

JÚLIA GATTI LADEIA COSTA

**DIAGNÓSTICO E QUANTIFICAÇÃO DE *TOXOPLASMA*
GONDII ATRAVÉS DE PCR EM TEMPO REAL EM SANGUE
PERIFÉRICO DE RECÉM-NASCIDOS COM TOXOPLASMOSE
CONGÊNITA NO ESTADO DE MINAS GERAIS**

BELO HORIZONTE, 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG

Instituto de Ciências Biológicas – ICB

Pós-Graduação em Parasitologia

Diagnóstico e quantificação de *Toxoplasma gondii* através de PCR em Tempo Real em sangue periférico de recém-nascidos com toxoplasmose congênita no Estado de Minas Gerais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Protozoologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Wagner de Almeida Vitor

JÚLIA GATTI LADEIA COSTA

BELO HORIZONTE, 2012

COLABORADORES

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - UFMG

Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

Dra. Ana Carolina de Aguiar Vasconcelos Carneiro

Doutorando Daniel Menezes Souza

Graduanda Alice Thomaz Tavares

HOSPITAL DAS CLÍNICAS - UFMG

Dra. Gláucia Manzan Queiroz de Andrade

Dr. Daniel V. Vasconcelos-Santos

NÚCLEO DE AÇÕES E PESQUISA EM APOIO DIAGNÓSTICO (NUPAD) – UFMG

Dr. José Nélio Januário

Trabalho realizado no Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, com o auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

*Dedico a esse trabalho aos meus pais
Wilson Ladeia Costa e Valéria A. Gatti Ladeia Costa*

*"Cada um de nós compõe a sua história.
Cada ser em si carrega o dom de ser capaz de ser feliz"*

Almir Sater

AGRADECIMENTOS

“Só se pode viver perto de outro, e conhecer outra pessoa, sem perigo de ódio, se a gente tem amor. Qualquer amor já é um pouquinho de saúde, um descanso na loucura.”

Guimarães Rosa

Agradeço primeiramente aos meus pais Wilson Ladeira Costa e Valéria A. Gatti Ladeira Costa a quem dedico este trabalho. Muito mais do que me dar a vida, vocês me deram um norte! Obrigada pelo apoio e amor constantes. Pelo carinho de hoje e de sempre. Por serem o meu maior exemplo.

Ao meu irmão e grande amigo Hugo (ou Tilho) que muito me inspira com o seu espírito questionador e que, apesar das nossas diferenças, divide comigo as alegrias e desapontamentos do dia-a-dia, me auxiliando na difícil tarefa de me tornar uma pessoa melhor.

Ao Daniel pelo companheirismo e amor em todos esses anos, pelo apoio nos momentos de dúvidas e inseguranças e, principalmente, pela paciência nos momentos de stress (que não foram poucos!). “Não sei se eu saberia chegar até o final do dia sem você” (Zélia Duncan).

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Wagner de Almeida Vitor por ter me acolhido tão bem no laboratório (há 6 anos atrás), quando eu só sabia que toxoplasmose era a “doença do gato”. É muito bom saber que além de orientador tenho um mestre ao meu lado, que com humildade, carinho e muita paciência se dedica à nossa formação acima de tudo. Obrigada professor! Você é, sem dúvidas, o maior responsável pelo meu amadurecimento acadêmico e um exemplo tanto na vida pessoal quanto profissional. Agradeço também, é claro, por você ter encarado comigo esta aventureira opção de defesa rápida!

À Carol, por me acompanhar em cada um dos passos que dei nesses anos. Por ter me ensinado muito na bancada e na vida! Pelo entusiasmo contagiante que sempre fez ficar pequena a frustração das noites de sexta-feira quando os experimentos não funcionavam. Pela grande amizade, que faz com que nos entendamos apenas com um olhar. Obrigada por ser parte dessa conquista e peça indispensável na minha vida.

À Rosa (Rosálida Estevan Nazar Lopes) muito além do que o apoio técnico, eu agradeço pelo carinho de mãe, pelos exemplos de fé e família, pelos conselhos e ensinamentos, pelo ouvido sempre atento e ombro sempre disposto a acalantar nossas angústias!

Aos demais colegas de laboratório: Lê, Sexy (sempre tão companheiro), Menino Breno (Amizade é amizade!), Milena, Renata, Mari, Matheus, Carlão, Alice e Luiz pela amizade e descontração diárias, por serem uma espécie de uma segunda família. Sem vocês nada disso seria tão divertido! E também à Alice pelo grande apoio na realização deste trabalho.

À minha inesquecível Turma do Pepino que num espaço tão curto de tempo passou a ocupar um lugar tão grande no meu coração. Obrigada a cada um de vocês pelos momentos mágicos e trágicos que passamos juntos! Em especial a Bruninha por ser o meu potinho ouro no final do arco-íris e dividir comigo simplesmente tudo durante esse mestrado. E ao João, que está ao meu lado desde a graduação, obrigada pelas conversas, amizade, estudos e por ser uma pessoa tão solícita sempre.

Aos amigos da Biologia em especial a Aninha e Dri por serem amigas tão atenciosas, por compartilharem alegrias e por permanecerem ao meu lado mesmo após o final do curso! E às Lulys (Babá, Nanda, Nina, Lelê e Pri) por serem parte da minha história, por crescerem comigo e por estarem presentes eternamente em minha vida.

À minha grande, divertida e ouriçada família: avós, tios, primos (que são como irmãos), cunhadas lindas, irmã de consideração (Gaby) por serem meu porto seguro, meu momento de descanso, meus companheiros de jornada! “O amor de Cristo nos uniu como pérolas em cordão de esperança” (Pedro de Camargo).

À Faculdade de Medicina, Hospital das Clínicas, e Núcleo de Ações e Pesquisas em Apoio Diagnóstico (NUPAD) e a toda a equipe médica colaboradora deste projeto, na pessoa da Dr. Gláucia Manzan Queiroz de Andrade, pelo extenso e cuidadoso trabalho desenvolvido, o qual foi a base para o desenvolvimento do presente estudo.

Ao Professor Dr. Ricardo Toshio Fujiwara por prontamente aceitar colaborar com este projeto e disponibilizar parte dos recursos necessários à execução do mesmo, além do entusiasmo com os resultados.

Ao doutorando Daniel Menezes-Souza por pacientemente me orientar nas questões teóricas e práticas da qPCR, além de me acompanhar durante a realização dos experimentos.

Às secretárias da pós-graduação de parasitologia, Sumara e Sibele, pelo apoio, carinho e atenção dedicados não só a mim como a todos os alunos.

Aos professores do Departamento de Parasitologia, em especial ao Prof. Alan Lane de Melo, que nos proporcionou a experiência indescritível de cursar a disciplina que nos deu as lições mais importantes do mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, na pessoa da Dra. Érika Martins Braga, pela grande oportunidade de realizar este trabalho e pelo apoio financeiro na divulgação dos resultados em Congressos.

Às crianças e suas mães que aceitaram participar deste trabalho. Agradeço com todo carinho.

Sobretudo agradeço a Deus pelo dom da vida, pelas oportunidades diárias de crescimento e pelas bênçãos e intuições sempre constantes nesta jornada.

SUMÁRIO

Resumo	xii
Abstract.....	xiv
Lista de Tabelas	xv
Lista de Figuras	xvi
Lista de Fluxogramas	xviii
Lista de Abreviaturas e Siglas	xix
1. Introdução.....	1
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i> : biologia e transmissão.....	1
1.2. Toxoplasmose congênita (TC).....	6
1.2.1. Infecção e sinais clínicos.....	6
1.2.2. Prevenção e prevalência	9
1.2.3. Diagnóstico da Toxoplasmose Congênita.....	13
1.3. Quantificação da carga parasitária	19
2. Justificativa.....	22
3. Objetivos	23
3.1. Objetivo Geral.....	23
3.2. Objetivos específicos	23
4. Materiais e Métodos	24
4.1. Pacientes	24
4.2. Coleta de Sangue e Extração de DNA	27
4.3. Verificação da presença de inibidores de PCR.....	27
4.4. Identificação e quantificação de <i>Toxoplasma gondii</i> através de qPCR do alvo rep529	28
4.4.1. Obtenção de DNA de <i>T. gondii</i> e curva-padrão	28
4.4.2. PCR em tempo real	30
4.5. Análise dos resultados	32
5. Resultados.....	35
5.1. Extração de DNA e presença de inibidores	35
5.2. Curva-padrão e eficiência dos iniciadores da qPCR.....	35
5.3. Número de cópias da sequência alvo (rep529) em cepas recombinantes de <i>T. gondii</i>	36

5.4. PCR em tempo real	36
5.4.1. Resultados qualitativos da qPCR-rep529 em sangue de crianças com suspeita de toxoplasmose congênita.....	40
5.4.2. Resultados quantitativos da qPCR-rep529 em sangue de crianças com suspeita de toxoplasmose congênita confirmada	47
6. Discussão	52
6.1. Análise qualitativa em amostras de sangue de recém-nascidos pela qPCR-rep529	55
6.2. Análise quantitativa pela qPCR-rep529 em amostras de sangue de recém-nascidos com toxoplasmose congênita	65
7. Conclusões.....	71
8. Referências Bibliográficas.....	72
9. Anexos	81
9.1. Parecer COEP-UFMG nº 0298/06	81
9.2. CONSENTIMENTO PARA PARTICIPAR NA PESQUISA CLÍNICA: “Triagem neonatal para Toxoplasmose Congênita no Estado de Minas Gerais”	82

