 1977, Minkoff et al. 1997). A transmissão transplacentária é significativa porque o feto é um organismo frágil do ponto de vista imune, tanto nos mecanismos de defesa inespecíficos quanto nos específicos (Naspitz 1985, Cecfcon et al. 1997). Ademais, a transmissão passiva de IgG da mãe para proteger o filho só atinge níveis eficazes após 20-22^a semanas de gestação, o que faz com que as repercussões fetais variem em gravidade e dependam da intensidade da deficiência imunológica fetal. Em consequência dessa incapacidade imunológica de defesa, apresenta-se com característica de infecção aguda, sub-aguda ou crônica, dependendo da fase da gestação em que a infecção ocorreu “in útero”.

As avaliações epidemiológicas em todo o mundo mostram que, na maioria das regiões, 50-90% da população apresentam anticorpos contra o *T. gondii* na sua corrente sanguínea, apontando prévia exposição ao agente infeccioso (Zuber & Jaquier 1995). Geralmente, a infecção ocorre de forma eventual mas raramente causa epidemias, através da contaminação oral (Bonametti et al. 1996, Burnet et al. 1998).

A seqüela adquirida por infecção via transplacentária, relaciona-se com a agressividade da cepa infectante, com o período de organogênese em que a infecção ocorreu na vida fetal, com o tempo de exposição do organismo fetal ao agente infectante, com a competência do seu sistema de defesa, e com a intensidade da sua resposta inflamatória contra o agente agressor. Essa seqüela fetal será tanto maior quanto mais intensa for a resposta inflamatória do organismo contra o agente invasor, presente no local ou conseqüente a uma reação auto-imune (Boyer et al. 1998).

A doença no feto depende da soroconversão da gestante, que é muito variável nas diferentes regiões do mundo, com maior freqüência de 0,6-1,5% (Norgaard-Pedersen 1992, Thoumsin et al. 1992, Wong et al. 1993). Desmonts & Couvreur (1974) encontraram 17% de transmissão quando a infecção ocorre no 1º trimestre, resultando em aborto, morte fetal ou toxoplasmose grave; no 2º trimestre, a possibilidade de transmissão foi de 25%, com a maioria dos casos assintomáticos, mas ainda com uma percentual de 30% de forma graves; e no 3º trimestre, a transmissão foi de 65%, com a forma clinica predominante de assintomáticos.

A ausência de sintomas ao nascer não significa que não terá seqüelas no decorrer do seu desenvolvimento. As cicatrizes são variáveis e progressivas podendo levar a invalidez por cegueira ou deficiência mental, caracterizando a forma congênita clássica. Essa pode se manifestar em qualquer fase da vida da criança, principalmente com aparecimento de lesões oculares ou desde o início do processo evolutivo com atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, convulsões

ou alterações do volume craniano (microcefalia ou hidrocefalia), como consequência de uma meningoencefalite assintomática (Patel et al. 1996, Reed 1996).

Como em Goiânia existe a maior incidência de toxoplasmose em grávidas descrito na literatura brasileira (Avelino et al. 2003) e o diagnóstico de infecção fetal é difícil, procuramos determinar nesta pesquisa qual o método mais adequado para ser utilizado em larga escala em nosso meio.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Histórico

Reino: protista; **Subreino:** Protozoa; **Filo:** Apicomplexa; **Classe:** Sporozoa (Sporozoa); **Subclasse:** Coccidia; **Ordem:** Eucoccidiida; **Família:** Sarcocystidae; **Gênero:** *Toxoplasma*; **Espécie:** *Toxoplasma gondii*.

Em 1908, SPLENDORE (Brasil), em coelhos, e Nicolle & Manceaux, no “gondii” (*Ctenodactylus gondi*), roedor norte-africano descreveram o gênero *Toxoplasma*. No ano seguinte, Nicolle & Manceaux (1909), denominaram o gênero *Toxoplasma*, e a espécie continuou *gondii*, surgindo o nome pelo qual é conhecido de *Toxoplasma gondii*.

O primeiro caso descrito de toxoplasmose em humanos foi do tipo congênito, pelo oftalmologista Janku, em 1923 na cidade de Praga. Durante a necrópsia de uma criança que foi a óbito em decorrência de uma doença disseminada e grave, observou que podia ser o *Toxoplasma*, o organismo que estava presente no globo ocular formando um cisto parasitário.

A introdução do teste do corante, em 1948, por Sabin & Feldman – Reação de Sabin & Feldman ou dye-test, permitiu maior facilidade diagnóstica além de possibilitar investigações epidemiológicas (Sabin & Feldman 1948).

Na década de 1960, através de Lilley, instalou-se a amniocentese diagnóstica onde a investigação de patologias fetais passou a ser possível neste material biológico, incluindo a transmissão vertical da toxoplasmose.

Em 1983, Daffos descreveu a coleta de sangue fetal puro através da cordocentese com a finalidade de pesquisa de infecção fetal por toxoplasmose na França.

2.2 Etiologia

O *Toxoplasma* tem como hospedeiro definitivo membros da família felidae, sendo o gato doméstico o de maior importância epidemiológica. Tem como hospedeiro intermediário animais homeotérmicos, incluindo o homem. Sendo um parasita obrigatoriamente intracelular, o *T. gondii* pode ser encontrado em vários tecidos, células (exceto hemácias) e líquidos orgânicos (saliva, leite, esperma, líquido peritoneal, etc.) (Frenkel 1973, Levine 1973). As principais formas presentes durante o seu ciclo evolutivo são: taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos (Pessoa 1978, Kamazoe 1995).

Taquizoítos (trofozoítos ou endozoítos) – é o estágio de rápida multiplicação do parasita com capacidade de invadir ativamente uma célula e se multiplicar em vacúolos citoplasmáticos, denominados vacúolos parasitófagos ou pseudocistos. A proliferação exacerbada conduz ao rompimento da célula hospedeira, liberando os novos taquizoítos que livres penetram em células contíguas; é a principal forma na fase aguda da doença (Dubey 1988b).

Bradizoítos (ou cistozoítos) – é a forma do parasita com multiplicação lenta, no interior das células hospedeiras, e que resulta na formação dos cistos

teciduais; é a principal forma encontrada na fase crônica da doença (Dubey 1988b).

Esporozoítos – é a forma do *T. gondii*, presente nos oocistos, os quais são produzidos no intestino de felinos (entre eles o gato), e eliminados em suas fezes. Os oocistos apresentam no seu interior dois esporocistos, cada qual com quatro esporozoítos, que passam a ser infectantes no ambiente. (Dubey 1988b).

2.3 Ciclo assexuado do *Toxoplasma gondii*

A fase proliferativa acontece após a penetração dos taquizoítos no organismo, quando se multiplicam rapidamente por endodiogenia, dentro dos denominados vacúolos parasitóforos, em diferentes tipos de células do hospedeiro. O citoplasma das células fica tão repleto de taquizoítos que há o rompimento da membrana plasmática, com liberação dos parasitas os quais ou vão penetrar em células contíguas ou vão ser fagocitados. Colônias ou pseudocistos contendo taquizoítos resultantes da endodiogenia podem persistir nas células do hospedeiro por períodos prolongados sem que ocorra a formação de cistos teciduais. Essa fase inicial da infecção caracteriza a fase aguda da doença, que no homem pode ser assintomática ou pode ser acompanhada por sintomas inespecíficos tais como febre, mal estar, mialgias, artralgia, dor na garganta (Remington 2001).

2.4 Ciclo sexuado do *Toxoplasma gondii*

Os esporozoítos, bradizoítos ou taquizoítos se multiplicam através dos ciclos esquizogônio e gametogônio no epitélio ileal terminal do intestino dos felídeos. Durante o ciclo gametogônio, na meiose que propicia a formação do macro e do microgametas, ocorre o crossing-over com permuta gênica entre os cromossomas homólogos, ocasionando a variabilidade genética e com isto o fortalecimento da espécie. O microgameta maduro emerge de uma célula epitelial ileal e fertiliza um macrogameta maduro em outra célula epitelial ileal formando o zigoto. A seguir o zigoto evolui dando origem a dois esporoblastos, cada um dos quais com sua própria parede e sofrendo cada um deles duas divisões celulares. Isto origina quatro esporozoítos, dentro de cada esporocisto, perfazendo oito esporozoítos no interior de um oocisto (Dubey 1988a e 1998b).

A fertilização, origina oocistos que são eliminados através das fezes dos felídeos e no ambiente sofrem esporulação tornando-se infectivos (Dubey et al. 1970, Frenkel et al. 1970). Dubey et al. (1970), demonstraram que os oocistos não esporulam abaixo de 4°C ou acima de 37°C. Simultaneamente ao ciclo enteroepitelial, nos felídeos, os *T. gondii* penetram na lâmina própria da parede intestinal como taquizoítos e se disseminam para os tecidos extra-intestinais, onde desenvolvem um ciclo de reprodução assexuado, semelhante aos dos hospedeiros intermediários (Frenkel 1970).

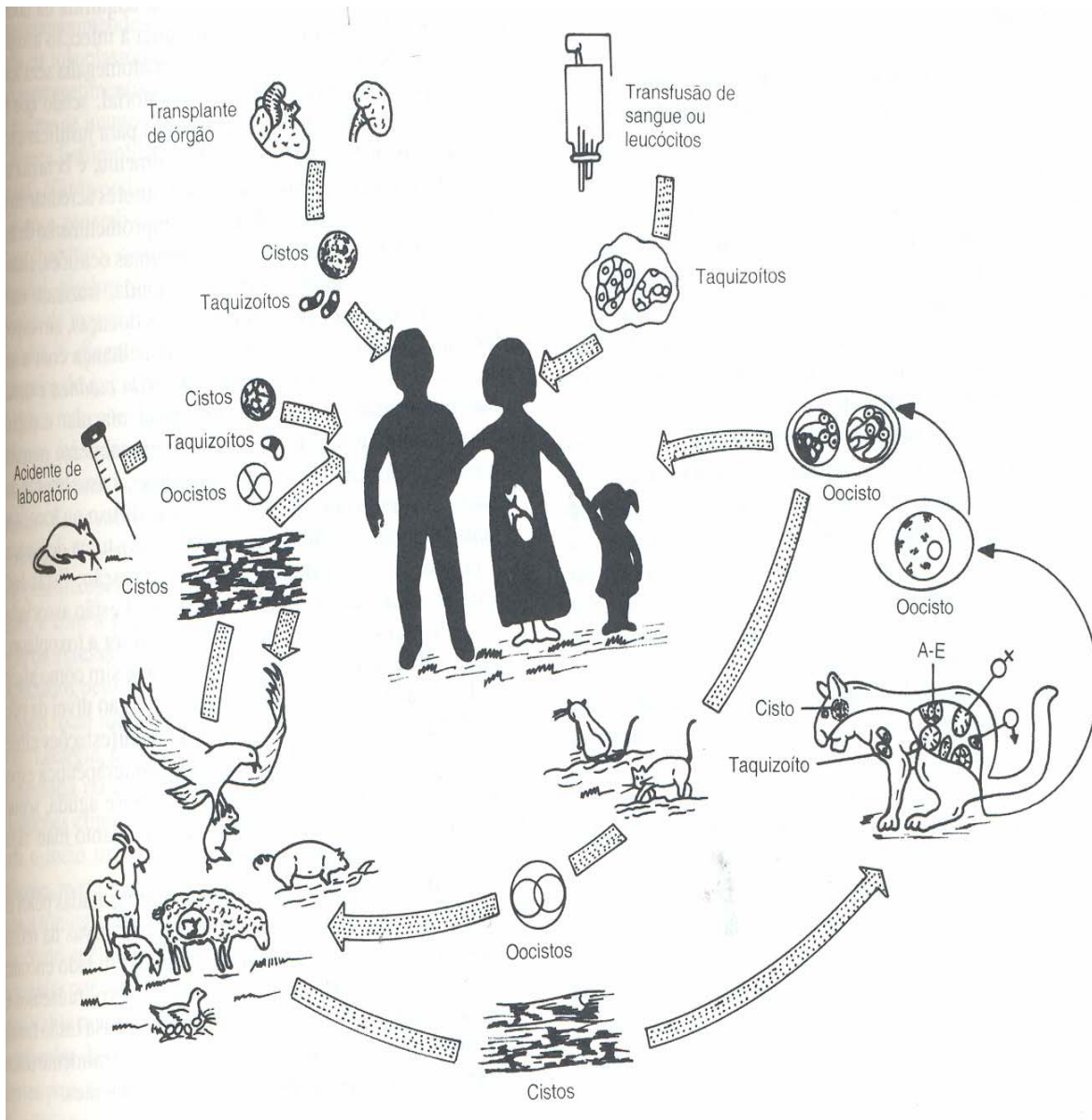


Figura 1. Ciclo vital do *T. gondii*, com as varias fontes de infecção para o homem A-E (Figura copiada de Cimerman, 1999)