RESUMO

A transmissão congênita do *Toxoplasma gondii* em humanos tem sido associada à ocorrência de abortos, natimortos e mortalidade neonatal. Recém-nascidos infectados podem apresentar hidrocefalia, retinocoroidite, calcificações cerebrais e retardo mental ou perturbações neurológicas. A maioria das crianças infectadas que nascem sem sintomatologia aparente, quando não tratadas, podem desenvolver lesões oculares tardias. As estratégias de diagnóstico (sorológico ou parasitológico) comumente utilizadas possuem limitações que dificultam e/ou atrasam o diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita, essencial para o início do tratamento e conseqüente melhora no prognóstico da doença. Esse trabalho tem por objetivo identificar a presença do *T. gondii* no DNA extraído do sangue periférico de recém-nascidos infectados. A técnica de qPCR, utilizando uma sequência repetitiva do genoma do parasito (rep529) foi testada como uma alternativa para o diagnóstico rápido da toxoplasmose congênita. O resultado de 183/220 (83,2%) amostras foi considerado pela ausência de inibidores de PCR ou produtos inespecíficos. Em 84/183 (45,9%) das amostras a presença do parasito foi confirmada pela amplificação do alvo rep529. A técnica de qPCR-rep529 obteve boa reprodutibilidade (82,86%). Doze amostras (6,5%) com diagnóstico molecular positivo foram negativos para a pesquisa de IgG após 12 meses de vida. Não foi observada associação entre a qPCR-rep529 e a presença de calcificações cerebrais, entretanto, em relação à presença de lesão ocular, a diferença foi significativa ($p = 0,013$). O risco relativo (RR) de uma criança ter toxoplasmose ocular, dado que a qPCR foi positiva, é 1,8 vezes maior do que em uma criança, previamente triada como positiva, onde a qPCR foi negativa. Considerando os tipos de lesão foi demonstrado que as crianças com retinocoroidite ativa possuem RR de 2,3 ($p = 0,009$) e as com retinocoroidite cicatrizada de 1,9 ($p = 0,034$). Através da quantificação do número de parasitos presentes no sangue periférico dos recém-nascidos foi avaliada uma possível associação entre a carga parasitária e a idade das crianças ou os principais sinais clínicos apresentados pelas crianças infectadas: calcificações cerebrais e retinocoroidite. A carga parasitária encontrada nas crianças foi pequena, 68% das amostras positivas apresentavam o número estimado de parasitos menor que 0,5 taquizoítos/mL de sangue periférico. As crianças possuíam em média 58 meses de vida e não foi observada associação significativa entre a idade das crianças e a carga parasitária. Da mesma forma não foi observada associação entre a presença de calcificações cerebrais ou a presença de

retinocoroidite e a carga parasitária. Foi observada uma variação intraespecífica no número de cópias do alvo rep529 em oito cepas de genótipo recombinante e fenótipo virulento para camundongos isoladas recentemente de casos congênitos.

Palavras-chave: Toxoplasmose congênita, *Toxoplasma gondii*, diagnóstico molecular, PCR em tempo real, retinocoroidite.

ABSTRACT

Congenital toxoplasmosis has been associated with the occurrence of abortion, stillbirths and neonatal mortality. Infected newborns may have hydrocephalus, retinochoroiditis, cerebral calcifications and mental retardation or neurological disorders. Most infected children who are born asymptomatic, but without specific treatment, may develop late ocular lesions. Strategies for diagnosis (serological or parasitological) have limitations that difficult and/or delay the diagnosis of congenital toxoplasmosis that is essential for the early beginning of treatment and improvement in disease outcomes. This study aims to identify the presence of *Toxoplasma gondii* in DNA extracted from newborns peripheral blood. The qPCR technique, using a repetitive sequence of the parasite genome (rep529), was tested as an alternative tool for congenital toxoplasmosis fast diagnosis. Results of 183/220 (83,2%) samples was considered. Results of 37/220 (16,8%) were not available because they have PCR inhibitors or nonspecific products. In 84/183 (45.9%) samples the parasite presence was confirmed by amplification of the target rep529. The qPCR-rep529 has good reproducibility (82.86%). Twelve samples (6.5%) had positive molecular diagnosis despite absence of IgG after 12 months of life. There was no association between qPCR-rep529 and presence of cerebral calcifications, however, regarding the presence of ocular injury, the difference was significant ($p = 0.013$), with a relative risk (RR) of 1.8. Considering types of ocular lesion, it was demonstrated, that children with active retinochoroiditis have RR of 2.3 ($p = 0.009$) and those with healed retinochoroiditis have RR of 1.9 ($p = 0.034$). Quantification of peripheral blood parasites from infected newborns was done through qPCR-rep529. Children has small parasite load, 68% of positive samples has less than 0.5 tachyzoite parasites / ml of peripheral blood. The mean age of children were 58 months of life, however, time of life was not associated with parasite load. It was not possible to associate parasite load to the presence of cerebral calcifications or retinochoroiditis. There was intraspecific variation in the number of copies of the target rep529 when eight recombinant strains of *T. gondii* isolated from humans were analyzed.

Key words: Congenital toxoplasmosis, *Toxoplasma gondii*, molecular diagnosis, Real-time PCR, retinochoroiditis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Prevalência de toxoplasmose congênita em diferentes localidades do Brasil.	12
Tabela 2: Avaliação da sensibilidade, especificidade e índice <i>Kappa</i> da qPCR-rep529 utilizando como teste referência a persistência de IgG anti – <i>T. gondii</i> após o 12º mês de vida.	41
Tabela 3: Avaliação da sensibilidade, especificidade e índice <i>Kappa</i> da qPCR-rep529 utilizando como teste referência o isolamento de <i>T. gondii</i> por bioensaio em camundongos.	41
Tabela 4: Associação entre o resultado da qPCR-rep529 e a presença ou ausência de calcificações cerebrais dentre as 150 crianças com persistência de IgG anti- <i>T. gondii</i> após 12 meses de vida (p= 0,123).	43
Tabela 5: Associação entre o resultado da qPCR-rep529 e a presença ou ausência de lesão oftalmológica dentre as 150 crianças com persistência de IgG anti- <i>T. gondii</i> após 12 meses de vida (p= 0,013).	44
Tabela 6: Associação entre o resultado da qPCR-rep529 e o tipo de lesão oftalmológica dentre as 150 crianças com persistência de IgG anti- <i>T. gondii</i> após 12 meses de vida (p= 0,021).	45
Tabela 7: Risco relativo para sinais clínicos em crianças com toxoplasmose congênita em relação aos resultados da qPCR-rep529.	47

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Gráfico da equação de reta da curva-padrão para a quantificação relativa da parasitemia nas amostras de DNA extraída de sangue periférico dos recém-nascidos pela qPCR-rep529, realizada através da diluição seriada da amostra de DNA extraído de taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* em sangue periférico de um doador negativo para toxoplasmose. 36
- Figura 2: Curvas de dissociação representativas dos *amplicons* gerados na qPCR-rep529 de *T. gondii* em sangue periférico de crianças com toxoplasmose congênita. No eixo x está representada a temperatura de dissociação do *amplicon* e no eixo Y a derivada do valor de emissão de fluorescência. (a) Curva de dissociação referente ao produto obtido na curva padrão com DNA da cepa RH (verde), DNA do recém-nascido n° 1015 (azul) e do n° 1025 (vermelho). (b) Curva de dissociação referente ao produto obtido na curva padrão com DNA da cepa RH (verde), DNA do recém-nascido n° 1018 (vermelho) e do n° 1036 (amarelo). 38
- Figura 3: Produto da qPCR-rep529 em amostras de DNA de sangue periférico dos 32 recém-nascidos que apresentaram picos duplos ou pouco característicos na análise da curva de dissociação. RH: Controle positivo com DNA da cepa RH de *T. gondii* utilizado na curva padrão. PM: Padrão de peso molecular (Promega, Madison, WI, USA) 100pb. 39
- Figura 4: Positividade da qPCR-rep529 em crianças com e sem calcificações cerebrais. O número acima das barras significa a porcentagem das crianças com resultado molecular positivo dentre aquelas sem calcificações cerebrais (SCC) ou com calcificações cerebrais (CC). 43
- Figura 5: Positividade da qPCR-rep529 em crianças com e sem retinocoroidite. O número acima das barras significa a porcentagem das crianças com resultado molecular positivo dentre aquelas sem lesões oftalmológicas (SL) ou com retinocoroidite, independente do tipo de lesão oftalmológica (RA + RAC + RC). * Diferença significativa, $p = 0,013$ 44
- Figura 6: Positividade da qPCR-rep529 em crianças com diferentes manifestações de retinocoroidite. O número acima das barras significa a porcentagem das crianças com resultado molecular positivo dentre o grupo sem lesões oftalmológicas (SL) e com lesões oftalmológicas ativas (RA), ativas e cicatrizadas (RAC) e apenas cicatrizadas (RC). * Diferença significativa, $p = 0,034$. ** Diferença significativa, $p = 0,009$ 46
- Figura 7: Histograma de frequência de distribuição da carga parasitária de *T. gondii* estimada pela qPCR-rep529 nas amostras de DNA de sangue periférico de 71 crianças. 49

Figura 8: Comparação da carga parasitária no sangue periférico dentre as crianças que não apresentam calcificações cerebrais (SCC) e as que possuem calcificações cerebrais (CC).	50
Figura 9: Comparação da carga parasitária no sangue periférico dentre as crianças que não apresentam lesões oftalmológicas (SL) e as que possuem lesões oftalmológicas independente do tipo (RA + RAC + RC).	50
Figura 10: Comparação da carga parasitária no sangue periférico dentre as crianças que não apresentam lesões oftalmológicas (SL) e as que possuem lesões oftalmológicas ativas (RA) ativas e cicatrizadas (RAC) e cicatrizadas (RC).	50