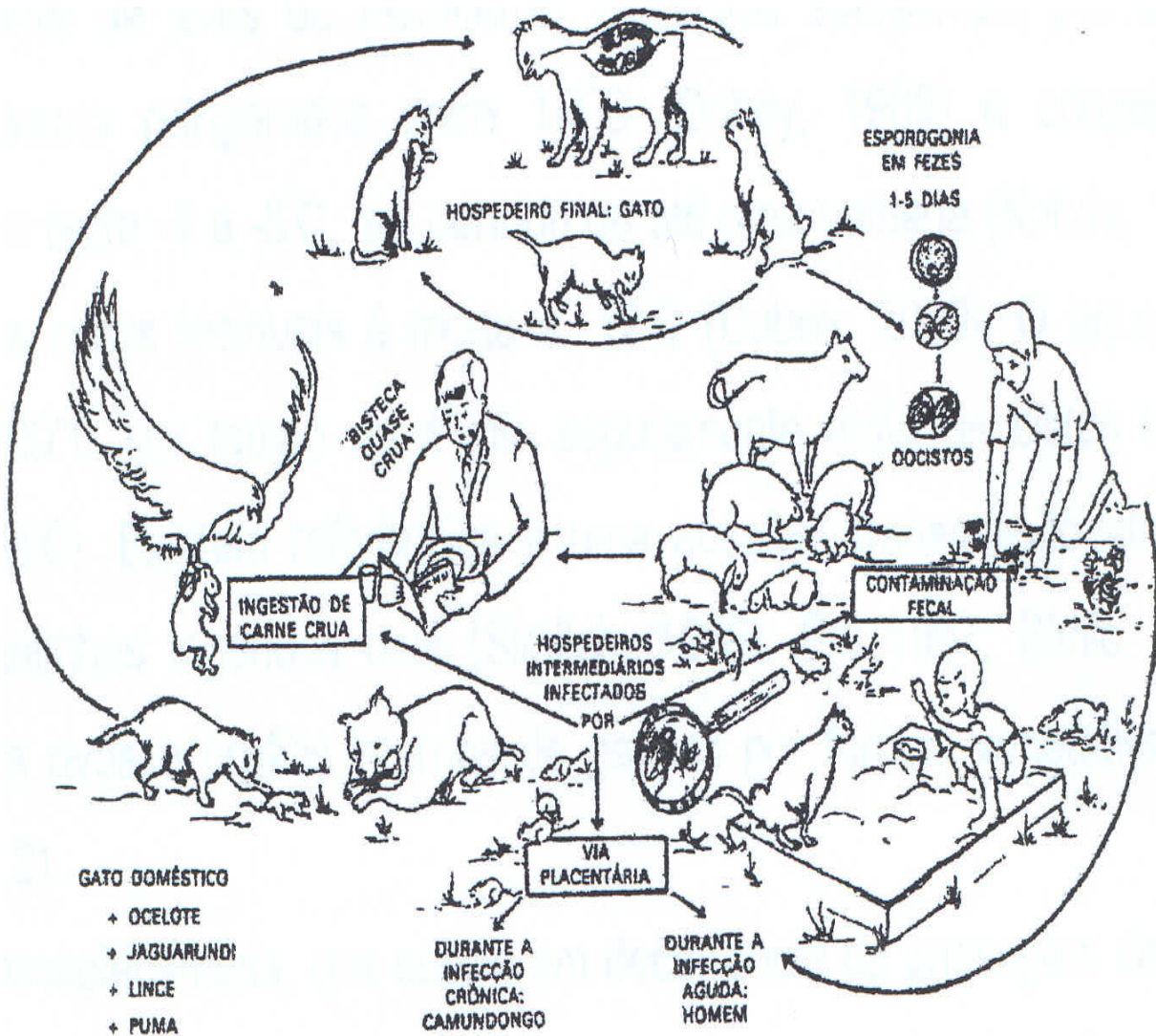


Figura-2 Ciclo biológico do *Toxoplasma gondii*. Formas de transmissão e disseminação do parasita. (reproduzido de Willians e Wilkins apud Frenkel 1996)

2.5 Vias de infecção

O homem adquire a infecção por quatro vias:

- Ingestão de oocistos, distribuídos no ambiente pela chuva, vento e água; alimentos colhidos no solo; areia em torno das casas, jardins, campo;

reservatório de água e a partir de quaisquer locais onde os gatos defecam (Bowie et al. 1997, Bahia Oliveira et al. 2001; Bahia Oliveira et al. 2002). Podem disseminar-se ainda através de hospedeiros transportadores de oocistos, tais como moscas, baratas e minhocas (Smith et al. 1978, Dubey 1988, Buxton 1990, Avelino 2003). Os oocistos esporulados têm grande importância epidemiológica, pois podem permanecer infectantes em solo úmido e sombreado por períodos de 12 a 18 meses (Boch 1984, Kamazoe 1995, Frenkel 2000) (Fig. 2).

- Ingestão de cistos teciduais: através de carne crua ou mal cozida, especialmente de aves ou mamíferos. Os cistos sobrevivem por semanas mesmo quando refrigerados entre 1-4°C (Dubey 1989) e congelados a temperatura entre -1 a -8°C, em períodos de até uma semana (Kotula 1991). A maioria dos cistos teciduais é morta a -12°C. O aquecimento acima de 60°C por tempo de 4 minutos mata os ciclos teciduais.
- Infecção transplacentária: ocorre em decorrência da passagem da infecção da mãe para o feto. Cerca de 40% dos fetos são infectados por essa via em mulheres que adquirem a infecção toxoplásmica durante a gravidez (Desmonts 1985) (Fig. 2).
- Líquidos orgânicos: ingestão de taquizoítos em leite ou saliva contaminada (Cathie 1954), pela inalação de taquizoítos por lambedura ou perdigotos (Levi et al. 1968), por deposição de taquizoítos na mucosa vaginal junto com esperma (Kamazoe 1995), em acidente de laboratório, etc. (Frenkel et al. 1960); sangue para transfusão (Neto et al. 1963) ou mesmo estocado, podem

ser fontes de contaminação, assim como o transplante de órgãos. Taquizoítos foram isoladas em leite de cabra como mostrou Chiari em 1984. Receptores soro negativos de transplantes que receberam um órgão (por ex., coração ou rim) de um doador soro positivo, podem desenvolver um quadro de toxoplasmose grave, que exigirá tratamento (Mayes et al. 1995, Remington et al. 2001, Mcleod et al. 1994).

2.6 Toxoplasmose Congênita

A infecção fetal e a severidade da toxoplasmose congênita são dependentes de vários fatores, entre eles: do tempo de infecção materna durante a gravidez, da competência imunológica materna na fase de circulação sanguínea do toxoplasma (parasitemia materna); do estabelecimento do fluxo sanguíneo placentário e da colonização da placenta pelo toxoplasma; do número e da virulência dos parasitas transmitidos ao feto; e ainda da idade do feto e de seu estágio de competência imunológica no momento da transmissão da doença (Desmots & Couvreur 1974, Remington et al. 2001).

Em mulheres imunocompetentes, o momento em que ocorreu a infecção materna por *T. gondii* deve ser bem estabelecido, pois a taxa de transmissão do parasita da mãe para o feto sobe, de virtualmente zero, quando a infecção por *T. gondii* é adquirida um pouco antes do início da gravidez, para aproximadamente 2% (ou um pouco menos) quando adquirida em torno do período da concepção. A taxa de transmissão permanece baixa durante várias semanas, até aproximadamente 10 semanas de gestação quando a incidência de infecção congênita torna-se crescente. Esta mudança de uma taxa de transmissão baixa para alta, acontece em torno da 11^a a 14^a semanas de gestação, (Hohlfeld et al. 1994).

Tabela 1: Taxa de Transmissão e Prevalência da Toxoplasmose na gestação

| Semana da gestação quando ocorre a infecção materna | Taxas de Transmissão (Incidência de infecção congênita)* | Prevalência* da Toxoplasmose Congênita (fraca ou severa) entre fetos ou crianças com infecção congênita | Risco para a mãe em ter um filho com infecção congênita severa |
|---|--|---|--|
| - período antes da concepção (6 meses?) | Virtualmente 0 | 80% | Baixo risco (baixa taxa de transmissão) |
| 10 semanas | 2% ↓ | Alta prevalência 80% | Alto risco |
| 24 semanas | 3% ↑ | 80% | |
| 30 semanas | Aumento para ↓ | ↓ 20% | Baixo risco (infecção congênita é frequente, mas não severa). |
| nascimento | 80% | Baixa prevalência ↓ 6% | |

* Taxa de Transmissão e Prevalência da Toxoplasmose na gestação e Prevalência da toxoplasmose congênita entre filhos de mulheres com Toxoplasmose aguda na gestação, em relação a Idade gestacional a época da infecção materna. Adaptado de Remington *et al*, 2001. As percentagens foram feitas sobre dados de mulheres que fizeram uso de espirometria após o diagnóstico de toxoplasmose na gestação.

A tabela 1 de Remington et al. (2001), resume os fatos relativos às taxas de transmissão e prevalência da toxoplasmose na gestação, mas os níveis de risco ilustram apenas a magnitude dos fatos, não representando números reais. Os dados usados foram obtidos de acompanhamento de gestantes que soroconverteram na gestação, mas quase todas foram tratadas especificamente com espiramicina. Se, no entanto fossem observadas apenas as gestações sem tratamento medicamentoso específico, o resultado sobre os fetos poderia ter sido bem mais danoso, para ambas, as taxas de transmissão e para a severidade da infecção (Remington et al., 2001).

2.7 Prevalência da Toxoplasmose em mulheres grávidas

Estimativas baseadas em estudos sorológicos de região de baixa prevalência da toxoplasmose, sugerem incidências de infecção materna primária na gestação, variando de 1 à 310 por 10.000 gestações em diferentes populações, em particular a da Áustria, Finlândia, Austrália, Dinamarca, Noruega, Colômbia e Emirados Árabes. Estas taxas são dependentes da prevalência da infecção na população em estudo e são ligeiramente mais altas (6 à 410 por 10.000 gestações) quando apenas são estudadas as mulheres susceptíveis, isto é, mulheres que não tiveram toxoplasmose antes da gestação (Tab. 2).

Tabela 2– Incidência de infecção por *T. gondii* em mulheres grávidas (1990-2000)

| Pais | Incidência por 1000 gestações | Incidência por 1000 mulheres susceptíveis | RN* Infectados por 1000 | Referência |
|-----------------|-------------------------------|---|-------------------------|--------------------------|
| Austria | 1.08 | - | < 0.10 | Aspök et al., 1992 |
| Finlândia | 1.40 | 2.4 | - | Lappalainen et al., 1992 |
| Austrália | 0.08 | 1.6 | 0.16 | Walpole et al., 1991 |
| Dinamarca | 0.44 | 0.61 | 0.30 | Lebech et al., 1990 |
| Noruega | 1.31 | 1.47 | 0.31 | Jenum et al., 1998 |
| Colômbia | 3.75 – 15 | 10 – 40 | - | Gómez-Marin et al. 1997 |
| Emirados Árabes | 31 | 41 | 12 | Dar et al., 1997 |

RN* Recém-natos. Tabela adaptada por Tender et al. 2000.

2.8 Prevalência da Toxoplasmose congênita na gestação

A incidência da infecção pré-natal por *T. gondii* nos neonatos, depende diretamente da soroprevalência da toxoplasmose nas grávidas de uma dada região. Por este motivo, observam-se grandes variações que podem ir de 1 a 120 por 10.000 nascimentos. Estas variações são dependentes dos fatores de risco presentes e da prevalência da infecção por *T. gondii* na população observada. Exemplificam estes fatos alguns dados de países como a Austrália, Áustria, Dinamarca, Noruega e Emirados Árabes cujas incidências estão relacionados na tabela 3, onde a prevalência da infecção na população é baixa.

Tabela 3 – Incidência pré-natal por *T. gondii* em neonatos (1990-2000)

| Pais | Incidência por 1000 neonatos | Prevalência de infecção nas mães (%) | Referência |
|-----------------|------------------------------|--------------------------------------|----------------------|
| Austria | < 0.10 | 37 | Aspök et al., 1992 |
| Austrália | 0.16 | 32 | Walpole et al., 1991 |
| Dinamarca | 0.30 | 28 | Lebech et al., 1990 |
| Noruega | 0.31 | 11 | Jenum et al., 1998 |
| Emirados Árabes | 12 | 23 | Dar et al., 1997 |

Tabela adaptada por Tender et al. 2000

2.9 Rastreamento Sistemático em Mulheres Grávidas

Programas de rastreamento sorológico sistemático em mulheres grávidas sob risco de se infectarem pelo *T. gondii*, têm sido empreendidos em alguns países com a finalidade de tentar prevenir a toxoplasmose congênita ou, se presente, permitir o início imediato de seu tratamento para diminuir as seqüelas da doença. Medidas preventivas primárias através da educação de mulheres soronegativas têm sido efetivas, como demonstrado pelas experiências da França que reduziu em cerca de três vezes as taxas de soroconversão esperada para as grávidas (Wilson & Remington 1980). As medidas preventivas primárias, através da educação, têm sido realizadas em vários centros europeus como em Bruxelas (Bélgica), que reduziu em 63% as taxas de soroconversão durante gravidez. (Foulon et al. 1994).

O rastreamento para infecção por *T. gondii* durante a gravidez é agora uma prática comum em vários países europeus, e em alguns estados do Brasil incluindo Goiás e Mato Grosso do Sul, e pode vir mostrar-se uma medida efetiva para diminuição das seqüelas da toxoplasmose congênita.

2.10 Placentite

Neghme (1952) realizou a primeira descrição de infecção por *T. gondii* em tecidos placentários. Na fisiopatologia da toxoplasmose congênita a placentopatia precede sempre a fetopatia, e a transmissão materno-fetal se faz pela via hematogênica. Pode ocorrer em qualquer época da gestação, porém quando ocorre no primeiro e segundo trimestre as lesões são mais graves (Garcia et al. 1983). As reações inflamatórias crônicas na decídua capsular e reações focais nas vilosidades, são as lesões mais freqüentemente encontradas. Ocorrem também ativações de células de Hofbauer, necrobiose de componentes celulares e fibrose proliferativa, trombose e mineralização dos vasos coriônicos. O infiltrado tecidual consiste principalmente em linfócitos, e a inflamação do cordão umbilical é rara. Quando ocorre hidropsia fetal, a placenta também é hidrópica. O *T. gondii* se encontra principalmente na forma de bradizoítos nos cistos teciduais. Estes cistos poderão estar presentes nos tecidos conjuntivos amnióticos, nas membranas coriônicas, na geléia de Wharton e na decídua (Benirschke et al. 1967). Nos casos de infecção ocorrida no último trimestre as lesões são mais discretas e a detecção do parasita torna-se mais difícil (Desmont & Couvreur 1974)

2.11 Manifestações Clínicas da Toxoplasmose Congênita

A fetopatia letal é a forma mais severa da infecção pelo *T. gondii* que acomete o feto, sobretudo no período compreendido entre a 10^a e 24^a semana de gestação. Neste particular a infecção é tão agressiva, que tem como consequência lesões graves e generalizadas que cursam com o abortamento ou com a morte intra-utero. A causa desta severidade pode estar associada a presença de uma cepa mais virulenta de *T. gondii*, a uma gestante imunossuprimida, a um feto com o sistema imune ainda bastante imaturo, ou a uma associação de todos estes fatores (Remington et al., 2001).

Por sua vez, no período pós-natal, o quadro clínico apresentado pode ser pleomórfico, com características que se confundem com outras doenças congênicas ou o neonato pode apresentar-se com a clássica tríade de Sabin da toxoplasmose congênita, tríade esta constituída pela presença de hidrocefalia, retinocoroidite e calcificação intracraniana (Eichenwald et al. 1960).

Com variações de sinais e sintomas clínicos, é preciso ressaltar que a maioria das crianças com infecção congênita por *T. gondii* tem sido referida como normal ao nascimento, com sinais ou sintomas se tornando manifestos semanas, meses, ou mesmo anos depois (Glasser & Delta 1965, Desmonts & Couvreur 1974, Alford et al. 1974).

2.12 Imunologia - *Toxoplasma gondii*

As respostas imunes de um hospedeiro ao *T. gondii* são complexas e envolvem precocemente ativação de mecanismos da imunidade inespecífica. Estudos em camundongos sugerem que o controle da infecção aguda causada pelo *Toxoplasma* e outros patógenos intracelulares não rivais, como *Listeria* sp, *Leishmania* sp. envolve inicialmente uma resposta inata seguida por uma resposta adquirida, antígeno-específica que é particularmente crítica para a resolução da infecção (Alexander & Hunte 1998, Johnson & Sayles 1997). Na toxoplasmose a formação desta forte e persistente imunidade específica induzida pelo parasita (Frenkel 1967) impede o desenvolvimento de quadros graves e letais (Reyes & Frenkel 1987). Sob ação desta imunidade os parasitas da fase aguda da toxoplasmose, principalmente na forma de taquizoítos, são destruídos enquanto outros na forma de bradizoítos formam os cistos teciduais, dentro das células hospedeiras e ficam protegidos da ação da resposta imune na fase crônica da doença (Sethi et al. 1986). Quando circunstancialmente se liberam destes locais, são prontamente eliminados pela imunidade do hospedeiro (Gazzineli et al. 1993). A elucidação dos mecanismos pelos quais os hospedeiros imunocompetentes resolvem uma infecção aguda causado pelo *T. gondii* e controlam a infecção crônica, é fundamental para o entendimento da patogenia da toxoplasmose.

2.13 Diagnóstico Laboratorial

O ideal, para o diagnóstico de laboratório da toxoplasmose, seria realizar a demonstração do *T. gondii* ou o seu isolamento. Na fase aguda da infecção, quando os taquizoítos podem ser encontrados nos líquidos orgânicos (exsudatos, líquor, leite, sangue, linfa e outros). O parasita pode ser identificado em exame microscópico após coloração pelo método de Giemsa. Os líquidos orgânicos também podem ser rastreados pela técnica do PCR (reação em cadeia da polimerase) que detecta segmentos característicos dos ácidos nucleicos do *Toxoplasma*, que são então amplificados (Paugam et al. 1995). Na fase crônica da toxoplasmose, pode-se tentar encontrar o parasita em tecidos, como a placenta de casos suspeitos de toxoplasmose na gestação. Neste material também se pode fazer a técnica do PCR, para rastreamento do DNA do parasita.

2.13 (A) Testes parasitológicos

2.13 A₁) Inoculação em animais de laboratório

Pode ser feito através da inoculação destes líquidos orgânicos ou macerados de tecidos suspeitos na cavidade peritoneal de camundongos. Os parasitas se multiplicam por uma semana e são detectados mais facilmente no líquido peritoneal dos animais que desenvolveram a doença. Esse teste é

considerado internacionalmente como padrão ouro de referência para o diagnóstico da infecção materna, fetal e neonatal. No entanto, o encontro do parasita por esse método depende da quantidade de organismos presentes no sangue do infectado e da concentração sérica das drogas antiparasitárias.

2.13 A₂) Estudo Histopatológico do cérebro do camundongo

É possível a identificação do parasita em tecido previamente infectado, sendo que no caso dos camundongos o exame do cérebro pode ser padronizado e avaliado com observação direta nas lâminas preparadas com o referido material.

Nos cortes onde é possível a visualização de formas do parasita, tais como, forma taquizoíta ou cística, são analisados os seguintes processos patológicos: edema (E), inflamação (I), hiperemia no parênquima (HIP), hiperemia na meninge (HIM), hemorragia no parênquima (HEP), hemorragia na meninge (HEM) e necrose coagulativa (NC). As alterações patológicas são classificadas de forma semiquantitativa, seguindo os seguintes critérios: ausente, discreta (com comprometimento de até 25% da área), moderada de 26% a 50% e acentuada acima de 50%.

2.13 A₃) PCR para *Toxoplasma gondii*

Este teste tem sido usado para determinar a presença do DNA do parasita

e um número pequeno de organismos presentes no liquor, líquido amniótico, humor aquoso, lavado broncoalveolar, sangue, inclusive sangue de cordão, podem ser identificados por esse método. Em casos suspeitos de infecção intra-uterina, pode ser feita coleta do líquido amniótico (amniocentese) ou sangue fetal (cordocentese), realizadas a partir da 18ª semanas da gestação utilizando-se a PCR para rastreamento de indícios do *T. gondii* nesses líquidos. O resultado pode ser liberado em um dia e, portanto, é muito mais rápido que o isolamento em animais de experimentação. Diversos "primers" estão disponíveis para a detecção do DNA do *Toxoplasma* (Hohlfeld et al. 1994). No entanto, é uma técnica de difícil padronização e que apresenta resultados diferentes nos diversos trabalhos publicados em literatura, no que diz respeito a sua sensibilidade. (Van de Ven et al. 1991).

2.13 (B) Testes sorológicos

Realiza a pesquisa de anticorpos direcionados para o agente agressor através de:

2.13 B₁) Imunofluorescência Indireta.

Utiliza-se a reação de Imunofluorescência Indireta-IFI, sendo o antígeno produzido em laboratório, utilizando a cepa RH, mantida em laboratório. A técnica

é realizada com os soros diluídos em PBS 0.01M pH 7.2, diluição seriada, a partir de 1:10. Usa-se conjugado fluorescente anticamundongo na diluição de 1:200 para os conjugados anti-IgM e anti-IgG de camundongo (conjugado anticadeia pesada com isotiocianato de fluoresceína - SIGMA).

2.13 B₂) Teste Imunoenzimático de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) (Walls et al. 1977).

Este teste veio substituir uma série de outros métodos de rotina nos laboratórios, tendo sido usado com sucesso *para* demonstração de anticorpos IgG, IgM, IgA e IgE antitoxoplasma tanto na fase aguda quanto na fase crônica da toxoplasmose (Wong et al. 1993, Pinon et al. 1996). Pode ser usado para diagnóstico sorológico na gestante, no feto e no recém-nato (Bessieres et al. 1992, Decoster et al. 1991, Stepick-Biek et al. 1990).

O método tem se mostrado superior a IFI para a pesquisa de anticorpos da classe IgM, especialmente quando se usa a técnica do tipo captura (ou duplo sanduíche), que tem maior sensibilidade e especificidade pois não sofre influência de anticorpos antinucleares e fator reumatóide presentes no sangue da mãe e que são transferidos ao filho. As técnicas ELISA, por sua alta sensibilidade, são capazes de detectar anticorpos da classe IgM por muitos meses após a fase aguda e em algumas mulheres podem persistir por anos, tirando-lhes o valor de marcador da toxoplasmose recente, passando a ser apenas um indicador de fase aguda.

2.13 B₃) Teste de Avidéz do IgG

O teste de avidéz auxilia no diagnóstico de Infecção recente, tornando-o de grande importância no diagnóstico de toxoplasmose na gestação. A presença da IgM, IgA e IgE reportam para uma infecção recente, porém sem uma temporalidade mais específica. E com os teste de captura, a IgM pode ser detectada, por mais de um ano. O teste de avidéz do anticorpo da classe IgG, se baseia no fato de que nas infecções recentes os anticorpos apresentam baixa afinidade aos antígenos (baixa avidéz). Durante semanas e meses, estes anticorpos vão apresentando grau de avidéz crescente para os antígenos específicos pelo aumento da maturação de seus centros de ligação (Werblin et al., 1973). Nas infecções ocorridas há mais de seis meses, os títulos geralmente permanecem acima de 60% dos originais, pois a maioria dos anticorpos apresenta alta avidéz. Em infecções de até quatro meses, os títulos caem para valores de 40% ou menos sendo caracterizados como de baixa avidéz.

2.13 B₄) ELISA de Captura (duplo sanduíche) (Naot & Remington 1980)

Diferencia-se dos testes convencionais em formato ELISA, porque ao invés do antígeno ser adsorvido na placa de ELISA, adsorve-se nesta placa um anticorpo policlonal específico anti-IgM humano, seguido então pelo soro do paciente, antígeno do toxoplasma e por fim um sistema indicador (fluorescente ou

enzimático), para os antígeno do toxoplasma. É uma reação de captura para detecção de IgM, (Naot et al. 1981, Siegel et al. 1983) e IgA (Stepick-Biek et al. 1990, Milatovic & Braveny 1980).

Os resultados falso-positivos que poderiam ocorrer com o ELISA convencional, pela presença de fator reumatóide e anticorpo antinuclear são evitados pelos testes de captura (Kimball 1971, Filice et al 1980).

O anticorpo IgM materno, ao contrário do IgG de mesma origem, não atravessa a barreira placentária íntegra. E mesmo em caso de lesão da placenta, a meia-vida deste anticorpo no sangue do neonato é de somente cinco dias. Por esse motivo, a fração IgM é ideal para o diagnóstico da infecção congênita pelo *Toxoplasma*, porque permite distinguir entre os anticorpos produzidos pela criança (IgM) daqueles transferidos passivamente pela mãe (IgG) (Naot et al. 1981). O fato dos títulos de IgM anti-toxoplasma surgirem antes dos títulos de IgG e persistirem por relativamente curto período de tempo após a infecção aguda, torna essa imunoglobulina importante no diagnóstico das infecções recentemente adquiridas. O anticorpo IgM apresenta-se mais útil por especificidade no sangue fetal que no líquido amniótico, pois o mesmo é macromolécula e tem restrições na eliminação renal (Robert Schier 2001). Portanto, a presença do anticorpo IgM no líquido amniótico, o qual reproduz a produção urinária fetal, de regra geral encontra-se reduzida, mesmo na fase de infecção fetal aguda. Na imunofluorescência convencional para IgM, os títulos de anticorpos anti-toxoplasma são detectados por 6 a 12 meses nos testes de captura, porém, os títulos de anticorpos são capturados em títulos bem menores e portanto são detectados por até dois a três

anos. Pelo método estandardizado, o ELISA IgA de captura é mais sensível que o ELISA IgM ou o ISAGA IgM para diagnóstico do feto e do recém-nascido com toxoplasmose congênita. O IgA pode persistir por 8 meses ou mais em lactentes congenitamente infectados (Bessieres et al. 1992, Stepick-Biek et al. 1990). No entanto, esses testes têm resultados diversos nos diferentes trabalhos de literatura. (Stepick – Biek et al. 1990, Bessieres et al. 1992, Patel et al. 1993).

2.13 (C) Testes indiretos

2.13 C₁) Exame Hematológico

Na infecção congênita freqüentemente são observadas anemia e trombocitopenia, esta última podendo aparecer nos casos subclínicos (Hohlfeld et al. 1994). Algumas vezes, estão presentes leucocitose ou leucopenia e eosinofilia, que podem exceder a 30% da contagem diferenciada (Callahan et al. 1946).

2.14 Medicamentos para a terapêutica materna da toxoplasmose

2.14.1 Espiramicina

A espiramicina é um antibiótico macrolídeo, com ação efetiva contra os taquizoítos do *T. gondii* (Niel et al. 1981, Garin & Eyles 1968). Em humanos,

mantém concentrações terapêuticas no sangue materno em vários tecidos e particularmente na placenta (Forestier et al. 1987, Bourget et al. 1996). A dose preconizada é de 3g/dia (1g de 8/8horas) durante a gestação, como resultado do trabalho de Garin et al. (1968). Doses de espiramicina acima de 35 mg/kg produzem vasoespasmo, calafrios, gosto estranho, vertigem, hiperemia da face, náusea, vômitos, diarreia, anorexia, prolongamento do intervalo QT e arritmias cardíacas. Nenhuma toxicidade hematológica, hepática ou renal foi notada. (Stramba-Badiale et al. 1997). Não apresenta efeito teratogênico e por isso é utilizada em gestante com toxoplasmose aguda na tentativa de se reduzir a transmissão ao feto (Bourget et al. 1996). Não há nenhum dado que demonstre de forma conclusiva a eficácia desse medicamento no tratamento dos fetos infectados (Forestier et al. 1987). Porém é importante notar que a espiramicina pode reduzir a severidade da infecção fetal, principalmente por retardar o período em que ocorre a transmissão placentário-fetal, dando ao feto tempo para adquirir maior maturidade imunológica (Couvreur et al. 1993).

2.15 Medicamentos específicos para terapêutica fetal da toxoplasmose

2.15.1 Pirimetamina (Daraprin®)

Pírimetamina é uma droga anti-malária capaz de interromper o ciclo metabólico do parasita, causando a inibição da enzima diidrofolato-redutase, impedindo a conversão do ácido fólico em ácido folínico, que é importante na

síntese de seu DNA e RNA.

Contra-indica-se o uso de pirimetamina no primeiro trimestre da gestação pelo seu efeito teratogênico detectado em camundongos (Anderson & Morse 1966). Overdose acidental resulta em vômitos, tremores, convulsões e depressão da medula óssea (Remington et al. 2001).

2.15.2 Sulfonamidas (Sulfadiazina[®])

As sulfonamidas são análogos estruturais e antagonistas competitivos do ácido paraminobenzóico (PABA), que é utilizado pelos parasitas na síntese do ácido fólico. A combinação da sulfonamina com a pirimetamina em um esquema de tratamento nas infecções pelo *T.gondii* não visa meramente um efeito aditivo da ação de cada um destes medicamentos, apesar de ter sido observado um efeito sinérgico dos dois, mas sim uma atividade combinada oito vezes maior do que seria esperada (Eyles & Coleman 1955, Sheffield et al. 1972). As sulfonamidas são contra-indicadas no final do terceiro trimestre da gestação (Remington et al. 2001), pois podem deslocar a bilirrubina fetal circulante de sua ligação com a albumina permitindo seu deslocamento para o SNC e ocasionando o Kernicterus. Porém, valem as observações de Daffos et al. (1988), que consideram o uso associado da pirimetamina com sulfadiazina bem superior ao uso de espiramicina, para tratamento do feto, tratamento que vem sendo utilizado na França com ótimo resultado. É preconizado o uso das sulfonamidas até bem próximo do nascimento.