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1: Identificação das 180 crianças infectadas com toxoplasmose congênita (TCC) e 40 crianças com toxoplasmose congênita descartada (TCD) participantes deste estudo.....	26
Fluxograma 2: Amostras selecionadas para análise e distribuição das crianças submetidas às avaliações clínicas: oftalmológica e calcificações cerebrais. Retinocoroidite ativa (grupo RA), cicatrizada (grupo RC), ativa e cicatrizada simultaneamente (grupo RAC), sem lesões oculares (grupo SL), calcificações cerebrais (grupo CC), sem calcificações cerebrais (grupo SCC).....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CC	Calcificações Cerebrais
cnPCR	PCR convencional
C _T	“Threshold Cycle”
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetraacético
GBTC	Grupo Brasileiro de Toxoplasmose Congênita
nPCR	Nested PCR
pb	Pares de base
PBS	“Phosphate Buffered Saline”
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PEATE	Potencial Evocado Auditivo do Tronco Encefálico
qPCR	PCR quantitativa
RA	Retinocoroidite Ativa
RC	Retinocoroidite Cicatrizada
RAC	Retinocoroidite Ativa e Cicatrizada
rep529	Elemento repetitivo do genoma de <i>T. gondii</i> de 529pb
SAG1	Antígeno de Superfície 1
SL	Sem Lesão Oftalmológica
SCC	Sem Calcificações Cerebrais
TC	Toxoplasmose Congênita
TCC	Toxoplasmose congênita Confirmada
TCD	Toxoplasmose Congênita Descartada
TgCTBr	<i>Toxoplasma gondii</i> Congenital Toxoplasmosis from Brasil
T _m	Temperatura Média de dissociação

1. INTRODUÇÃO

1.1. *TOXOPLASMA GONDII*: BIOLOGIA E TRANSMISSÃO

Toxoplasma gondii foi identificado pela primeira vez em 1908 simultaneamente por Nicolle e Manceaux, em roedores no norte da África, e por Splendore em coelhos no Brasil. A descoberta da participação dos felídeos como hospedeiros definitivos no ciclo do *T. gondii* é recente na história da toxoplasmose, eles foram identificados por diversos grupos na década de 70 (Kim e Weiss, 2008). Atualmente, o *T. gondii* é classificado como pertencente ao Filo Apicomplexa, Classe Conoidasida, Subclasse Coccidia, Ordem Eucoccidii, e à Sub-família Toxoplasmatinae (Levine 1998). O gênero *Toxoplasma* possui apenas um membro, o *T. gondii*.

Os parasitos dessa espécie são intracelulares obrigatórios e se encontram amplamente distribuídos em diversas regiões mundiais. *T. gondii* é capaz de infectar um enorme espectro de hospedeiros intermediários como, por exemplo, mamíferos (inclusive aquáticos como os golfinhos), aves e o homem. Estima-se que um terço da população mundial esteja exposta ao parasito (Tenter *et al.*, 2000). Nos humanos, a soroprevalência aumenta com a idade, não varia muito entre os sexos, é menor em regiões frias, muito áridas e quentes ou em altitudes elevadas. De maneira geral, pode-se dizer que essa prevalência varia conforme a região geográfica, grupo étnico, hábitos da população e também condições socioeconômicas (Montoya & Liesenfeld, 2004).

T. gondii foi considerado por muito tempo um organismo de estrutura genética populacional clonal (Howe & Sibley, 1995). Apesar de ser um protozoário parasito com um ciclo sexual bem definido, esse modo de propagação parece ocorrer raramente na natureza. Na Europa e América do Norte a maioria dos isolados tanto de humanos como

de animais domésticos pertencem às três linhagens clonais denominadas tipo I, II e III, sendo que as cepas com genótipo tipo II estão mais relacionadas às infecções congênitas. Estudos sobre os polimorfismos genéticos e caracterização genotípica em diferentes isolados de *T. gondii* demonstraram a existência de uma maioria de genótipos recombinantes circulando na América do Sul, que por consequência possuem diferentes fenótipos como a elevada diversidade de virulência para camundongos (Ferreira *et al.*, 2006).

Classicamente, cepas tipo I são associadas ao fenótipo virulento em camundongos, causando alta parasitemia, aumento do risco de transmissão transplacentária e gravidade de infecção fetal. Em contrapartida, as cepas tipo II e III são consideradas avirulentas levando à infecção crônica e produção de cistos teciduais em camundongos (Howe & Sibley, 1995).

O ciclo do *T. gondii* é considerado heteroxênico facultativo, pois pode ser mantido apenas com a participação dos hospedeiros intermediários através de expansões clonais do parasito proveniente da ingestão de cistos teciduais de outro hospedeiro intermediário infectado (Tenter *et al.*, 2000).

Após a ingestão de oocistos ou cistos teciduais pelos hospedeiros intermediários, tanto esporozoítos como bradizoítos são liberados respectivamente no tubo digestivo, invadem os enterócitos, se diferenciando em taquizoítos e iniciando, dessa forma, o parasitismo.

A invasão celular é um processo ativo e dirigido pelo parasito que ocorre com a descarga sequencial de proteínas contidas no interior das organelas que formam o complexo apical e resulta num elaborado motor de actina e miosina. Essa maquinaria especializada de invasão fornece ao parasito a capacidade de atravessar barreiras como a

hematocefálica e a placentária. As proteínas secretadas pelas micronemas (MIC) estão envolvidas na adesão inicial e são seguidas pela secreção das proteínas das roptrias (RON e ROP) e dos grânulos densos (GRA), respectivamente. O resultado é a formação de um vacúolo não fusogênico também denominado vacúolo parasitóforo. As proteínas das roptrias assim como dos grânulos densos são responsáveis por tornar o microambiente do vacúolo parasitóforo adequado ao crescimento do parasito modulando uma grande variedade de processos da célula hospedeira (Blader & Saeij, 2009).

Nos últimos cinco anos diversos estudos foram feitos identificando polimorfismos nas proteínas pertencentes às essas famílias, especialmente *ROP5*, *ROP16*, *ROP18* e *GRA15*, e sua associação com a virulência do *T. gondii*. Tem sido demonstrado, em modelo animal, que proteínas de linhagens do parasito pertencentes a tipos genéticos distintos I, II ou III possuem diferentes capacidades de modularem pontos importantes nas vias pró-inflamatórias da célula hospedeira (Melo *et al.*, 2011).

Quando uma célula está repleta de parasitos ocorre um stress osmótico com aumento de tensão na membrana da célula hospedeira que funcionam como sinais para a saída do parasito. Já foi demonstrado também que quando ocorre um reconhecimento da célula parasitada por células do sistema imune como as células NK, a lesão de membrana gerada pela ação das perforinas promove um efluxo de K^+ . Esse efluxo é um sinal para secreção de proteínas formadoras de poros (TgPLP1) pelos parasitos. Ao formarem poros na bicamada lipídica das células hospedeira, essas proteínas geram maior permeabilização da membrana facilitando a saída rápida do parasito. O processo de saída, da mesma maneira que o de invasão é ativo e envolve o motor de actina e miosina formado pelas organelas do complexo apical (Kafsack *et al.*, 2009; Roiko & Caruthers, 2009).

Os taquizoítos se multiplicam rápida e assexuadamente, através de endodiogenia, e pelos processos descritos de invasão e evasão se disseminam sistemicamente através da via hematogênica, infectando leucócitos sanguíneos, e em seguida atingem diferentes tecidos. Essa disseminação perdura até que se estabeleça uma resposta imune adequada. Essa pressão imunológica induz a diferenciação dos taquizoítos em bradizoítos, que também se multiplicam por endodiogenia, porém muito lentamente no interior de cistos teciduais caracterizando o início da fase crônica (Kravetz & Federman, 2005; Hill *et al.*, 2005).

Embora os cistos teciduais possam se desenvolver em órgãos viscerais como pulmão, fígado e rins, eles são mais prevalentes nos tecidos muscular e nervoso, incluindo cérebro, retina, músculo cardíaco e esquelético. Cistos intactos não causam nenhum dano ao hospedeiro e podem persistir por toda a vida deste. O mecanismo dessa permanência indefinida ainda não é muito bem compreendido, entretanto, alguns pesquisadores acreditam que periodicamente alguns cistos se rompem liberando os bradizoítos do seu interior que se transformam em taquizoítos, invadindo novas células e formando assim novos cistos (Tenter *et al.*, 2000; Montoya & Liesenfeld, 2004; Hill *et al.*, 2005). Além disso, hoje já são conhecidos alguns mecanismos anti-apoptóticos mediados pelo parasito na célula infectada garantindo maior sobrevivência deste no interior dos cistos (Lalibert & Carruthers, 2008). Em alguns casos como, por exemplo, na supressão do sistema imune do hospedeiro, os cistos se tornam reservatórios para a reativação da toxoplasmose e o desenvolvimento de infecções locais ou até mesmo infecções disseminadas, inclusive com risco de transmissão congênita no caso de gestantes (Andrade *et al.*, 2010).

Quando os hospedeiros definitivos, membros da família Felidae, ingerem cistos teciduais (ou até mesmo oocistos), ocorre não apenas a multiplicação assexuada em seus

tecidos epitélio intestinal, mas também a reprodução sexuada no epitélio intestinal através da gamogonia resultando na produção de oocistos não esporulados. Em seguida, a membrana da célula epitelial parasitada se rompe liberando o oocisto no lúmen intestinal e conseqüentemente nas fezes. No meio externo ocorre a esporogonia e o oocisto torna-se infectante contendo dois esporocistos cada um com quatro esporozoítos em seu interior (Tenter *et al.*, 2000; Hill *et al.*, 2005).

Classicamente, o consumo de carne crua ou mal cozida tem sido descrito como maior fator de risco para a toxoplasmose (Bonametti *et al.*, 1997; El-Nawawi *et al.*, 2008). Entretanto, além dos bradizoítos presentes nos cistos teciduais, tanto os esporozoítos como os taquizoítos também são infectantes. Os oocistos eliminados em grandes quantidades pelos felídeos são responsáveis pela contaminação do solo e cursos d'água. Sendo assim, a ingestão acidental de oocistos presentes no solo ou água não tratada são corriqueiramente identificados na literatura como fatores de risco significativos (Tenter *et al.*, 2000; Cenci-Goga *et al.*, 2011). Os taquizoítos não possuem grande importância nas infecções adquiridas, uma vez que a parasitemia geralmente ocorre por um curto período de tempo após a infecção primária (Tenter *et al.*, 2000), porém, eles são capazes de atravessar a placenta estando assim envolvidos na transmissão vertical ou congênita da toxoplasmose.