2.15.3 Medicamento Auxiliar - Ácido Folínico (Leucovorin®)

Este medicamento é um adjuvante no tratamento com drogas antifolato como a pirimetamina, por ser o ácido folínico unicamente utilizado pelo organismo humano, prevenindo-se os problemas hematológicos decorrentes do uso dos antifolatos (Frenkel & Hitchings 1957, Frenkel et al. 1960). É sempre recomendado que se estenda o uso do ácido folínico por mais uma semana após o término do tratamento com a pirimetamina (Remington et al. 2001). Não existem relatos de efeitos adversos com o seu uso, mesmo em doses elevadas. Não se deve substituí-los por levedo ou fermento *Fleishman* (Oréface & Bonfioli 2000).

2.16 Esquema de Tratamento Medicamentoso da Toxoplasmose Congênita

É recomendado pelo "U.S. (Chicago) Nacional Collaborative Treatment Trial" (McAuley et al. 1994, Remington et al. 2001), que preconiza para os casos de infecção por *T. gondii* na gestação, que a gestante deve ser tratada com a espiramicina até ao final da gravidez, com o objetivo de diminuir a transmissão vertical e desta forma prevenir o aparecimento da toxoplasmose congênita. No caso de haver transmissão para o feto, o grupo de Chicago recomenda que a partir da 21ª semana de gestação, seja feita a substituição da espiramicina (Esquema medicamentoso 1) pela associação da sulfadiazina, pirimetamina e o ácido folínico (Esquema medicamentoso 2), visando o tratamento da infecção congênita do feto. Após 30 dias do Esquema 2 alterna-se mensalmente o

Esquema 1 com o Esquema 2 e assim sucessivamente até ao final da gestação. Após o nascimento, o grupo recomenda a continuidade do tratamento no neonato com toxoplasmose congênita subclínica ou aparente, com o uso do Esquema 2 que deverá se estender por todo o primeiro ano de vida (Tabela 4).

Tabela 4. Orientação para o tratamento da infecção por *T. gondii* na gestante e no neonato preconizado pelo grupo "U.S. (Chicago) Nacional Collaborative Treatment Trial".. em McAuley et al. (1994) e Remington et al. (2001)*.

| FORMA CLINICA | DROGAS | DOSAGEM | FREQUÊNCIA /DURAÇÃO |
|---|--|--|--|
| Gestante com toxoplasmose aguda até a 21 semanas da gestação ou até o final se o feto não estiver infectado | Esplramiclina | 1g de 8/8 horas/dia | Esquema 1 Até infecção fetal ser confirmada ou excluída até 21 semanas. Se confirmada alternar mensalmente com o esquema 2 Esquema 2 |
| Gestante com Infecção fetal confirmada após 18 semanas de gestação | Pirimetamina + Sulfadiazina + Ácido folínico | - 100 mg/kg/dia, em 2 doses/dia por 2 dias e então 50 mg/dia. - 75mg/kg/dia, em 2doses/dia + 10-20 mg, dia. - 2 mg/kg/dia, por 2 dias e então 1 mg/kg/d, por 2.ou 6 meses e então esta dose às 2ª, 4ª e 6ª feiras. | Alternar mensalmente com o esquema 1 Esquema 3 |
| Toxoplasmose Congênita Pós- natal | Pirimetamina Sulfadiazina + Ácido folínico Prednisona quando proteína líquor \geq 1g/dl ou por retinocoroidite | -100 mg/kg/dia, em 2 doses/dia. - 10 mg, 3 x por semana (1 mg/kg/dia, máx. 15 mg/dia) 1 mg/kg/d, 12/12h,vo | -RN deve receber este esquema de forma continua durante 1 ano Ácido folínico até 1 semana após termino da medicação Até ↓ inflamação |

*O tratamento deve ser mantido até que a infecção congênita seja excluída.

"Adaptado de Remington JS, Mcleod R, Desmonts G. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein JO. Infections Diseases of the Fetus and Newborn infant 5.ed. WB Saunders. 2001 :206-346

A tendência atual do tratamento da toxoplasmose fetal é usar a sulfadiazina e pirimetamina e ácido folínico desde a 21ª semana de gestação, usando de forma ininterrupta até o nascimento da criança e só modificar para clindamicina e pirimetamina para o recém-nascido que tiver hiperbilirrubinemia. Após o nascimento, manter-se as drogas até 1 ano (no caso de não ter seqüelas) ou 2 anos para atenuação das seqüelas provocadas pelo parasita.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Estabelecer a eficiência da amniocentese (coleta de líquido amniótico) e da cordocentese (coleta de sangue fetal puro do cordão umbilical), dirigidas por ultrassonografia no diagnóstico da toxoplasmose fetal.

Estabelecer taxa de transmissão vertical.

3.2 Objetivos Específicos

- 3.2.1 Avaliação do ponto de vista comparativo, dos dois métodos invasivos (amniocentese e cordocentese) para o diagnóstico fetal de toxoplasmose, utilizando sorologia (pesquisa dos anticorpos da classe IgM e IgG) no líquido amniótico, como metodologia inovadora
- 3.2.2 Avaliar o valor dos exames sorológicos realizados em camundongos inoculados com líquido amniótico e sangue fetal de gestantes com rastreamento positivo para toxoplasmose, no sentido de confirmar o diagnóstico da infecção fetal.

4. Materiais e Métodos

4.1 População em estudo

O presente trabalho trata de estudo observacional analítico de coorte, prospectivo, em gestantes agudamente infectadas pelo *T. gondii*, onde os fatores estudados foram os tipos de exames realizados para o diagnóstico de infecção fetal. As grávidas avaliadas foram provenientes do sistema público de saúde de Goiás, onde o programa inclui investigação sorológica de 10 infecções (HIV, hepatite B, hepatite C, HTLV, toxoplasmose, doença de Chagas, herpes simples, sífilis, citomegalovírus e rubéola) e a fenilcetonúria materna, por meio da técnica de papel filtro. A gestante ao iniciar o acompanhamento médico pré-natal, recebe solicitação da coleta de gota de sangue digital para o papel filtro, que é enviado do posto de coleta até o laboratório do Instituto de Pesquisa, Ensino e Diagnóstico (IPED) da APAE de Goiânia, conveniado à Secretaria Estadual de Saúde, com apoio das Secretarias Municipal e Estadual de Saúde do Estado de Goiás. Deste laboratório os resultados são enviados para os respectivos centros de triagem, solicitando nova coleta se os resultados forem indeterminados. Neste caso, a nova coleta, com amostra de soro, destina-se ao Laboratório Central (LACEN) da Fundação Serviços Estaduais de Saúde para contraprova. A técnica consiste na coleta de sangue das pacientes, proveniente da polpa digital ou de punção venosa, com deposição no papel filtro em área previamente demarcada. Após secagem da amostra (até 4 horas), o papel filtro é enviado ao laboratório IPED – APAE em Goiás, não ultrapassando período superior a 24 horas após a coleta. Após chegada ao laboratório, a amostra de sangue é resuspendida, e

então processada pelos testes sorológicos padrões para cada doença. Especificamente para a infecção pelo *T. gondii*, o método sorológico utilizado na triagem foi ensaio imunoenzimático (ELISA), com sensibilidade de 99,4% e especificidade de 99,8%, para pesquisa de anticorpos IgM, e sensibilidade de 99,3% e especificidade de 99,8% para pesquisa de anticorpos IgG contra este parasita.

As mulheres (N = 65) diagnosticadas como portadoras de toxoplasmose aguda, pela presença de anticorpos da classe IgM identificados com teste em papel filtro, confirmadas com teste ELISA (IgM) e teste de Avidéz da IgG abaixo de 30%, foram encaminhadas para investigar a possibilidade de infecção fetal. Foram submetidas a exames em líquido amniótico (retirado por amniocentese) e sangue fetal (retirado por cordocentese) ao mesmo tempo por punção dirigida por ultrassonografia.

O período de estudo foi de Janeiro de 2003 a Dezembro de 2005. As mulheres foram encaminhadas ao serviço de referência para transmissão vertical do município de Goiânia e Estado de Goiás, com sede no Hospital das Clínicas/Faculdade de Medicina-UFGO. Foram realizados amniocentese com coleta de 10 ml de líquido amniótico, e ao mesmo tempo cordocentese com aspiração de 3 ml de sangue fetal puro, sob visão ecográfica, na clínica Fértil/Goiânia-Go.

Os exames solicitados no líquido amniótico e no sangue fetal foram realizados no laboratório de parasitologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás e foram: cultura e

inoculação em camundongos, complementado pelo estudo histopatológico do cérebro dos mesmos; sorologia para toxoplasmose no sangue de camundongos isogênicos inoculados com material aspirado durante o procedimento invasivo (líquido amniótico e sangue fetal); reação de imunofluorescência indireta (IFI) com dosagem de anticorpos das classe IgM e IgG; reação de amplificação do DNA do parasita (PCR).

As crianças (RN) que nasceram na maternidade do Hospital das Clínicas/UFGo, realizaram ao nascimento: pesquisa do parasita em sangue periférico e líquido cefalorraquidiano por cultura e inoculação em camundongos, exames em sangue periféricos com técnicas automatizadas MEIA (Método utilizando micro-partículas), ELFA para detecção de anticorpos da classe IgM e ELISA para detecção de anticorpos da classe IgA específica e IFI (IgM e IgG), realizadas no laboratório do Hospital das Clínicas (MEIA) e Atalaia (ELFA, IGA e IFI). Foi colhido sangue da mãe para análise comparativa dos seus títulos com os do filho. Além disso, foram acompanhados no ambulatório de infecções congênicas (referência para o tratamento de RN com infecção congênita da rede municipal e estadual de saúde) do referido hospital. Fizeram exames de fundo de olho e ultrassonografia de crânio transfontanela. Esses exames e o seguimento permitiram o diagnóstico da transmissão vertical.

A população inicial foi 65 gestantes com rastreamento plasmático positivo para toxoplasmose aguda, e a avaliação final foi realizada em 37 delas que apresentavam todos os resultados obstétricos exigidos (sorologia materna/ inoculação em camundongo/ estudo histopatológico do cérebro do camundongo/

avaliação clínico-laboratorial do recém-nascido) para essa investigação, e com avaliação diagnóstica do recém-nascido ou do lactente, que pudesse esclarecer se houve ou não transmissão vertical do parasita.

Considerou-se como critério de exclusão:

1. Grávidas que não confirmaram toxoplasmose aguda com o teste de ELISA e de Avidéz da IgG.
2. Grávidas que após avaliação negaram-se a se submeterem aos procedimentos invasivos.
3. Após a manipulação dos resultados, foram também excluídas 28 (43,1%) pacientes por não apresentarem todos os exames da proposta de investigação inicial.

4.2 Fluxograma dos Pacientes

As pacientes foram originadas dos serviços públicos de saúde municipal de Goiânia e estadual de Goiás, triadas também por Hospitais de referências, Hospital das Clínicas e Maternidades públicas estaduais (Hospital Materno Infantil, Maternidade Dona Íris e Maternidade Nossa Senhora de Lourdes) onde os obstetras ao identificarem sorologia materna com presença de anticorpos da classe IgM, confirmados por ELISA e com teste de avidéz do IgG baixo, identificadores da fase aguda, faziam o encaminhamento para o diagnóstico de infecção fetal.

O encaminhamento foi feito ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina/UFGO. Os procedimentos invasivos foram realizados na Clínica Fértil Diagnósticos, onde foi coletado o líquido amniótico através da técnica de amniocentese clássica sob visão ultrassonográfica com agulha descartável, calibre 22, e ao mesmo tempo o sangue fetal puro através da técnica de cordocentese sob visão ultrasonográfica com agulha descartável do mesmo calibre. Posteriormente, os materiais colhidos foram encaminhados ao laboratório de patologia do IPTSP, para realização dos exames citados anteriormente.

Os resultados finais dos exames foram entregues às pacientes, que em seguida foram orientadas sobre o tratamento já iniciado na unidade de saúde, e conscientizadas da necessidade de mudanças quando o feto foi diagnosticado como infectado.

4.3 Processamento do Material

Cinquenta (50) amostras de líquido amniótico e 65 de sangue fetal foram centrifugados à 3000 rpm, por dez minutos, sendo que o sedimento ou papa de hemáceas foram inoculados via intra peritoneal com uma seringa de 1 ml em um grupo de três camundongos (0,2 ml por animal) isogênicos Balb/C, machos ou fêmeas, em média com 30g e 30 dias de idade.

Foram utilizados 465 camundongos na primeira parte do experimento e 450 na segunda, totalizando 915 animais.

4.4 Acompanhamento dos camundongos

Os animais foram acompanhados por 60 dias, sendo então sacrificados por deslocamento da coluna vertebral. O repique de macerado cerebral via intraperitoneal foi realizado em um segundo grupo de camundongos.

Retirou-se o sangue (por punção cardíaca) e o encéfalo dos animais. Do sangue, após a obtenção do soro, realizou-se sorologia, para a detecção de anticorpos das classes IgG e IgM através de Imunofluorescência. Do encéfalo, confeccionou-se lâminas histológicas coradas com hematoxilina-eosina.

Durante o acompanhamento dos animais, o aparecimento de sintomas clínicos, tais como arrepiamento do pelo, emagrecimento e letargia, foram considerados como indicadores de infecção, sendo então realizado a lavagem peritoneal nestes animais a procura das formas taquizoítas.

4.5 Punção cardíaca do camundongo

Nos ensaios experimentais, técnicas que otimizem os resultados desejados são necessárias. A sangria, por punções cardíaca é utilizada para obtenção de um volume de sangue significativo, mas em pequenos animais a mortalidade é alta.

Etapas da coleta intracardíaca:

Anestesiou-se o animal em posição de decúbito dorsal, desinfetando-se a região torácica (álcool-iodado), com seringa e agulha heparinizada, introduziu-se a agulha 24 x ½ com seringa de 1ml estéril, paralela à linha do esterno, em direção

à esquerda do animal, no antepenúltimo espaço intercostal, em um ângulo de 45° para aspirar do coração o volume desejado.