A infecção primária pelo *T. gondii* em adultos (incluindo gestantes) e crianças é assintomática na maioria dos pacientes. Ocasionalmente, podem aparecer sintomas inespecíficos e autolimitantes, que raramente requerem tratamento, sendo que a linfadenopatia é a manifestação clínica mais comum nesses casos. A retinocoroidite é a lesão mais frequente da toxoplasmose. Essa forma ocular é tradicionalmente associada a uma manifestação tardia de uma infecção congênita ou reativação desta. Porém, cada vez mais surgem evidências que corroboram para a associação da toxoplasmose ocular à

fase aguda em casos adquiridos (Montoya & Liesenfeld, 2004; Commodaro *et al.*, 2009).

Em pacientes imunossuprimidos, a doença quase sempre é decorrente de uma reativação da infecção crônica latente. O quadro clínico desses pacientes se apresenta com comprometimento principalmente do Sistema Nervoso Central, com encefalite de graus variados. Casos graves podem causar toxoplasmose generalizada (Weiss & Dubey, 2009).

A toxoplasmose congênita (TC) é uma das formas mais graves da doença com um vasto espectro de manifestações clínicas como visto a seguir.

1.2. TOXOPLASMOSE CONGÊNITA (TC)

1.2.1. INFECÇÃO E SINAIS CLÍNICOS

A transmissão transplacentária por taquizoítos tem sido responsabilizada pela ocorrência de abortos, natimortos, debilidade e mortalidade neonatal, tanto no homem como em outros animais. Infecções anteriores à gestação oferecem um risco muito pequeno para o feto, caso ocorram no mínimo três meses antes da concepção (Montoya & Liesenfeld, 2004). Alguns estudos de caso foram relatados atribuindo a transmissão congênita a uma reativação da infecção materna, assim como a reinfeção da gestante por cepas de diferentes genótipos, porém estes são achados bastante raros (Rorman *et al.*, 2006; Elbez-Rubinstein *et al.*, 2009; Andrade *et al.*, 2010).

Nem todas as infecções maternas agudas por *T. gondii* são transmitidas ao feto e o risco de transmissão congênita aumenta conforme o período da gestação da seguinte maneira:

10-15% durante o primeiro semestre de gestação, 30% no segundo e 60% no terceiro (Montoya & Liesenfeld, 2004).

A gravidade das manifestações no feto, por sua vez, é inversamente proporcional à idade gestacional. Casos clínicos mais graves ocorrem quando gestantes se infectam em idades gestacionais prematuras, apesar do menor risco de transmissão ocorrer nesta situação (Montoya & Liesenfeld, 2004; Mcleod *et al.*, 2009). Entre a 24^a e 30^a semana de gestação, o risco de transmissão é bastante elevado, porém apenas cerca de 10% das crianças nascem com sintomas clínicos detectáveis (Pinard *et al.*, 2003).

O conjunto de sinais mais comuns encontrados em crianças com toxoplasmose congênita é conhecido por tétrede de Sabin e consiste em: hidrocefalia, com macro ou microcefalia, retinocoroidite, calcificações cerebrais e retardo mental ou perturbações neurológicas.

Dentre estas, a retinocoroidite é a manifestação mais prevalente. Essa manifestação ocular é descrita como lesões pigmentadas com uma área central necrótica afetando primeiramente a retina e a coróide subjacente e pode ser observada por exame de fundoscopia. Pode ocorrer envolvimento variável dos vasos sanguíneos da retina, do vítreo, nervo óptico e segmento anterior do olho (Vasconcelos-Santos *et al.*, 2009). A inflamação ativa típica dura em torno de seis semanas, momento no qual as lesões começam a regredir permanecendo no local uma cicatriz pigmentada característica. Na ausência de tratamento podem ocorrer complicações como glaucoma, hemorragia ou descolamento da retina e atrofia do nervo óptico, podendo levar à perda da visão ou cegueira funcional (Delair *et al.*, 2011).

Observam-se com frequência lesões oftalmológicas cicatrizadas em grande parte das crianças afetadas pela via congênita. Entretanto, devido à imaturidade imunológica

fetal, é possível que o tempo de transformação do taquizoíta para bradizoíta seja mais longo nestes do que nos adultos imunocompetentes, ou que os períodos de reativação sejam mais frequentes (Guglietta *et al.*, 2007; Cortina-Borja *et al.*, 2010).

A infecção intrauterina pelo *T. gondii* pode afetar o sistema nervoso do feto de maneira multifocal, com necrose difusa do parênquima, e envolvimento do cérebro, cerebelo, tronco cerebral e cordão espinhal. As áreas de necrose tendem a formar calcificações intracranianas típicas da toxoplasmose congênita, provavelmente devido ao número insuficiente de fagócitos para remover os debris resultantes. A forma e localização das calcificações podem variar de acordo com o tempo de infecção (Lago *et al.*, 2007).

Além destes sinais clássicos, dois estudos recentes realizados em Minas Gerais mostraram que crianças com TC podem apresentar déficit auditivo associado à doença (Andrade *et al.*, 2008; Resende *et al.*, 2010). Porém, esse é um assunto controverso na literatura. Em revisão sistemática recente, Brown e colaboradores (2009) concluíram que a prevalência de déficit auditivo em crianças com toxoplasmose congênita não é bem estabelecida pela escassez de estudos bem conduzidos objetivando identificar essa prevalência e estabelecer a associação com a infecção congênita. A prevalência encontrada nos estudos avaliados pelo grupo variou de 0 a 26%, o que não parece ser evidência significativa desta associação.

Menos frequentemente, a toxoplasmose congênita pode se apresentar com sinais generalizados como hepato e esplenomegalia, miocardite e icterícia (Kompalic-Cristo *et al.*, 2005).

Há bastante tempo se discute as consequências a longo prazo da infecção congênita. Sabe-se que embora cerca de 95% das crianças com infecção congênita não apresentam sintomas de doença disseminada ao nascimento, a maioria delas (82%), quando não

recebem tratamento desenvolvem retinocoroidite tardia até a adolescência (Mcleod *et al.*, 2009). Novas lesões ou recorrências podem ocorrer de maneira imprevisível mesmo muito tempo após o nascimento (Peyron *et al.*, 2011). Porém, foi observado que o risco de lesão ocular diminui com o passar do tempo caso nenhuma lesão tenha sido notada no período da infância (Freeman *et al.*, 2008).

Os fatores relacionados à variabilidade de sintomas clínicos no bebê ainda permanecem por serem avaliados. Presumivelmente, as manifestações iniciais ao nascimento são fortemente influenciadas pelo tempo de gestação no momento da infecção, mas também envolvem o estado imune e a genética do hospedeiro, como a presença do gene HLA-DQ3 (Mcleod *et al.*, 2009). Podemos citar ainda a virulência do parasito envolvido em cada caso congênito bem como a carga tecidual parasitária (Weiss & Dubey, 2009; Higa *et al.*, 2010).

Já se sabe que na América do Sul os recém-nascidos com toxoplasmose congênita apresentam retinocoroidite mais frequentemente e sob formas mais graves (múltiplas lesões, lesões mais extensas, e que comumente afetam o polo posterior gerando prejuízo na acuidade visual) quando comparadas às crianças infectadas da América do Norte e Europa (Gilbert *et al.*, 2008; Vasconcelos-Santos & Queiroz Andrade, 2011). Retinocoroidite consistente com infecção congênita foi encontrada em 79,8% (142) dos recém-nascidos com TC confirmada em Minas Gerais, sendo bilateral em 63,5% (113) dos casos (Vasconcelos-Santos *et al.*, 2009).

1.2.2. PREVENÇÃO E PREVALÊNCIA

A prevenção da toxoplasmose congênita pode ser classificada em três categorias: prevenção primária, secundária e terciária. A prevenção primária se baseia em programas de educação em saúde pública com orientações sobre medidas preventivas

ressaltando os fatores de risco para a toxoplasmose durante a gestação. A secundária, na triagem pré-natal, promovendo o diagnóstico da toxoplasmose em gestantes, seguido de tratamento específico daquelas em fase aguda. Por fim, a prevenção terciária é baseada na triagem neonatal diagnosticando e tratando o recém-nascido infectado (Elsheikha 2008).

A maioria dos autores concorda com a necessidade de realização de uma triagem, visto que o diagnóstico clínico tanto da mãe quanto do bebê é muito difícil de ser realizado e a prevalência e morbidade da doença são elevadas. Entretanto a opção por uma estratégia de triagem pré-natal ou neonatal ainda é controversa. Sendo assim, as estratégias de prevenção à toxoplasmose congênita adotadas pelo sistema público de saúde não são uniformes. Observam-se variações entre os países e mesmo dentro de um mesmo país (Petersen 2007; Mcleod *et al.*, 2009).

Em relação à triagem pré-natal, o tratamento da mãe/feto durante a gestação é controverso. Além de possuir efeitos colaterais, a janela de ação dos medicamentos é curta, pois somente os taquizoítos são sensíveis. Sendo assim, para um tratamento eficaz, é de suma importância identificar a soroconversão e iniciá-lo até 3-4 semanas após a infecção da gestante. Esta é uma difícil tarefa mesmo quando são realizados exames sorológicos mensais. Além disso, o tratamento materno, independente do esquema terapêutico adotado, parece não impedir efetivamente a transmissão do parasito ao feto, nem reduzir a incidência de retinocoroidite. Entretanto, o risco de sequelas neurológicas graves é menor nas crianças que receberam tratamento ainda na vida intrauterina (Kravetz & Federman, 2005; Gilbert *et al.*, 2008; Cortina-Borja *et al.*, 2010; Peyron *et al.*, 2011). A maioria dos estudos realizados sobre o uso de espiramicina em gestantes com toxoplasmose aguda, tentando identificar uma

diminuição da transmissão transplacentária são retrospectivos e existem poucos ensaios clínicos randomizados para determinar a eficácia do tratamento (Kaye, 2011).