O volume de sangue compatível com a sobrevivência é calculado pela fórmula, “Volume a sangrar = (Peso Corporal x 0,09) x 0,20”. O volume de sangue conseguido em cada animal compatível com a vida do mesmo foi em média de 0,4 ml, quando os animais foram sacrificados foi possível obter até 1 ml de sangue total.

4.6 Imunofluorescência Indireta em Soro de camundongo.

Utilizou-se a reação de Imunofluorescência Indireta-IFI, (Camargo, 1974) sendo o antígeno produzido no laboratório, utilizando a cepa RH, mantida no laboratório de Protozoologia do IPTSP-UFG. A partir de lavado peritoneal de camundongos Balb/c previamente inoculados, seguida de lavagens com solução salina tamponada (PBS) 0.01M pH 7.2 sob centrifugação a 700g/10 minutos e conservados a temperatura de 4° a 8°C. A técnica foi realizada com os soros diluídos em PBS 0.01M pH 7.2, diluição seriada, a partir de 1:10. Foi usado soro conjugado fluorescente anticamundongo na diluição de 1:200 para os conjugados anti-IgM e anti-IgG de camundongo (conjugado anticadeia pesada com isotiocianato de fluoresceína - SIGMA).

4.7 Análise Histopatológica do Encéfalo dos camundongos

De cada experimento foram obtidos seis encéfalos, três do 1º e três do 2º inóculo. Foram sorteados dois encéfalos sendo um de cada inóculo. Estes foram cortados ao meio no sentido longitudinal com espessura de 5 mm, fixados em álcool 70% por 24 h e então transferidos para o formaldeído tamponado a 10%.

Em seguida, foram desidratados em concentrações crescentes de álcoois, diafanizados em xilol, incluídos em parafina quente e confeccionados blocos. Realizaram-se cortes histológicos seriados com espessura de 5 µm. Os cortes foram colocados em lâminas de vidro. Foram feitos dez cortes de cada encéfalo. O restante do bloco foi arquivado para estudos futuros. Os cortes foram corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE).

4.8 Imunofluorescência Indireta em líquido amniótico e sangue fetal (IgM e IgG)

Utilizou-se a reação de Imunofluorescência Indireta-IFI, sendo o antígeno produzido no laboratório de parasitologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, utilizando a cepa RH, mantida no laboratório de Protozoologia do IPTSP-UFG. A técnica foi realizada com os soros diluídos em PBS 0.01M pH 7.2, diluição seriada, a partir de 1:10. Foi usado soro conjugado fluorescente anticamundongo na diluição de 1:200 para os

conjugados anti-IgM e anti-IgG de camundongo (conjugado anticadeia pesada com isotiocianato de fluoresceína - SIGMA).

4.9 Reação em cadeia de polimerase (PCR) no líquido amniótico e sangue fetal

O DNA foi extraído, conforme especificações do PureLink Genomic Purification Kit – For Purification of genomic DNA -Invitrogen separadamente do material biológico (sangue e líquido amniótico). Foram utilizados controles negativos e positivos como material de laboratório adequados e ambientes isolados para realização de cada etapa da reação.

É um método que permite a amplificação de segmentos específicos de ácidos nucleicos, baseada em ciclos repetitivos da síntese de um segmento de DNA *in vitro*, utilizando uma DNA-polimerase, a *Taq* polimerase,

A PCR é baseada em dois pares cromossômicos do genoma B₁ do *T. gondii*, cepa RH. O primeiro par é Toxo-N1 (5'-GGAAGTGCATCCGTTTCATGAG-3'), e o segundo par é Toxo-N2 (5'-TGCATAGGTTGCAGTCACTG-3') e Toxo-C2 (5'-GGCGACCAATCTGCGAATACACC-3'), correspondendo ao nucleotídeo B₁ 694-714, 887-868, 757-776 e 853-831, respectivamente.

4.10 Avaliação do recém-nascido

Os recém-nascidos produtos destas gestações foram avaliados no Departamento de Pediatria da FM/UFMG. Neste momento fez-se avaliação clínica, sorológica, imunológica e oftalmológica e acompanhamento dos suspeitos em ambulatório especializado. Isso permitiu o diagnóstico dos nascidos infectados e assintomáticos, dos infectados sintomáticos e dos não infectados.

4.11 Análise Estatística

Para análise dos exames laboratoriais e determinação do melhor teste de diagnóstico pré-natal da toxoplasmose congênita, utilizaram-se os testes de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo, considerando-se

$$\text{Sensibilidade (S)} = \frac{a}{a + c}$$

$$\text{Especificidade (E)} = \frac{d}{b + d}$$

$$\text{Valor Preditivo Positivo (VPP)} = \frac{a}{a + b}$$

$$\text{Valor Preditivo Negativo (VPN)} = \frac{d}{c + d}$$

a = verdadeiro positivo
b = falso positivo
c = falso negativo
d = verdadeiro negativo

Cada teste foi realizado para líquido amniótico, sangue fetal e sangue de camundongo, utilizando-se como “padrão ouro” a inoculação em cobaio com

estudo histopatológico. Para fins comparativos utilizou-se como padrão-ouro o recém-nascido, para o qual estabeleceu-se o índice de transmissão vertical para este grupo.

5. Resultados

A partir do número amostral final de 37 pacientes obtiveram-se os seguintes resultados:

Tabela 5 – Distribuição dos casos de toxoplasmose e gravidez segundo a idade materna, Goiânia (GO) Brasil – 2006.

| Idade Materna (anos) | Nº | % |
|----------------------|----|--------|
| < 18 | 06 | 16,22 |
| 18 a 35 | 28 | 75,67 |
| > 35 | 03 | 08,11 |
| Total | 37 | 100,00 |

Tabela 6 – Distribuição dos casos de toxoplasmose e gravidez segundo a paridade, Goiânia (GO) Brasil – 2006.

| Paridade | Nº | % |
|-----------|----|--------|
| GI | 18 | 48,65 |
| GII – GIV | 18 | 48,65 |
| ≥ GV | 01 | 02,70 |
| Total | 37 | 100,00 |

GI – Primeira gestação ; GII – G IV - Segunda a quarta gestação ; G V – Quinta gestação.

A idade gestacional de realização dos procedimentos invasivos variou entre 22 e 34 semanas. Nenhuma complicação (amniorrexe, trabalho de parto prematuro, infecção amniótica, morte fetal) ligada aos procedimentos obstétricos invasivos foi observado nesta população estudada. A taxa de transmissão vertical foi de 37,14% neste grupo.

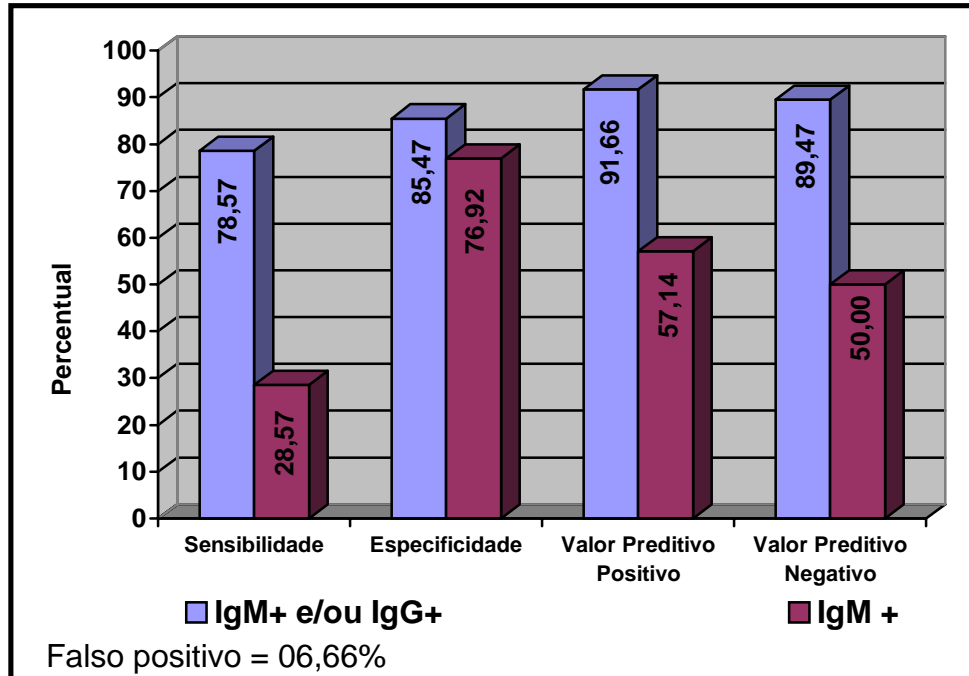


Gráfico 1 - Líquido Amniótico: Dosagem de anticorpos para *Toxoplasma gondii* (classes IgM e IgG) comparável a inoculação em camundongo com estudo histopatológico, considerado como padrão-ouro, Goiânia – Go, Brasil (2006).

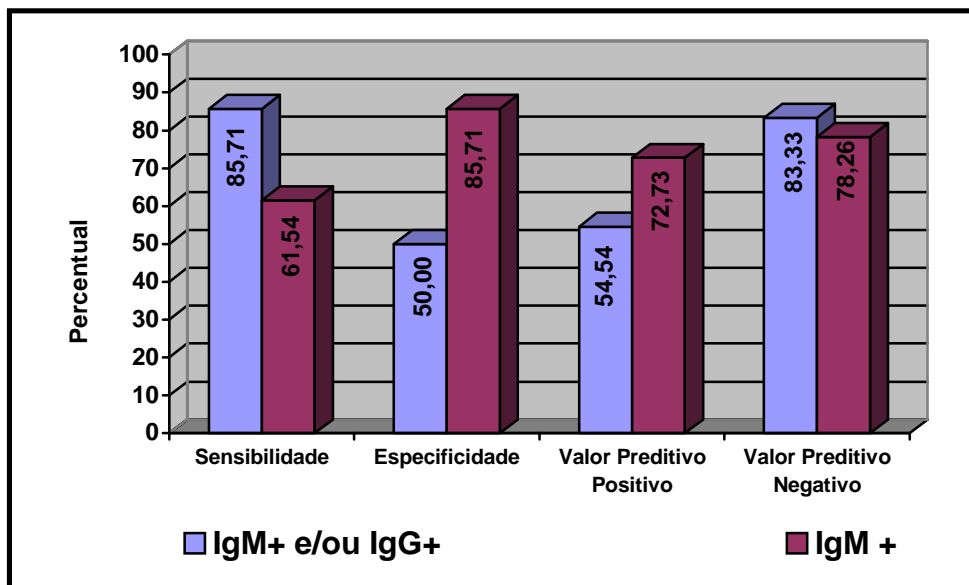


Gráfico 2 - Líquido Amniótico – Dosagem de anticorpos para *Toxoplasma gondii* (classes IgM e IgG) comparável ao recém – nascido, considerado como padrão-ouro, Goiânia – Go, Brasil (2006).

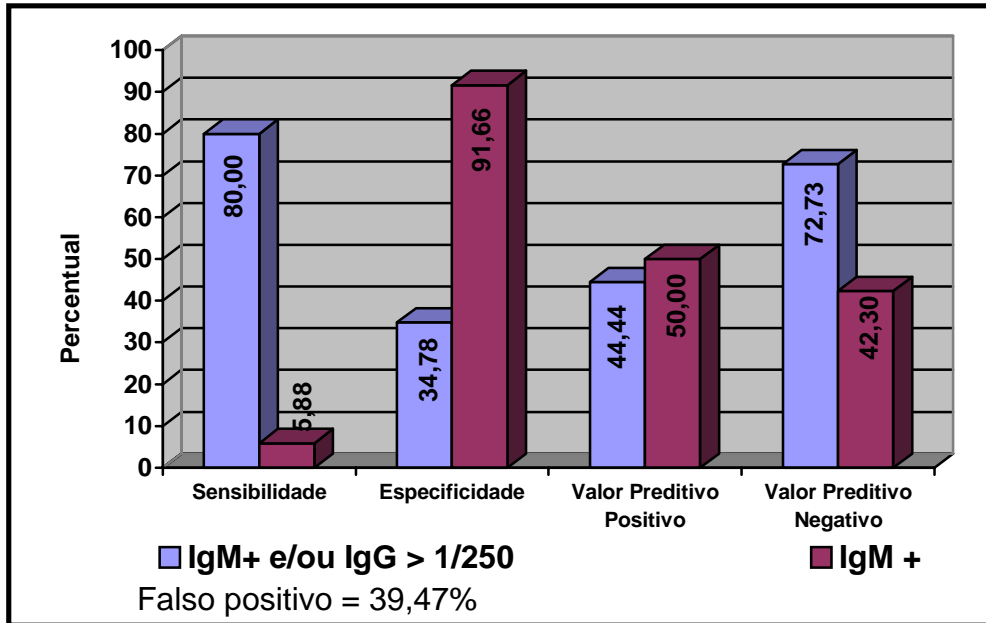


Gráfico 3 - Sangue fetal – Dosagem de anticorpos para *Toxoplasma gondii* (classes IgM e IgG) comparável à inoculação em camundongo com estudo histopatológico, considerado como padrão-ouro, Goiânia – Go, Brasil (2006).

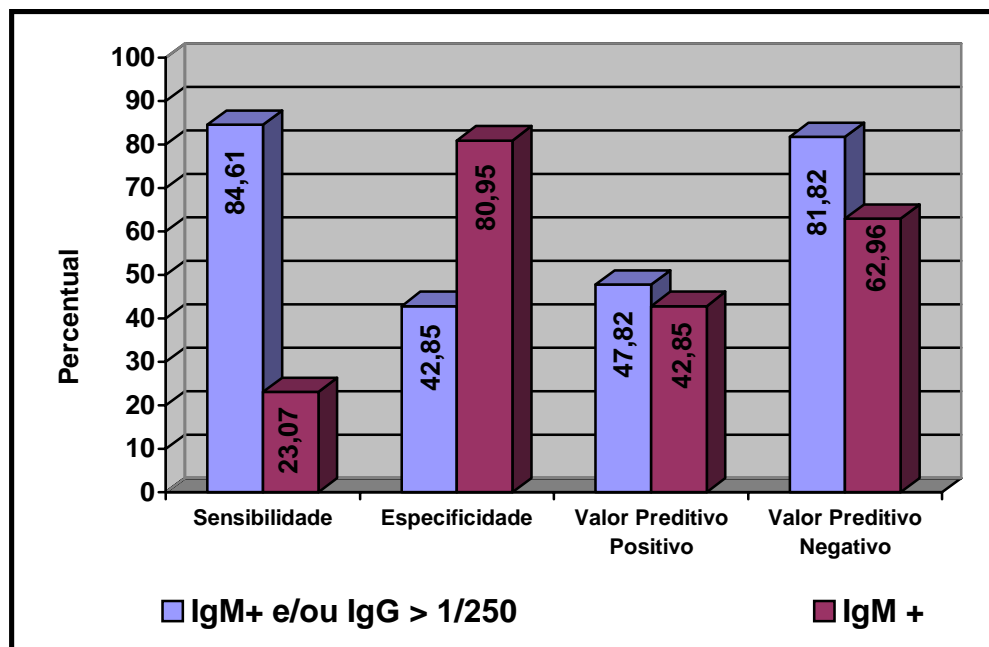


Gráfico 4 - Sangue fetal – Dosagem de anticorpos para *Toxoplasma gondii* (classes IgM e IgG) comparável ao recém – nascido, considerado como padrão-ouro, Goiânia – Go, Brasil (2006).

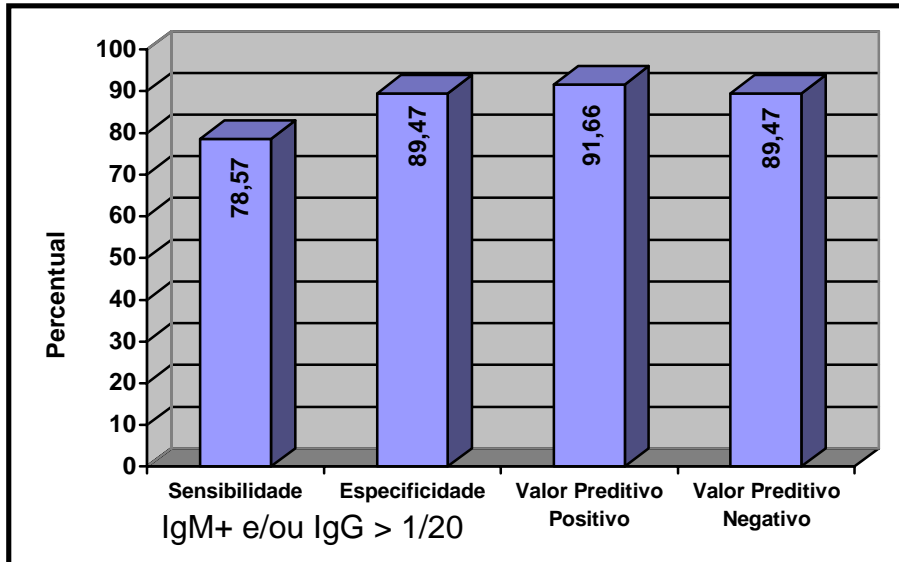


Gráfico 5 – Camundongo pós-inoculação – Dosagem de anticorpos para *Toxoplasma gondii* (classes IgM e IgG) comparável a inoculação em camundongo com estudo histopatológico, considerado como padrão-ouro, Goiânia – Go, Brasil (2006).

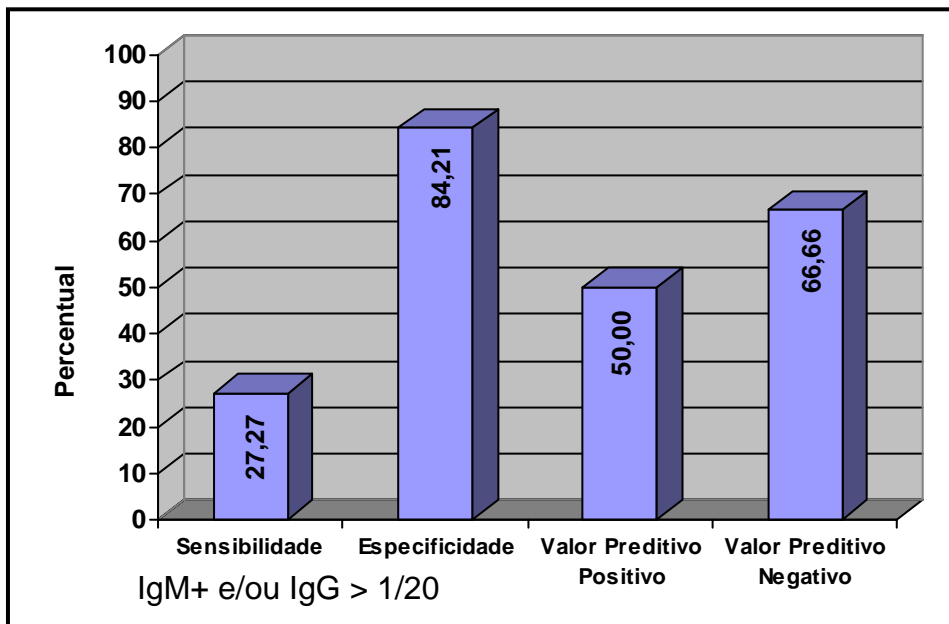


Gráfico 6 – Camundongo pós-inoculação – Dosagem de anticorpos para *Toxoplasma gondii* (classes IgM e IgG) comparável ao recém-nascido, considerado como padrão-ouro, Goiânia – Go, Brasil (2006).

Tabela 7 – Distribuição dos resultados da pesquisa de anticorpos para toxoplasmose em Líquido amniótico e sangue fetal, tendo como padrão-ouro a Inoculação em camundongo e histopatológico, IPTSP/UFGO, Goiânia-Go, Brasil (2006).

| Sorologia para toxoplasmose | S (%) | E (%) | VPP (%) | VPN (%) | FP (%) |
|---|-------|-------|---------|---------|--------|
| Líquido Amniótico (IgM ⁺ e/ou IgG ⁺) | 78,57 | 85,47 | 91,66 | 89,47 | 06,66 |
| Líquido Amniótico (IgM ⁺) | 28,57 | 76,92 | 57,14 | 50,00 | - |
| Sangue fetal (IgM ⁺ e/ou IgG > 1/250) | 80,00 | 34,78 | 44,44 | 72,73 | 39,47 |
| Sangue fetal (IgM ⁺) | 5,88 | 91,66 | 50,00 | 42,30 | 05,00 |
| Camundongo (IgM ⁺ e/ou IgG > 1/20) | 78,57 | 89,47 | 91,66 | 89,47 | - |

S (Sensibilidade), E (Especificidade), VPP (Valor Preditivo Positivo), VPN (Valor Preditivo Negativo) e FP (Falso Positivo)

A reação em cadeia de polimerase (PCR) para amplificação do DNA do *Toxoplasma gondii* foi realizada no líquido amniótico e no sangue fetal, sendo que apresentou resultados negativos em todos os casos avaliados.

6. Discussão

A população estudada é jovem, sendo que esta deve ser a expectativa pois representa população de pré-natal de baixo risco, onde o contacto com fontes de transmissão do protozoário a encaminha para o alto risco.

À semelhança da faixa etária, a grande maioria das mulheres ou são primigestas ou múltiparas, sendo que as grandes múltiparas apresentam baixa ocorrência.

Os procedimentos invasivos foram realizados acima de 22 semanas, pois é a idade gestacional a partir do qual o concepto tem produção de anticorpos, e portanto o quadro sorológico pode ser avaliado.

Diante de sorologia positiva para toxoplasmose no sangue materno durante o rastreamento pré-natal, é importante esclarecer a possibilidade do concepto ter sido infectado, pois a terapêutica tem indicação distinta quando o concepto está acometido (sulfa + pirimetamina + ácido folínico) ou não (tratamento materno com espiramicina).

A realização de exame imunológico no líquido amniótico, que é metodologia exclusiva do sangue, é procedimento mais simples que a cordocentese (sangue fetal), e trouxe à luz da ciência, a possibilidade do seu uso como investigação do concepto.

A propedêutica obstétrica invasiva (cordocentese/ amniocentese) apresenta risco, especialmente fetal, em torno de 1%, que complicaria a evolução gestacional e poderia levar até a morte fetal. Nestes 37 casos puncionados não houve qualquer complicação que tenha interferido na evolução do pré-natal.

O líquido amniótico representa a produção urinária do concepto na sua maior composição. Diante de uma infecção congênita, o feto reage com a produção de anticorpos, que tem como via de excreção a urinária e daí sua observação naquele líquido.

Considerando a pesquisa de anticorpos para *Toxoplasma gondii* no líquido amniótico comparável à inoculação em camundongo como padrão-ouro, obteve-se boa sensibilidade e boa especificidade com falso positivo baixo. Quando observou-se o teste como positivo, quando o IgM estivesse exclusivamente presente, os resultados caem, em decorrência de que a barreira renal dificulta o transporte urinário desta macromolécula. Assim a investigação no líquido amniótico através de IFI de anticorpos da classe IgG e/ou IgM, observando a presença especialmente do IgG referencia contaminação fetal pelo agente (Assim IgG excretado através da barreira renal fetal e identificado no líquido amniótico teria origem do concepto exclusiva, pois o IgG materno deveria utrapassar a barreira placentária e renal do feto para atingir o líquido amniótico).

A realização de amniocentese para coleta de líquido amniótico é bem descrita desde a década de 1960, e bem conhecida dos obstetras. Assim, dos procedimentos invasivos é considerado o mais simples, mais rápido e mais barato, sendo que o custo da sorologia no mercado privado de Goiânia-Go gira em torno de R\$ 32,00.

Quando se compara os cálculos da pesquisa de anticorpos para *Toxoplasma gondii* no líquido amniótico com o recém-nascido doente, verifica-se uma queda de especificidade de 85,47% (padrão-ouro o camundongo) para

50,00%, assegurando assim que nem todos os fetos contaminados desenvolvem a infecção e/ou doença até o momento da observação pós-natal.

No sangue do concepto infectado pelo toxoplasma deve circular o parasita e os anticorpos. Quanto aos anticorpos, deve-se considerar três compartimentos (o materno/ o fetal/ o líquido amniótico) com duas barreiras (a placentária / a renal fetal).

O anticorpo de classe IgG transpõe barreiras como a placentária e a renal com facilidade, enquanto o da classe IgM não o faz por apresentar peso molecular cinco vezes maior que o primeiro. Assim o anticorpo IgG materno passa para o concepto e através dos rins poderia chegar ao líquido amniótico em mínimas proporções, enquanto que o IgM materno não chega à circulação fetal e o IgM fetal não atingiria o líquido amniótico. Esta consideração explica a alta especificidade do IgM no sangue fetal (91,66%) e menos importante no líquido amniótico (76,52%). Desta forma, o anticorpo da classe IgM presente no compartimento materno representa infecção aguda da mãe e quando presente no lado fetal representa infecção aguda do mesmo. No mesmo sentido os anticorpos da classe IgG no compartimento fetal podem ser de origem materna, mas no compartimento do líquido amniótico parece ser exclusivo de origem fetal. No Líquido Amniótico o encontro do anticorpo da classe IgG e/ou IgM em qualquer titulação trouxe a melhor correlação estatística no diagnóstico da infecção do concepto.

No plasma fetal ao se pesquisar a sorologia, considerando como teste positivo a presença do anticorpo da classe IgM circulante e/ou da classe IgG com

título maior que 1/250 (pois este pode ser de origem materna) e como padrão-ouro a inoculação em camundongo obteve-se boa sensibilidade porém baixa especificidade e um falso positivo relevante. Quando se considerou como teste positivo apenas o anticorpo da classe IgM a especificidade subiu com falso positivo baixo. Porém, a sensibilidade ficou muito baixa, o que limita este critério como método de rastreamento. Desta forma estando o anticorpo da classe IgM presente no sangue fetal há alta correlação com a doença, mas quando ausente não exclui o rastreamento e o diagnóstico.

A reação em cadeia de polimerase (PCR) assim como captura híbrida, através de biologia molecular, identifica fragmentos de DNA do microorganismo em evidência, sendo que estando positivo apresenta alta especificidade diagnóstica. No entanto, a sensibilidade pode ficar prejudicada pela ocorrência de falsos negativos e isto limita o rastreamento basicamente por duas razões: 1. Não ter padronização universal; 2. baixa parasitemia no momento do teste. Neste estudo realizou-se PCR para toxoplasmose no líquido amniótico e no sangue fetal, sendo que não se apresentou positivo em nenhum dos casos. Tal observação se deve provavelmente ao fato das grávidas chegarem ao serviço de referência em tratamento com espiramicina, e no momento da coleta do material biológico, a circulação no ambiente feto-placentário apresentar baixa parasitemia. Segundo Vidigal e cols, 2002, a PCR não pode ser o único método no diagnóstico da toxoplasmose no líquido amniótico.

A metodologia padrão-ouro de referência internacional no diagnóstico da toxoplasmose congênita é a inoculação em camundongo, a qual foi utilizada nesta população.

A PCR, que representa avanço tecnológico neste aspecto, e em alguns serviços não consensuais tem sido adotada como padrão-ouro, não atendeu às expectativas esperadas neste estudo, e, portanto enaltecemos o método laboratorial mais trabalhoso e tradicional, que foi a inoculação em camundongo com estudo histopatológico. Foi o que melhor resultado forneceu. No entanto é demorado e necessita de várias inulações do material biológico para que se consiga encontrar o parasita na investigação.

A pesquisa de PCR para toxoplasmose tem alto custo em nosso meio (R\$ 292,30) e não se mostra um bom exame pois foi 100% negativo. Estes achados diferem de boa parte dos trabalhos da literatura, que consideram a biologia molecular como de elevado valor no diagnóstico da infecção congênita. Outros autores relatam sensibilidade baixa, provavelmente devido ao tratamento instituído à gestante desde o seu diagnóstico sorológico.

Por isso, enaltecemos a inovação do uso da investigação sorológica para toxoplasmose no líquido amniótico como método simples, prático, rápido, barato e de complicação reduzida, pode ser incorporada ao arsenal da pesquisa da infecção fetal.