Por sua vez, a triagem neonatal também possui limitações. O screenig de IgM em recém-nascidos favorece a detecção de crianças infectadas na segunda metade da gestação, podendo ser falso negativo para crianças infectadas na primeira metade, justamente as com maior risco de sequelas graves (Gilbert *et al.*, 2007). Além disso, existe pouca ou nenhuma evidência que o tratamento pós-natal funcionaria efetivamente nos locais com predomínio de cepas de *T. gondii* do tipo II, que causam quadro clínico menos importante. Entretanto, na América do Sul, onde predominam cepas mais virulentas (recombinantes I-III) e os casos de TC são mais graves, recomenda-se continuar a fazer a triagem neonatal e tratar os recém-nascidos (Andrade *et al.*, 2008).

As estratégias de prevenção variam de acordo com a realidade local sendo que normalmente os países com alta incidência da toxoplasmose têm implementado a triagem pré-natal, enquanto países com baixa prevalência adotam triagem neonatal além das práticas educativas (Carellos *et al.*, 2008).

A prevalência da toxoplasmose congênita em neonatos varia bastante de acordo com as técnicas de diagnóstico utilizadas, local do estudo, tipo de amostra e principalmente pela estratégia de triagem realizada na população (Stagni *et al.*, 2009). No Brasil, estudos relatam desde uma prevalência de seis bebês infectados para cada 1000 nascidos vivos até 0,3 por 1000 nascidos vivos (Tabela 1).

Em outros estudos de triagem neonatal, a prevalência da toxoplasmose congênita variou de 1/10.000 neonatos nascidos vivos em Massachusetts (Guerina *et al.*, 1994) a 4,7/10.000 nascidos vivos na Polônia (Paul *et al.*, 2001).

A prevalência de anticorpos IgG em mulheres grávidas também varia bastante. Quanto menor essa prevalência, maior o número de mulheres suscetíveis à primoinfecção durante a gestação (Pinon *et al.*, 2001). No Brasil, geralmente é superior a 50%. No estado do Paraná a prevalência de IgG em gestantes é de 50% (Vaz *et al.*, 2010; Ferreira Dias *et al.*, 2011). Na cidade de Natal (RN) essa prevalência é de 66,3% (Barbosa *et al.*, 2009).

Tabela 1: Prevalência de toxoplasmose congênita em diferentes localidades do Brasil.

Localidade	Infectados/1000 nascidos vivos	Triagem	Referência
Goiânia – GO	6,0	Neonatal	Rodrigues 2006
Uberlândia – MG	5,0	Neonatal	Segundo <i>et al.</i> , 2004
Minas Gerais	1,3*	Neonatal	Vasconcelos-Santos <i>et al.</i> , 2009
Porto Alegre - RS	0,9	Pré-natal/ Neonatal	Varella <i>et al.</i> , 2009
Passo Fundo – RS	0,8*	Neonatal	Mozzatto 2003
Rio Grande do Sul	0,6*	Neonatal	Lago <i>et al.</i> , 2007
Natal – RN	0,33*	Neonatal	Barbosa <i>et al.</i> , 2009
Ribeirão Preto – SP	0,3	Neonatal	Carvalho, 2005

*valores ajustados dos originalmente publicados (para 1000 nascidos vivos) a fim de promover maior valor comparativo.

Em oito anos, de 1995 a 2003, a prevalência da toxoplasmose em mulheres grávidas na França reduziu de 54,3% para 43,8%. Um decréscimo similar foi observado nos Estados Unidos (Cortina-Borja *et al.*, 2010). Essa redução significa uma alteração da epidemiologia da infecção nesses locais, com maior número de mulheres em risco de contrair toxoplasmose e transmissão ao seu feto (Berger *et al.*, 2009).

1.2.3. DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA

Como 90% das infecções pelo *T. gondii*, mesmo em mulheres grávidas, é assintomática e, nas sintomáticas, os sinais são inespecíficos (Kravetz & Federman, 2005), o diagnóstico clínico da infecção aguda só é possível através da pesquisa de anticorpos.

Os testes sorológicos mais comumente utilizados são a Imunofluorescência Indireta (IFI), o Teste de Aglutinação Modificada (MAT), o *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) indireto (IgG) ou de captura (IgM ou IgA), o *Immunosorbent Agglutination Assay* (ISAGA) e *Immunoblotting* (IB) (Remington *et al.*, 2004; Rorman *et al.*, 2006).

Apesar das evidências sorológicas demonstrarem uma probabilidade de infecção, recomenda-se que o diagnóstico seja confirmado biologicamente independente do tipo de teste sorológico utilizado (Sauer *et al.*, 2011).

O diagnóstico baseado na sorologia é complicado pela possibilidade dos anticorpos específicos contra o parasito persistirem por muitos anos em circulação mesmo em pessoas saudáveis. Sendo assim, testes específicos para IgG e IgM positivos não significam necessariamente uma infecção recente. Anticorpos IgG são detectáveis por toda a vida do indivíduo (Montoya & Rosso, 2005). O IgM por sua vez, pode ser um bom marcador para diferenciar a fase aguda, porém já se sabe que essa imunoglobulina também pode permanecer residual por um tempo variável (Higa *et al.*, 2010).

Uma vez estabelecida a soroconversão materna, é necessário saber se o feto está infectado. Isso é comumente baseado em ultrassonografia ou PCR em líquido amniótico (amniocentese) e/ou em amostra de sangue fetal (cordocentese), os dois últimos oferecendo risco ao feto (Kravetz & Federman, 2005; Abdul-Ghani 2011).

O diagnóstico sorológico dos recém-nascidos também não é simples. A produção de anticorpos pelo feto ou mesmo pelos recém-nascidos é inibida e/ou mascarada pelos anticorpos maternos (Robert-Gangneux *et al.*, 1999). Apesar disso, usualmente, o diagnóstico neonatal é feito através de detecção de anticorpos específicos IgM ou IgA, subclasses de imunoglobulinas que não atravessam a placenta. Entretanto, em um número significativo das crianças infectadas, esses anticorpos estão ausentes ou são produzidos em concentrações abaixo da sensibilidade do método disponível. Então, na ausência de sinais clínicos, o diagnóstico pode ser prorrogado até a observação da persistência ou do aumento de IgG durante o primeiro ano de vida (Kravetz & Federman, 2005; Magi & Migliorini, 2011). Em muitos casos a confirmação da infecção congênita é feita através da avaliação de persistência de IgG, porém esse é um procedimento lento e o tratamento precoce das crianças infectadas é de suma importância (McLeod *et al.*, 2009).

Os títulos de anticorpos IgG anti- *T. gondii* caem progressivamente, nos recém-nascidos não infectados, até negatização em prazos de poucos meses a um ano (Thulliez *et al.*, 1992). Nos bebês infectados estes títulos são permanentes ou ascendentes, com exceção dos casos de imaturidade imunológica, quando a criança com toxoplasmose não produz anticorpos, havendo queda dos títulos, podendo chegar a negatização por esgotamento dos anticorpos de transferência passiva, para se elevarem em seguida à medida do despertar da resposta humoral ou término da medicação (Spalding 2002). Por esse motivo deve ser enfatizado que casos suspeitos de toxoplasmose congênita não podem ser descartados simplesmente pela ausência de IgM, IgA, ou mesmo IgG, especialmente nos recém-nascidos que receberam tratamento durante a fase intrauterina ou até na fase pós-natal.

O acompanhamento dos recém-nascidos suspeitos deve ser realizado em centros especializados, utilizando todas as fontes possíveis de diagnóstico (Rodrigues *et al.*, 2009). A identificação direta do parasito por cultura celular ou isolamento através do bioensaio em camundongos é considerada padrão ouro para a definição da infecção, mas são métodos demorados, laboriosos, de custo elevado além de serem poucos sensíveis (Kompalic-Cristo *et al.*, 2007; Abdul-Ghani 2011).

O diagnóstico molecular através de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) surgiu no cenário da toxoplasmose a cerca de 20 anos e tem se mostrado uma alternativa mais sensível (92%-97,4%) e mais específica (100%) para o diagnóstico da toxoplasmose do que os outros métodos já citados (Spalding 2002).

Os principais tipos de PCR utilizados no diagnóstico da toxoplasmose são: a PCR convencional (cnPCR) seguida de eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida, a Nested PCR (nPCR) e mais recentemente a PCR quantitativa em Tempo Real (qPCR) (Abdul-Ghani 2011).

O primeiro alvo utilizado para a PCR foi o P30, um gene de cópia única que codifica a proteína de superfície mais abundante do parasito (SAG1). Em seguida, foi descrito o gene B1 com 35 cópias no genoma do parasito. A PCR do gene B1 se mostrou sensível sendo que esta região é conservada entre as diferentes cepas. Esse gene foi amplamente usado e estudado no diagnóstico da toxoplasmose. Pouco tempo depois, a região 18S do DNA ribossomal foi descrita como um bom alvo (Abdul-Ghani 2011). Em 2000, Homan e colaboradores identificaram uma região repetitiva do genoma do parasito com cerca de 200 – 300 cópias e 529pb (rep529). Essa sequência foi depositada no GeneBank[®] sob a identificação de AF651470 (Homan *et al.*, 2000). A partir de então, a

PCR utilizando essa região como alvo foi amplamente disseminada no diagnóstico da toxoplasmose (Abdul-Ghani 2011).

O uso da PCR no diagnóstico da toxoplasmose congênita, ocular e em pacientes imunossuprimidos tem sido bem sucedido. Para esse propósito são utilizadas diferentes amostras biológicas como fluido amniótico, placenta, sangue total periférico, fluido cerebrospinal, lavado broncoalveolar, fluido vítreo, humor aquoso e fluídos pleural e peritoneal (Remington *et al.*, 2004).

No diagnóstico da toxoplasmose ocular assim como na toxoplasmose cerebral, o sangue periférico tem sido utilizado preferencialmente por ser uma amostra de coleta pouco invasiva, comparado ao humor aquoso (ou vítreo) e fluido cerebrospinal (Mesquita *et al.*, 2010; Silveira *et al.*, 2011).

O uso mais comum da PCR, entretanto, é no diagnóstico da infecção congênita utilizando o líquido amniótico. Menos frequentemente ela é realizada com sangue fetal obtido por cordocentese (Remington *et al.*, 2004).

Outra amostra biológica utilizada no diagnóstico molecular da TC é a placenta, porém sua utilidade é controversa. No mesmo ano foram publicados trabalhos a favor (Robert-Gangneux *et al.*, 2010) e contra (Filisetti *et al.*, 2010) o uso da placenta. As diferenças se devem provavelmente a restrições na análise devido à utilização de um pequeno fragmento do tecido, que não está homogeneamente infectado, e também pelas diferenças metodológicas usadas em cada laboratório.

De maneira geral, não existe consenso sobre os diferentes passos durante o processo de diagnóstico da toxoplasmose através da PCR, nem na extração do DNA, nos alvos ou nos iniciadores utilizados. Essas variações metodológicas em si constituem um

obstáculo para a padronização dos métodos de diagnóstico assim como a comparação dos resultados entre diferentes laboratórios (Sterkers *et al.*, 2010). Um estudo realizado na França por Sterkers e colaboradores entre 2002 e 2005 constatou que existiam quase tantos iniciadores em uso para rep529 (13 pares) em 2005 como havia para o B1 em 2002 (21 pares).

A PCR em Tempo Real (qPCR) foi recentemente introduzida para o diagnóstico da toxoplasmose. É uma metodologia rápida, sensível e quantitativa de detecção do *T. gondii* em amostras clínicas (Kompalic-Cristo *et al.*, 2005).

Esse método é baseado na detecção e quantificação de uma molécula repórter. Monitora a fluorescência emitida durante a reação como um indicador de amplificação em cada ciclo de PCR permitindo uma rápida detecção da quantidade da sequência alvo que estava presente no início da reação. A qPCR reduz o risco de resultados falso positivos. Isso porque a detecção dos produtos da reação assim como a análise de dados é realizada em condições controladas (Bretagne 2003). Outras vantagens dessa metodologia são: maior sensibilidade já que os produtos são detectados através de emissão de fluorescência, a rapidez, uma vez que não requer identificação em gel o resultado pode ser obtido em menos de duas horas, maior precisão e reprodutibilidade e melhor controle de qualidade no processo pelo menor risco de contaminação. As maiores desvantagens são o seu elevado custo e a alta habilidade técnica requerida (Manual Applied Biosystems Real-Time PCR Vs. Traditional PCR, pag 1-15). Na qPCR utilizada para toxoplasmose são comumente escolhidos como moléculas repórter o “Sybr Green”, uma molécula intercalante de DNA dupla-fita, e a Taqman, uma sonda hidrolizável de sequência complementar ao produto gerado pelos iniciadores e portanto, de maior especificidade.

Apesar do número de cópias do gene alvo de DNA do parasito ser um fator essencial que afeta a sensibilidade da reação, a especificidade também é indispensável (Mesquita *et al.*, 2010). Vários estudos tem demonstrado a aplicação da qPCR para o diagnóstico da toxoplasmose comparando diferentes alvos, geralmente o B1 em contraposição ao rep529, para avaliar a sensibilidade e especificidade dos testes. Alguns desses trabalhos encontraram uma especificidade maior para o rep529, mesmo utilizando pares de iniciadores distintos, e uma sensibilidade no mínimo 10% maior do que a PCR utilizando o B1 como alvo (Filisetti *et al.*, 2003; Reischl *et al.*, 2003; Cassaing *et al.*, 2006; Fekkar *et al.*, 2008). Em contrapartida alguns estudos demonstram que a especificidade da qPCR-B1 é maior do que da qPCR-rep529 (Wahab *et al.*, 2010; Mesquita *et al.*, 2010). O estudo de Mesquita e colaboradores (2010) realizado com amostras clínicas de pacientes brasileiros com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida corroboram com os resultados de Wahab e colaboradores, publicados no mesmo ano, sobre a menor especificidade do rep529, principalmente utilizando amostras de sangue.

Menotti e colaboradores (2010) descreveram um par de iniciadores após a realização de um consenso entre as duas sequências do alvo rep529 depositadas no GeneBank® (AF146570 e AF487550) parcialmente discordantes entre si. Os autores testaram a especificidade desses iniciadores com DNA extraído e purificado de diversos parasitos e fungos: *Cryptosporidium parvum*, *C. hominis*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *Isosporoa belli*, *Leishmania infantum*, *L. donovani*, *L. major*, *L. tropica*, *Giardia duodenalis*, *Entamoeba coli*, *E. dispar*, *E. hartmanni*, *Endolimax nana*, *Pseudolimax butschlii*, *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon hellem*, *Pneumocystis jirovecii* e *Aspergillus fumigatus* e obteve ausência de falso positivos. Além disso, a sensibilidade do método foi maior do que quando o B1 foi utilizado como alvo. Foi possível detectar parasitos mesmo após 2 meses do início da administração dos medicamentos em um

paciente com toxoplasmose aguda e recém transplantado apenas utilizando o alvo rep529. Esse método foi proposto como critério de eficácia do tratamento. O ganho de sensibilidade se manteve nas diferentes amostras analisadas: sangue total, soro e anel de leucócitos. Esses resultados confirmam a eficácia dessa sequência repetitiva do *T. gondii* como ferramenta para o diagnóstico da toxoplasmose.

1.3. QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA

A quantificação da carga parasitária pode auxiliar no entendimento de questões ainda não elucidadas sobre a toxoplasmose. Como exemplo, podemos citar a duração da parasitemia em indivíduos infectados pela via congênita, a dinâmica de disseminação do parasito pelos tecidos do hospedeiro e a eficácia do tratamento.

Em 1996, Nguyen e colaboradores utilizaram cnPCR associada à cultura de parasitos para determinar a dinâmica no curso da infecção por cepas virulentas e avirulentas de *T. gondii* em camundongos, avaliando amostras de cérebro, urina e sangue total. Para cepas virulentas o parasito foi detectado na urina e no sangue simultaneamente 24 horas após a infecção. No caso de cepas pouco virulentas a detecção foi feita primeiramente no sangue quatro dias após a infecção e permaneceu positiva até o 17º dia. No sexto dia foi detectada a presença de parasitos no cérebro e este tecido permaneceu positivo até o 525º dia, prazo final da análise. Em nenhum momento ocorreu detecção de parasitos na urina dos animais infectados com cepas pouco virulentas. Ainda utilizando camundongos como modelo no estudo da parasitemia na infecção com cepas avirulentas, Norose e colaboradores, em 2008, demonstraram que ocorre um pico no número de parasitos por mL (1×10^3) no sétimo dia após a infecção e uma negatificação no 12º dia. Camundongos deficientes para interferon- γ não foram capazes de controlar a infecção e a parasitemia atingiu níveis elevados levando a morte do camundongo.

Em 2000, Lin e colaboradores propuseram a técnica de PCR em tempo real para a quantificação do número de parasitos em cortes de tecidos oriundos de crianças com toxoplasmose congênita embebidos em parafina. Nesse contexto eles utilizaram como alvo o gene B1 e obtiveram um limite de detecção de 0,05 taquizoítos.

Outros trabalhos determinaram o número de bradizoítos presentes no interior de cistos teciduais de animais de consumo como porcos (Jauregui *et al.*, 2001) e a avaliação da técnica de qPCR como ferramenta potencial para a análise de produtos suínos. A distribuição do parasito em diferentes órgãos de galinhas, como cérebro e músculo cardíaco também foi analisada (Aigner *et al.*, 2010).

Além de estabelecer a presença do *T. gondii*, a técnica de qPCR pode ser usada para estimar a carga parasitária em diferentes fluidos corporais humanos (Remington *et al.*, 2004). Simon e colaboradores em 2004, e mais recentemente, Talabani e colaboradores (2009) quantificaram a carga parasitária de *T. gondii* no humor aquoso como diagnóstico diferencial de toxoplasmose ocular em casos de lesões atípicas ou nos casos em que a visualização da retina fica impossibilitada pela turvação do humor aquoso decorrente de vitrite. Essa foi uma ferramenta de grande valor diagnóstico e a carga pôde ser associada ao prognóstico das lesões.

No caso da quantificação do número de taquizoítos no líquido amniótico também foi encontrado um marcador precoce de prognóstico da toxoplasmose congênita. Os valores encontrados na quantificação dos taquizoítos demonstraram excelente relação entre carga parasitária, período da infecção materna e risco de infecção fetal assim como gravidade da doença (Romand *et al.*, 2004).

Em outros estudos a quantificação da carga parasitária em imunodeficientes transplantados ou HIV positivos auxiliaram no monitoramento da eficácia do tratamento

(Kupferschmidt *et al.*, 2001; Edvinsson *et al.*, 2006; Petersen *et al.*, 2006; Menotti *et al.*, 2010). Patrat-Delon e colaboradores (2010) encontraram PCR positiva em um paciente, 112 dias após um transplante de coração. A carga parasitária foi correlacionada com os sintomas apresentados pelo paciente, sendo maior no pulmão (6000 parasitos/mL) seguida do sangue periférico (1800 parasitos/mL) e uma pequena carga no fluido cérebro espinhal (12 parasitos/mL). Foi possível detectar parasitos no sangue periférico até o 133º dia depois do transplante, mostrando uma permanência da parasitemia mesmo após 21 dias de tratamento sistemático.