Conhecer o quadro de contaminação fetal é importante no pré-natal para instalação de medicamentos específicos para a infecção, pois a espiramicina é um parasitostático placentário e não tem ação no concepto. Os medicamentos que

tratam o feto são pirimetamina e sulfadizina complementados pelo ácido fólico. Desta forma o tratamento com quimioterapia, em uma gestante com toxoplasmose aguda, leva a uma diminuição de até 70% na incidência de toxoplasmose congênita (Desmonts & Couvreur 1974, Daffos et al. 1988).

Ao se injetar material biológico em camundongo e o mesmo ficando contaminado, o seu sistema imune reage com produção de anticorpos, os quais podem ser pesquisados. Neste grupo fez-se punção cardíaca dos animais de laboratório pós-inoculação e comparou-se os resultados sorológicos (Anticorpos da classe IgM e IgG) com os resultados da inoculação em camundongo e estudo histopatológico, observando sensibilidade de 78,57% e especificidade de 89,47%, os quais são índices interessantes do ponto de vista experimental. Assim, camundongos confirmadamente virgens de toxoplasmose podem ser utilizados no rastreamento e diagnóstico da doença fetal através da identificação de anticorpos específicos circulantes no seu sangue.

A sorologia no líquido amniótico (anticorpos da classe IgM e IgG) deve ser incorporada à propedêutica obstétrica na investigação da toxoplasmose fetal, por ser simples, barata, de baixas complicações no pré-natal, altos índices de correlação com infecção e/ou doença no concepto.

Esta observação inovadora da investigação imunológica no líquido amniótico e também no sangue de camundongo abre novos horizontes na ciência, quanto à pesquisa experimental e possível incorporação destas metodologias na prática diária da obstetrícia. Traduz-se como relevante na difícil definição de postura quanto à terapêutica desta infecção no pré-natal, no sentido de reduzir a

transmissão vertical e especialmente as seqüelas dramáticas, que esta entidade pode deixar para sempre nos conceptos que sobreviverem.

7. Conclusões

7.1 Conclusões gerais

1) A pesquisa simplificada de sorologia para toxoplasmose (IgM e IgG) é possível no sangue fetal por cordocentese, e especialmente no líquido amniótico por amniocentese.

2) A amniocentese e a cordocentese foram eficientes quanto à exeqüibilidade e a ausência de complicações.

7.2 Conclusões específicas

1) O líquido amniótico, através da amniocentese, para pesquisa sorológica de anticorpos da classe IgM e IgG em qualquer titulação pode ser utilizado no rastreamento e diagnóstico da infecção fetal por toxoplasmose, pois mostra elevada correlação em infecção fetal com alta sensibilidade e especificidade, e com baixo resultado falso positivo.

2) No sangue fetal, através de cordocentese, pode-se utilizar a pesquisa sorológica (anticorpos da classe IgM+ e/ou IgG > 1/250) para diagnóstico da infecção por toxoplasmose pois teve alta sensibilidade, apesar da baixa especificidade, e elevado resultado falso positivo.

3) A identificação isolada do anticorpo da classe IgM no sangue fetal (cordocentese) eleva a especificidade de 34,7% para 91,66% com baixo resultado falso positivo de 05,00%, enquanto que no líquido amniótico esta declina de

85,47% para 76,92%, possivelmente pela barreira na excreção renal desta imonoglobulina. Portanto, este anticorpo quando presente na circulação fetal traduz alta correlação com infecção aguda fetal por toxoplasmose.

4) No material coletado por cordocentese e amniocentese, após ser inoculado em comundongos, pode-se pesquisar anticorpos da classe IgM e IgG para toxoplasmose no sangue dos mesmos, onde apresentou alta sensibilidade e especificidade.

8. Referências Bibliográficas

Alexander J & Hunter CA. Immunoregulation during toxoplasmosis. *Chem Immunol*. 1998; 70: 81-02.

Alford CA Jr, Stagno S, Reynolds DW. Congenital toxoplasmosis: clinical, laboratory, and therapeutic considerations, with special reference to subclinical disease. *Bull New York Acad Med*. 1974; 50: 160-81.

Anderson SI, Morse LM. The influence of solvent on the teratogenic effect of folic acid antagonist in the rat. *Exp Mol Pathol*. 1966; 5: 134-145.

Andrade GM, Tonelli E, Oréfice F 2000. *Toxoplasmose In: Tonelli E, Freire LMS, Doenças infecciosas na infância e Adolescência 2ª ed.* Editora Médica e Científica Ltda. p. 1297-1339.

Avelino MM, Campos Jr, Parada JB, Castro AM. Pregnancy as a risk factor for acute toxoplasmosis seroconversion. *Europam J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2003; 108: 19-24.

Bahia-Oliveira LMG, Wilken de Abreu AM, Azevedo-Silva J. and Oréfice F. 5. Toxoplasmosis in Southern Brazil: an alarming situation of highly endemic acquired congenital infection. In: (Invited review) Recent trends in research on congenital toxoplasmosis. Esdild Petersen, Arnold Pollak, and Reiter-Owona (eds). *International Journal for Parasitology*. 2001; 31: 115-44.

Benirschke K, Driscoll SG. The pathology of the Human Placenta. New York, Springer-Verlag. 1967; p.512.

Bessieres MH, Roques C, Berrebi A, Barre V, Cazaux M, Seqüela JP et al. IgA antibody response during acquired and congenital toxoplasmosis. *J Clin Pathol*. 1992; 45: 605-608.

Boch J. Die Kokzidiose der Katze. *Tierarti Prax*. 1984; 12: 383-90.

Bonametti AM, Passos JN, Silva EM, Bortodiero AL. Outbreak of acute toxoplasmosis transmitted through the ingestion of ovine raw meat. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1996; 30: 21-25.

Bowie WR, King AS, Werker DH, Issac-Renton JL, Bell A, Eng SB, Marion SA. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. The BC Toxoplasma investigation Team. *Lancet*. 1997; 350: 173-7.

Boyer KM, Remington JS, Macleod RL. Toxoplasmosis. In: Feigin and Cherry. Textbook of Pediatric Infectious Diseases, 4ª ed. Philadelphia: WB Saunders Company. 1998; p. 2473-2490.

Burnett AJ, Shortt SG, Isaac-Rewton J et al. Multiple cases of acquired toxoplasmosis presenting in an outbreak. *Ophthalmology*, 1998; 105: 1032 – 1037.

Buxton D. Ovine Toxoplasmosis: a review. *JR Soc Med*. 1990; 83: 509-11.

Callahan WP Jr, Russell WO, Smith M. Human toxoplasmosis. *Medicine*. 1974; 25: 343-397.

Cathie IAG. Toxoplasmosis in childhood. *Lancet*, 1954; 266: 813-814.

Cecfcon MEJ, Diniz EMA, Vaz FAC et al. Imunidade do feto e do recém-nascido. *Pediatrics*, 1997; 19: 9-23.

Chiari C, Neves DP. Human toxoplasmosis acquired by ingestion of goat's milk. *Men. Inst. Oswaldo Cruz*. 1984; v.79, n. 3, 337-340, 1984.

Couvreur J, Desmonts G. Toxoplasmosis. In: Macleod, C. Parasitic infections in pregnancy and the newborn. New York: Oxford University Press, 1988; p. 112-142.

Couvreur J, Thulliez P, Daffos F, Aufrant C, Bompard Y, Gesquiere A, Desmonts G. In útero treatment of toxoplasmic fetopathy with the combination pvrimehamine-sulfadiazine. *Feral Diagn Ther*. 1962; 8:45-50.

Daffos F, Forestier F, Pavlovsky MC Thulliez P, Aufrant C, Valenti D, Cox WL. Prenatal Management of 746 pregnancies at Risk for Congenital Toxoplasmosis. *N Engl J Med*. 1988; 318: 271-275.

Decoster A, Slizewicz B, Simon J, Bazin C, Darcy F, Vittu G, Boulanger C, Champeau Y, Demory JL, Duhamel M, et al . Platelia-Toxo IgA, a new kit for early diagnosis of congenital toxoplasmosis by detection of anti-P30 immunoglobulin A antibodies. *J Clin Microbiol*. 1991; 29:2291-2295.

Desmonts G, Couvreur J. Congenital Toxoplasmosis. A prospective study of 378 pregnancies. *New England J Med*. 1974; 290: 1110-1116.

Desmonts G, Daffos F, Forestier F, Capella-Pavlovsky M, Thulliez P, Clartier M. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Lancet*. 1985; 2: 500-4.

Dubey JP. A review of toxoplasmosis in pigs. *Rev Parasito*. 1986; 19: 181-229.

Dubey JP, Miller NL, Frenkel JK. Characterization of the new fecal form of *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages indetifield as coccidian oocysts. *Science*. 1970; 167: 893-896.

Dubey JP, Beattie CP. *Toxoplasma of animals and man*. CRC, Boca Raton. 1988a.

Dubey JP et al. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev*. 1988b; 11: 267-99.

Dubey JP, Kirkbride CA. Economic and public health considerations of congenital toxoplasmosis in lambs. *La Ve Med Asssoc*. 1989; 195: 1715-1716.

Eichenwald HE. A study of congenital toxoplasmosis, with particular emphasis on clinical manifestations, sequelae and therapy. In Siim JC. *Human Toxoplasmosis*. Copenhagen, Munksgaard. 1960; p. 41.

Eyles DE, Coleman N. Na evaluation of the curative effects of pyrimethamine and sulfadiazine, alone and in combination, on experimental mouse toxoplasmosis. *Antibiot Chemother*. 1955; 5: 529-539.

Farhat CK, Chung SS, Iazetti AV, Hermann AA 1977. Toxoplasmose e doenças com imunodeficiência. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PEDIATRIA, Rio de Janeiro. Anais, [s.n.].

Ferreira EC. Toxoplasmose. In: Neves, Jayme. *Doenças Infecciosas e Parasitárias em Pediatria*, Rio de Janeiro, 1981; 45: 528-538.

Figueiró-Filho EA, Lopes AHA, Senefonte FRA, Souza Júnior VG de, 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: 442-449.

Filice GA, Yeager AS, Remington JS. Diagnostic significance of immunoglobulin M antibodies to *Toxoplasma gondii* detected after separation of immunoglobulin VI from immunoglobulin G antibodies. *J Clin Microbiol*. 1980; 12: 336-342.

Forestier F, Hohlfeld P, Lynch L. Les foetopathies infectieuses. Prévention, diagnostic prénatal, attitude pratique. *Presse Med*. 1991; 20: 1448-1454.

Fortier B, Ajana F, Sousa MIP et al. Prevention and treatment of materno-fetal toxoplasmosis. *Presse Med*. 1991; 20: 1374-1383.

Foulon W, Naessens A, Derde M. Evaluation of the possibilities for preventing congenital toxoplasmosis. *Am J Perinatol*. 1994; 11: 7-62

Frenkel JK, Hitchings GH. Relative reversal by vitamins (p-aminobenzoic, folic and folinic acids) of the effects of sulfadiazine and pyrimethamine on *Toxoplasma*, mouse and man. *Antibiot Chemother.* 1957; 7: 630-638.

Frenkel JD 1967. Adoptive immunity to intracellular infection. *J Immunol* 6: 1309-1319.

Frenkel JK, Weber RIV, Lunde KIN. Acute toxoplasmosis. Effective treatment with pyrimethamine, sulfadiazine, leucovorin, calcium, and yeast. *JAMA.* 1960; 173: 1471-1476.

Frenkel JK, Dubey JP, Miller NL. *Toxoplasmosis gondii* oocyst in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science.* 1970; 167: 893-896.

Frenkel JK, Ruiz A. Toxoplasmosis humana: una revision. *Acta Med Cost.* 1973; 16: 5-73.

Frenkel JK. Toxoplasmosis. *Ped Clin North America.* 1985; 32: 917-932.

Frenkel JK, Hassanein RS, Brow E et al. Transmission of *T. gondii* in Panama City, Panama: a five-year prospective cohort study of children, cats, rodents, birds, and soil. *Am J Trop Med Hyg.* 1995; 53: 458-468.

Frenkel, J.K. Toxoplasmose. In: Veronesi. Tratado de infectologia. 2^a ed. São Paulo: Atheneu. p. 1996; 1290-1305.

Frenkel JK. Biology of *Toxoplasma gondii*. In: Ambroise-Thomas P. Peterse e, editors. Congenital Toxoplasmosis: scientific background, clinical management and control. Paris: Springer –Verag. 2000; P 9-25.

Frenkel JK. Toxoplasmose: parasite life cycle pathology and immunology. In Hammond D.M., Long P. L. (eds): C The Coccidia. Baltimore, University Park Press, 1973; p. 343-410.

Forestier F, Forestier F, Daffos F, Rainaut M, Desnottes JF, Gaschard JC. Sulva thérapeutique foetomaternelle de la spiramycine en cours de grossesse. 1987; Arch Fr Pediatr 44: 539-544.

Garin JP, Pellart J, Maillard M. et al.. Bases théoriques de la prévention par la spiramycine de la toxoplasmose congénitale chez la femme enceinte. 1968; 76: 2266.

Gazzinelli RT, Hieny S, Wynn T, Wolf S, Sher A. IL-12 is required for the T-cell independent induction of IFN- γ by an intracellular parasite and induces resistance in T-deficient hosts. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90: 6115 – 6119.

Glasser L, Delta BG. Congenital toxoplasmosis with placental infection in monozygotic twins. *Pediatrics*. 1965; 35: 276-283.

Hohifeld P, Daffos F, Costa JM et. al. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with polymerase-chain-reaction test on amniotic fluid. *New England J Med*. 1994; 331: 695-699.

Jankû J. Pathogenesis and pathologic anatomy of coloboma of the macula lutea in an eye of normal dimensions and a microphthalmic eye, with parasites in the retina. *Casop Lek Cesk*. 1923; 62:1021-1138.

Kamazoe U. In: Neves DP. *Parasitologia Humana*, 9ª edição, São Paulo: Atheneu, 1995; p. 174-87.

Kotula AW et al. Effects of freezing on effectiveness of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol*. 1991; 46: 11-21.