Além disso, a quantificação do número de taquizoítos em diferentes fluídos pode, ainda, ajudar no entendimento da patogênese da reativação da toxoplasmose (Silveira *et al.*, 2011).

2. JUSTIFICATIVA

A toxoplasmose congênita é uma doença com morbidade significativa, principalmente pelo comprometimento oftalmológico. No Brasil, as lesões na retina nos recém-nascidos decorrentes da infecção pelo *T. gondii* são mais graves e mais frequentes quando comparadas aquelas do Hemisfério Norte. O tratamento precoce tem se mostrado importante na redução das sequelas e melhora do prognóstico. Considerando as limitações no diagnóstico comumente usado, principalmente a dificuldade na confirmação da infecção através de um diagnóstico parasitológico (bioensaio em camundongos ou cultura) e a demora na obtenção do resultado do teste sorológico mais fidedigno (persistência de IgG aos 12 meses de vida), um diagnóstico rápido, sensível e específico se faz necessário. A qPCR utilizando sangue de recém-nascidos com toxoplasmose congênita pode ser uma excelente ferramenta para auxiliar este difícil diagnóstico. Entretanto, é necessário saber se a sequência repetitiva (rep529) utilizada como alvo nos estudos europeus é capaz de identificar, com a mesma eficácia, a presença de cepas recombinantes de *T. gondii* responsáveis pelos casos de toxoplasmose congênita no Brasil.

Sabe-se que a variabilidade das manifestações clínicas nos recém-nascidos com toxoplasmose congênita está relacionada a diversos fatores, presume-se dentre eles a carga parasitária. A hipótese desse projeto é que a gravidade dos sinais clínicos (principalmente lesões oculares) nos recém-nascidos com toxoplasmose congênita no Estado de Minas Gerais esteja associada à maior quantidade de parasitos circulantes no sangue periférico quantificados por PCR em Tempo Real.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Identificar e quantificar o DNA do *Toxoplasma gondii* em sangue periférico de recém-nascidos identificados pelo Programa de Triagem Neonatal para toxoplasmose congênita no Estado de Minas Gerais e estabelecer associação entre as manifestações clínicas e a carga parasitária.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar especificidade e sensibilidade relativa da técnica de qPCR em tempo real, assim como sua utilização no diagnóstico neonatal da toxoplasmose congênita (TC) em relação à persistência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* após 12 meses de vida do recém-nascido.
- Avaliar a reprodutibilidade da técnica de qPCR em tempo real.
- Avaliar uma possível associação dos resultados da qPCR à presença de sinais da TC (calcificações cerebrais e retinocoroidite, incluindo as categorias de lesão) assim como avaliar o risco relativo para cada uma delas em relação ao resultado molecular.
- Quantificar a presença de DNA de *T. gondii* em amostras de DNA extraídas de sangue de crianças com suspeita de toxoplasmose congênita.
- Avaliar uma possível associação entre carga parasitária em sangue periférico de recém nascidos e a presença de calcificações cerebrais.
- Avaliar uma possível associação entre a carga parasitária em sangue periférico de recém nascidos e a presença de retinocoroidite ativa ou cicatrizada.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. PACIENTES

O presente estudo faz parte de um projeto multidisciplinar intitulado: “TRIAGEM NEONATAL PARA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA NO ESTADO DE MINAS GERAIS” coordenado pela Dra. Gláucia Manzan Queiroz de Andrade (Faculdade de Medicina da UFMG - Grupo Brasileiro de Toxoplasmose Congênita, GBTC-UFMG).

Durante o período de 1/11/2006 a 31/05/2007 foi realizado um inquérito sorológico baseado na detecção de IgM específica contra *T. gondii* em amostras de sangue seco em papel filtro utilizando-se o kit TOXO IgM Q-Preven[®] (Symbiosis, Leme, Brasil) nos 146.307 recém-nascidos atendidos pelo Programa de Triagem Neonatal para fenilcetonúria, hipotireoidismo e hemoglobinopatias (TESTE DO PÉZINHO). Essa triagem foi realizada pelo Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico (NUPAD/UFMG) e abrangeu cerca de 95% dos nascidos vivos no estado neste período.

Das 146.307 crianças avaliadas, 235 apresentaram resultado positivo ou duvidoso na pesquisa de IgM anti-*T. gondii* através do kit *Q-Preven*[®]. O restante apresentou resultado negativo para IgM anti-*T. gondii*. Os 235 recém-nascidos positivos foram classificados como suspeitos de toxoplasmose congênita e foram submetidos a testes sorológicos confirmatórios: IgA, IgG e IgM anti-*T. gondii* no soro/plasma do bebê assim como de sua mãe. Os bebês também passaram por uma avaliação clínica no Hospital das Clínicas (HC) da UFMG a fim de identificar possível comprometimento oftalmológico (Fundoscopia) e neurológico (Ultrassom Transfontanela, Radiografia de Crânio). Esses exames foram realizados sob a responsabilidade dos médicos Drs. José

Nélio Januário, Gláucia Manzan Queiroz de Andrade e Daniel Vitor Vasconcelos-Santos. Quando necessário, os recém-nascidos eram encaminhados para atendimento neurológico e neurocirúrgico.

Dentre as 235 crianças positivas ou com resultado duvidoso para IgM anti-*T. gondii* através do teste *Q-Preven*[®], 220 foram selecionadas para este estudo por terem sido submetidas a pesquisa de IgG após 12 meses de vida. As outras 15 crianças não tiveram sangue coletado ao completarem um ano de vida por diversos motivos (óbito, desistência dos pais em participar do estudo, mudança de endereço) e, portanto foram excluídas deste estudo.

Desta forma, o diagnóstico de toxoplasmose foi confirmado, de fato, pela persistência dos anticorpos IgG anti-*T. gondii*, nas crianças com aproximadamente 12 meses de vida.

Todas as crianças infectadas foram tratadas com uma combinação de sulfadiazina + pirimetamina + ácido folínico durante o primeiro ano de vida, e estão sendo acompanhadas por um período mínimo de cinco anos. Este estudo tem o apoio da Secretaria Estadual de Saúde de Minas Gerais e foi aprovado pelo COEP-UFMG, parecer n^o 0298/06, apresentado em Anexos junto ao termo de consentimento para participação no projeto.

As 220 crianças selecionadas foram divididas em 2 grupos (Fluxograma 1):

Grupo TCC (Toxoplasmose Congênita Confirmada): 180 crianças com persistência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* após 12 meses de vida.

Grupo TCD (Toxoplasmose Congênita Descartada): 40 crianças reativas na triagem neonatal, mas apresentando resultado negativo para anticorpos IgG anti-*T. gondii* ao final de 12 meses de vida.

Todas as 40 crianças do Grupo C apresentaram exames clínicos normais, com exceção de uma delas que apresentou calcificações cerebrais de outra etiologia (porencefalia) no exame de ultrassom transfontanela.



Fluxograma 1: Identificação das 180 crianças infectadas com toxoplasmose congênita (TCC) e 40 crianças com toxoplasmose congênita descartada (TCD) participantes deste estudo.

4.2. COLETA DE SANGUE E EXTRAÇÃO DE DNA

Uma amostra de 1,5 mL de sangue periférico de cada uma das 220 crianças selecionadas para este estudo foi coletada, em EDTA, imediatamente antes do início do tratamento, para extração de DNA total e possível identificação de *T. gondii* através de diagnóstico molecular. Este sangue foi mantido a -20°C até o momento da extração do DNA. A média de idade dos bebês no momento da coleta de sangue foi de 58 dias, sendo a idade mínima de 18 e a máxima de 173 dias. A avaliação clínica foi realizada no mesmo dia da coleta do sangue.

A extração de DNA das amostras de sangue periférico dos recém-nascidos foi realizada em 300µL de sangue total, imediatamente após o seu descongelamento, utilizando-se o kit *Wizard*[®] Genomic DNA Purification (Promega, Madison, WI, USA) de acordo com o protocolo do fabricante. O DNA precipitado foi ressuscitado em 50µL de água ultra-pura e sua concentração determinada após uma semana, através de dosagem por espectrofotometria (NanoDrop[®] ND-1000 Spectrophotometer). As amostras de DNA foram mantidas sob refrigeração, a 4°C, até o momento de sua utilização.

4.3. VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE INIBIDORES DE PCR

Com o objetivo de verificar a qualidade da extração de DNA e confirmar a ausência de inibidores foi realizada uma cnPCR com os iniciadores $\beta 1/\beta 2$ (5'-ACCACCAACTT CATCCACGTTACC-3' e 5'-CTTCTGACACA ACTGTGTTCACTAGC-3') descritos por Lee *et al.* (2001), que amplificam um fragmento de 140 pb do gene da β -globina humana. Nessa reação utilizamos como molde o DNA total extraído do sangue das

crianças. As reações de amplificação tiveram um volume final de 10µL, contendo 2µL de Tampão 5X green (Promega, Madison, WI, USA), 25mM de MgCl₂, 2,5mM de cada deoxinucleotídeo (dATP/dTTP/dGTP/dCTP, Promega, Madison, WI, USA), 5u/µL de *Taq* DNA polimerase (Promega, Madison, WI, USA) e 5pmol de cada iniciador. A reação de amplificação foi programada para uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 30 segundos e extensão a 72°C por um minuto e extensão final à 72°C por 5 minutos. Os fragmentos amplificados foram visualizados através de eletroforese em gel de poliacrilamida a 5% seguido de coloração com nitrato de prata e fotografados. A eficiência da extração foi confirmada pela intensidade das bandas específicas de tamanho esperado na visualização em gel e a inibição da cnPCR pela ausência destas bandas. As amostras nas quais ocorreu inibição da cnPCR para a β-globina humana foram submetidas novamente ao processo de extração de DNA seguindo o protocolo descrito acima e realizada nova cnPCR a fim de comprovar a ausência de inibidores.