Levi GC, Hyakutake S, Neto VA, Correa MO. Presence of *Toxoplasma gondii* in the saliva of patients with toxoplasmosis. Eventual importance of such verification concerning the transmission of the disease (preliminary report). *Rev inst Med Trop*. 1968; 10: 54-58.

McLeod R, Remington JS. *Toxoplasma gondii*. In *Tratado de Pediatria*, 2ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 1994; p. 779-786.

McAuley J, Roizen N, Patel D, 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.

Maisonneuve H, Faber C, Piens MA, Garin JP. Toxoplasmose congénitale. *Presse Méd*. 1984; 13: 859-862.

Mayes JT, O'Connor BJ, Avery R, Castellani W, Carey W. Transmission of *Toxoplasma gondii* infection by liver transplantation. *Clin Infect Dis*. 1994; 21: 511-515.

Milatovic D, Braveny I. Enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of toxoplasmosis, *J Ch Pathol*. 1980; 33: 841-844.

Minkoff H, Remington JS, Holman S et al. Vertical transmission of toxoplasma by human immunodeficiency virus-infected women. *Am J Obst Gynecol*. 1997; 176: 555-559.

Naot Y, Desmonts G, Remington JS. IgM enzyme-linked immunosorbent assay test for the diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection. *J of Pediatrics*. 1981; 1: 32-36.

Naspitz CK. Mecanismos de defesa do recém – nascido. In: Farrhat e Kopelman. Infecções perinatais, Rio de Janeiro: Atheneu. 1985; p. 3-8.

Neghme A, Thiermann E, Pino E. Toxoplasmosis humana en Chile. *Bol infect Parasitol*. 195; 27: 6-8.

Neto VA, Cotrim JX, Laus WC. Nota scircumflex obre o encontro de *Toxoplasmosis gondii* en sangue destinado a transfusão. *Rev Inst Méd Trop*. São Paulo, 1963; v. 5, p. 68-69.

Nicolle C, Manceaux L. Sur un protozoaire nouveau du gondii (*Toxoplasma* n.g.). *Arch Inst Parteur Tunis*. 1909; 2: 97-103.

Niel G, Videau D. Activité de la spiramycione in vitro sur *Toxoplasma gondii*. Reunión Inter Discipl Chimioth Antiinfect. 1981; 121: 8.

Norgaard-Pedersen. Prenatal and neonatal screening: status and future Trends. *Scand. J. Infect. Dis*. 1992; p. 7-10.

Patel DV, Holfelds EM, Vogel NP et al. Resolution of intracranial calcifications in infants with treated congenital toxoplasmosis. *Radiology*, Chicago, 1996; 199: 433-440.

Paugam A, Dupouy-Carnet J, Sumuyen MH, Romand S, Lamorill J, Derouin F. Detection of *Toxoplasma gondii* parasitemia by polymerase chain reaction in perorally infected mice. *Parasite*. 1995; 2: 181-184.

Pessoa S, Martins AV. Parasitologia Médica, 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1978; p. 277-300.

Pinon JM, Chemla C, Villena I, Foudrinier F, Aubert D, Puygauthier-Toubas D. et al. A Early neonatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: value of comparative enzyme-linked immunofiltration assay immunological profiles and anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulin M (IgM) or IgA Immunocapture and implications for postnatal therapeutic strategies. *J Clin Microbiol*. 1996; 34: 579-83.

Reed UC. Toxoplasmose congenital. In: Aron Diamant Saul Cypel. *Neurologia infantil*. 3ª ed. São Paulo: Atheneu, Cap. 42, 1996; p. 644-655.

Reyes L, Frenkel JK. Specific and nonspecific mediation of protective immunity to *toxoplasma gondii*. *Infect Immun*. 1987; 55: 856-63.

Remington JS, Macleod R, Desmonts G. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein JO. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. 4^a ed. Philadelphia: W B Saunders Company, 1995; p. 140-263.

Remington JS, Macleod RP, Thulliez, Desmonts G. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein JO. *Infectious Diseases Of The Fetus And Newborn Infant*. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2001; p. 205-2346.

Ruskin J, Remington JS. Toxoplasmosis in the compromised host. *Ann Intern Med*. 1976; 84: 193.

Sabin AB, Feldman HA. Dyes as microchemical indicators of a new immunohity phenomenon affecting a protozoan parasite (toxoplasma). *Science*. 1948; 108: 660-663.

Salvier R. In Diseases of the Kidney and Urinary tract. 7th editiou (October, 2001), Shnyder CC. Toxoplasrose et pathologie oculaire. *Schweiz Med Wochenschr*, Bern, 1995; p. 82-88. Supplementun 65.

Sethi E, Brandis H, Capron A. The immunodominant epitope of the major membrane tachyzoite protein (P30) of toxoplasma gondii. *Parasitolo. Immunol*. p.30; 1986.

Siegel JP, Remington JS. Comparison of methods for quantitating, antigen-specific immunoglobulin VI antibody with a reverse enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol*. 1983; 18: 63-70.

Sheffield HG, Melton ML. Effect of pyrimethamine and sulfadiazine on the fine structure and multiplication of *Toxoplasma gondii* in cell cultures. *J Parasitol*. 1972; 61: 704-712.

Stramba-Badiale M, Nador F, Porta N, Guffanti S, Frediani M, Colnaghi C, Grancini F, Motta G, Carnelli V, Schwartz PJT. interval prolongation and risk of life-threatening arrhythmias during toxoplasmosis prophylaxis with spiramycin m neonates. *Am Heart J*. 1997; 133: 108-111.

Socol VT, Gubert IC, Carzino LC, Massuquetto SC, Socol AC. Prevalência de toxoplasrose em gestantes através da padronização da técnica de Elisa. *Rev. Méd parná*. 2003; 61:15-17.

Smith DD, Frenkel JK. Cockroaches as vectors of *Sarcocystis muris* and of other coccidian in the laboratory. *J Parasitol*. 1978; 64: 315-319.

Splendore A. Um nuovo protozoa parassita del conigli: incontrato nelle lesioni Anatomiche duna malattia Che ricorda in molti punti il Kalazr dell'uomo. *Rev Soc*

Sci. 1908; 3:109.

Stepick-Biek P, Thulliez P, Araujo FG, Remington JS. IgA antibodies for diagnosis of acute congenital and acquired toxoplasmosis. *J Infect Dis.* 1990; 162: 270 – 273.

Tender AM, Heckerth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasit.* 2000, 30: 1217-1258.

Thoumsin H, Senterre J, Lambotte R. Twenty-two years screening for toxoplasmosis in pregnancy: Liege-Belgium. *Scand J Infect Dis*, Estocolmo, 1992; p. 84-85. Supplementun 84.

Van de Vem E, Melchers W, Galama J, Camps W, Meuwissen J. Identification of *Toxoplasma gondii* infections by B1 gene amplification. *Journal of Clinical Microbiology.* 1991; 29: 2120-2124.

Vidigal PVT, Santos DVV, Castro FC, Couto JCF, Vitor RWA, Brasileiro Filho G. Diagnóstico pré-natal da toxoplasmose no líquido amniótico através da técnica de PCR. *Rev Soc Brás Méd Trop.* 2002; p. 35.

Walls KW, Bullock SL, English DK. Lose of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its microadaptaaon for the serodiagnosis of toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 1977; 5: 273-277.

Werblin TP, Kim YT, Quagliata F, Siskind GW. Studies on the control of antibody synthesis. Changes in heterogeneity of ontibody affinity during the course of the immune responsee. *Immunology.* 1973;24: 477- 492.

Wilson CB, Remington JS. What can be done to prevent congenital toxoplasmosis? *Am J Obstet Gynecol.* 1980; 138: 357-363.

Wong SY, Hajdu MP, Ramirez R et al. Role of speifific immunoglobulin E in diagnosis of acute toxoplasma infection and toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*, Chicago. 1993; 319: 2952-2959.

Zuber P, Jacquier P. Epidemiology of toxoplasmosis: woldwide status. *Schweiz Med Wochenschr*, Bern, 1995; 19S – 22S. Supplementun 65.

9. Anexos

PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DAS PACIENTES

1- Nome: _____ 2- Idade: _____

3- Endereço: _____ 4- Fone: _____

5- Paridade: _____ 6- DUM: _____

7- Idade gestacional: _____

8- Punção do Abdome Gravitico

8^a- Cordocentese: volume aspirado _____ / complicação _____

8b- Amniocentese: volume aspirado _____ / complicação _____

9- Resultado:

Sorologia (IgM/IgG) em sangue fetal: _____

Sorologia (IgM/IgG) em líquido amniótico: _____

PCR no liquido amniótico: _____

PCR no sangue fetal: _____

Inoculação em cobaio: _____

Histopatológico do cobaio: _____

Sorologia (IgM/IgG) do cobaio: _____

OBS: O referido instrumento de coleta de dados foi elaborado e é preenchido pelo pesquisador .



Goiânia, 10 de maio de 2006.

Comitê de Ética em Pesquisa da Santa Casa de Misericórdia de Goiânia
PARECER CEP/SCMG Nº001/06

Registro CEP: 001/06

Orientador(a): Profº Dr. Roberto Daher

Pesquisador Responsável: Waldemar Naves do Amaral

Título : "TOXOPLASMOSE E GRAVIDEZ"

Área Temática: Grupo III

Nível: Diagnóstico

Patrocinador: Não se Aplica

Local de Realização: Hospital Materno Infantil, Maternidade Dona Íris, Maternidade Nossa Senhora de Lourdes e Clínica Fértil Diagnósticos.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Santa Casa de Misericórdia de Goiânia, vem por meio deste, informá-lo que o seu Projeto de Pesquisa, titulado "TOXOPLASMOSE E GRAVIDEZ", foi analisado e aprovado por este Comitê em reunião ordinária de acordo com as normas e diretrizes vigentes.

Recomendamos fiel observância aos termos da Resolução nº 196/96, do Conselho Nacional de Saúde, durante toda a pesquisa.

Solicitamos o encaminhamento de relatórios periódicos a este Comitê, informando sobre o desenvolvimento da pesquisa e resultados.

Situação: Projeto Aprovado

Atenciosamente,

Dra. Janeslane Ferreira Maciel
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa / SCMG

Janeslane Ferreira Maciel

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

Rua Campinas nº 1.135 - St. Americano do Brasil - CEP: 74.530-240 - Goiânia - Goiás - Fone: (62) 254-4000
email: comissoes.santacasa@terra.com.br

PROTOCOLO CEPMHA/HC/UFG N° 039/2002

Em, 20/05/2002.

INVESTIGADOR (A) RESPONSÁVEL (IES): *Dra. Mariza Martins Avelino.*

TÍTULO: *"Controle da transmissão vertical da Toxoplasmose".*

Área Temática: *Grupo III.*

Patrocinador:

Número do Estudo do Patrocinador:

Comunicamos- lhe (s) que o **Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal/HC/UFG**, analisou e aprovou o projeto de pesquisa protocolado neste CEPMHA/HC/UFG sob o n° 039/02, bem como o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido** e estes foram considerados em acordo com os princípios éticos vigentes.

[Assinatura]
Prof. Luiz Antonio Zanini
Coordenador do CEPMHA/HC/UFG

'Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal do Hospital das Clínicas da UFG'

CONFERE COM O ORIGINAL
Secretaria de Comissões HC/UFG
Goiânia, 09/02/2006
Ass.: *Carlene R. Ferreira*

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIMENTO

Título: “Diagnóstico da Toxoplasmose Fetal Mediante a Identificação de Anticorpos Específicos no Líquido Amniótico”

Você está sendo convidada a participar da pesquisa intitulada: “Diagnóstico da Toxoplasmose Fetal Mediante a Identificação de Anticorpos Específicos no Líquido Amniótico”, que tem como objetivo avaliar a infecção por toxoplasmose nas gestantes e a possibilidade de transmissão vertical ao bebê, especialmente quanto à orientação de mudança no tratamento, na dependência do resultado fetal.

A pesquisa será realizada pelo Professor Waldemar Naves do Amaral, chefe do departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina/ Universidade Federal de Goiás, sob a orientação do professor Dr. Roberto R. Daher (IPTSP).

Sua colaboração é voluntária, seu nome e as informações sobre sua pessoa não serão revelados. Os resultados da pesquisa serão utilizados exclusivamente para fins científicos.

Caso aceite participar, em qualquer momento você poderá pedir informações ou esclarecimento sobre o andamento do estudo para o pesquisador, no telefone (062) 9971-2943/242-1931. Caso seja de sua vontade retirar-se da pesquisa e não permitir a utilização de seus dados, você poderá fazê-lo e não sofrerá nenhum prejuízo no seu atendimento na instituição.

Este estudo poderá contribuir para a elaboração de novas ações que melhorem o diagnóstico do bebê ainda no útero, o futuro do mesmo e o resultado de melhor qualidade de vida ao recém-nascido e sua mãe.

Você será submetida a procedimentos invasivos (amniocentese e cordocentese) no seu abdome gravídico, e será garantido o sigilo quanto ao seu nome e os seus dados. Existindo riscos (em torno de 1% de complicação), caso você sofra algum dano em decorrência deste estudo, você possui o direito de pleitear indenizações.

Você não terá nenhum gasto por esta participando do presente estudo.

Os resultados liberados pelo IPTSP serão entregues como cópias à gestante ou seu representante legal.

Após ser esclarecida sobre as informações acima, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine no final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é da pesquisadora responsável.

Data: ____/____/____

Prof. Waldemar Naves do Amaral

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO DA PESQUISA

Eu, _____

Abaixo assinado, li e entendi o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, e deste modo concordo em participar da pesquisa, Toxoplasmose e gravidez, como sujeita. Declaro que fui devidamente informada e esclarecida pelo pesquisador Waldemar Naves do Amaral sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção no meu atendimento.

Goiânia, ____ / ____ / ____

Nome da entrevistada _____

Assinatura _____ Data: ____ / ____ / ____

Pesquisador: Waldemar Naves do Amaral. Telefones: (062) 9971-2943 / 242-1931

Endereço: Alameda Coronel Joaquim Basto, Nº 243, Setor Marista, Goiânia-Goiás.

Assinatura _____ Data: ____ / ____ / ____

Testemunhas

Nome: _____ Assinatura: _____

Nome: _____ Assinatura: _____

- **Observações Complementares:**

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)