4.4. IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE *TOXOPLASMA GONDII* ATRAVÉS DE QPCR DO ALVO REP529

4.4.1. OBTENÇÃO DE DNA DE *T. GONDII* E CURVA-PADRÃO

Taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* foram obtidos do fluido ascítico (exsudato peritoneal) de camundongos SWISS infectados por via intraperitoneal três dias antes com o objetivo de definir a curva padrão para quantificação de parasitos por qPCR. Os taquizoítos foram lavados com 3 mL de PBS pH 7,2 seguido de centrifugação por 10 minutos a 1000 x g e descarte do sobrenadante. Esse procedimento foi repetido duas

vezes. O *pellet* resultante foi suspenso em 15 mL de PBS pH 7,2 seguido de centrifugação por 30 segundos a 300 x g com o objetivo de separar possíveis células contaminantes do hospedeiro. O sobrenadante foi lavado novamente com PBS pH 7,2 por 10 minutos a 1000 x g com descarte do sobrenadante final. Por fim, o *pellet* final foi ressuspendido em 1 mL de PBS pH 7,2 e o número de taquizoítos estimado em câmara hemocitométrica. Os parasitos foram diluídos em PBS pH 7,2 para uma concentração de 1×10^8 taquizoítos/mL. Essa suspensão foi centrifugada por 15 minutos à 1000 x g em tubo de centrífuga de 1,5mL. O sobrenadante foi totalmente descartado e em seguida adicionado ao *pellet* 1 mL de sangue de um doador voluntário com testes sorológicos e moleculares negativos para toxoplasmose. Esse material foi congelado e a extração de DNA realizada utilizando-se o kit *Wizard*[®] Genomic DNA Purification (Promega, Madison, WI, USA). O DNA foi ressuspendido em 50µL de água ultra-pura e dosado após uma semana por espectrofotometria (NanoDrop[®] ND-1000 Spectrophotometer).

Para o cálculo do número de parasitos aplicados na curva-padrão, realizou-se a extração de 300µL de sangue a partir da solução estoque homogênea contendo 1×10^8 taquizoítos/mL de sangue. Ou seja, a extração de DNA foi correspondente a um total de 3×10^7 taquizoítos, que foram ressuspendidos em 50µL de água, resultando na concentração de 6×10^5 taquizoítos/µL. Foram feitas sete diluições seriadas na base 10. Após padronização foram escolhidas as quatro últimas para a realização da curva-padrão (6×10^2 /µL, 6×10^1 /µL, 6×10^0 /µL, 6×10^{-1} /µL). Porém, foram aplicados quatro microlitros na placa para qPCR, sendo assim, o número de taquizoítos utilizados na curva-padrão foi 2400, 240, 24 e 2,4 taquizoítos.

Taquizoítos de oito cepas virulentas de *T. gondii*, isoladas recentemente (Carneiro *et al.*, 2011) de casos humanos de toxoplasmose congênita [TgCTBr 1 (*Toxoplasma gondii*-Congenital Toxoplasmosis from Brasil), TgCTBr 3, TgCTBr 4, TgCTBr 8, TgCTBr 9,

TgCTBr 11, TgCTBr 17 e TgCTBr 25] foram obtidos do fluido ascítico de camundongos SWISS, infectados cinco dias antes com 300-500 cistos teciduais pela via intraperitoneal. Os taquizoítos obtidos foram lavados com 3 mL de PBS pH 7,2 seguido de centrifugação por 10 minutos a 1000 x g e descarte do sobrenadante. Esse procedimento foi repetido duas vezes e o *pellet* resultante foi suspenso em 15 mL de PBS pH 7,2 seguido de centrifugação por 30 segundos a 300 x g com o objetivo de separar as possíveis células do hospedeiro presentes no material. O sobrenadante foi lavado novamente por 10 minutos a 1000 x g com descarte do sobrenadante final. Do sedimento final foi extraído DNA utilizando-se o kit *Wizard*[®] Genomic DNA Purification (Promega, Madison, WI, USA) de acordo com as recomendações do fabricante para esse tipo de amostra. O DNA foi dosado por espectrofotometria (NanoDrop[®] ND-1000 Spectrophotometer) e diluído para obter a concentração final de 10 ng de DNA do parasito por microlitro. Esse material foi submetido à qPCR tendo como alvo o elemento repetitivo rep529, conforme descrito no item 4.4.2.

A qPCR realizada em quantidade padronizada de DNA (10 ng/μL) obtido das oito das cepas de *T. gondii*, foi utilizada a fim de identificar possíveis variações intraespecíficas no número de cópias do elemento repetitivo no genoma do parasito, rep529, em diferentes cepas.

4.4.2. PCR EM TEMPO REAL

A PCR em tempo real (qPCR) foi realizada no ABI Prism 7500 DNA *Sequence Detection System* (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) usando 5 μL de SYBR[®] Green PCR Master Mix (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 1 μL

de cada iniciador (F-5'CTTCGTCCAAGCCTCCGA3' e R-5'GACGCTTTCCTCGTG GTGAT3') (Menotti *et al.*, 2010) na concentração de 2 μ Molar e 100 ng do DNA extraído do sangue total das crianças. Os iniciadores amplificam um fragmento de 84pb. As amostras de DNA extraído do sangue periférico dos bebês foram diluídas para a concentração de 25 ng/ μ L, sendo quatro microlitros utilizados na reação. Aquelas que possuíam menos de 25 ng/ μ L foram testadas sem diluir. As amostras foram incubadas por 10 minutos a 95 °C e depois submetidas a 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto, durante esse tempo foram coletados dados da emissão de fluorescência.

Todas as amostras foram testadas simultaneamente para a presença do parasito (qPCR - rep529) e para o gene da β -globina do hospedeiro (qPCR- β -glob) que serviu como controle interno da reação. No caso da ausência de amplificação na qPCR- β -glob, o resultado foi desconsiderado neste estudo pois esse iniciador avalia a qualidade do DNA extraído.

Para estimar a carga parasitária no sangue dos recém-nascidos foi utilizada uma curva-padrão por reação de qPCR, feita em duplicata, com amostras da cepa RH preparadas conforme item 4.4.1. O ensaio foi realizado em duplicata e a concentração dos iniciadores foi de 2 μ M. A média dos valores de "Threshold cycle" (C_T) obtidos foi utilizada para determinar a equação de reta através de regressão linear.

Para avaliar a eficiência da reação de PCR para os iniciadores utilizados nesse trabalho, foram construídas curvas padrão da mesma maneira que descrito no parágrafo anterior. Os valores foram plotados em um gráfico onde o eixo X apresentava o Log do número de parasitos e o eixo Y, o valor de C_T para cada diluição. O cálculo da eficiência dos iniciadores foram determinados pelo *slope* da curva aplicado na seguinte formula:

Eficiência = $[10^{(-1/\text{slope})} - 1] \times 100$. Os valores de *threshold* para os iniciadores utilizados foram ajustados para 0,088 para os iniciadores de rep529 e para 0,210 para os iniciadores da β -globina humana.

A curva de dissociação dos iniciadores foi realizada no intuito de averiguar a ocorrência de possíveis amplificações inespecíficas. Ao final dos 40 ciclos de PCR realizados para amplificação gênica foi adicionada uma etapa na qual a temperatura aumenta gradualmente de 60 °C á 95 °C, mantendo-se por 15 s em cada temperatura, durante o qual é feita a leitura da emissão de fluorescência. Na medida em que os produtos gerados por PCR desnaturam com o aumento da temperatura, o sinal fluorescente emitido pelo SYBR™ Green é reduzido. O gráfico resultante permite verificar se há um ou mais produtos de PCR presentes em cada reação devido a diferenças de temperatura média de dissociação (T_m) entre produtos de PCR com diferente número e composição de bases de cada *amplicon*.

Todas as amostras foram avaliadas em unicata. Para verificar a reprodutibilidade da PCR em tempo real, foram avaliadas cerca de 20% do total das amostras, as quais foram submetidas à nova PCR em tempo real em um momento distinto.

4.5. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Um banco de dados utilizando o software Microsoft Excel® foi construído como suporte ao estudo. Esse banco compila os dados pessoais do paciente (filiação, sexo, local e data de nascimento, dias de vida do nascimento à coleta de sangue), as informações clínicas obtidas pela equipe médica (resultados de exames oftalmológicos e neurológicos) bem como os resultados dos testes sorológicos aos quais as crianças foram submetidas. As

amostras receberam identificação em forma de numeração sequencial (1001 a 1235) na ordem em que foram coletadas. Quinze amostras não foram selecionadas para este experimento por não possuírem resultado de IgG anti-*T. gondii* aos 12 meses de vida.

A especificidade da amplificação na PCR em tempo real foi confirmada pela análise da curva de dissociação do *amplicon* gerado e, caso necessário, visualização do produto da qPCR-rep529 em gel em poliacrilamida 5% corado pelo nitrato de prata

O cálculo da reprodutibilidade foi feito através da proporção dos resultados qualitativos concordantes em relação ao total de repetições.

- Análise dos resultados qualitativos

Foi realizada a tabulação cruzada, por meio de tabela 2x2, contendo os resultados da qPCR-rep529 e da persistência de IgG anti- *T. gondii* após 12 meses de vida, que foi utilizada como teste de referência. Através dessa, foram determinados os índices de sensibilidade relativa e especificidade relativa e o índice *Kappa*. Outra tabulação foi feita de maneira análoga, porém contendo os resultados da qPCR-rep529 em comparação aos resultados previamente obtidos de isolamento do *T. gondii* através de inoculação intraperitoneal de sangue dos recém-nascidos em camundongos normais (bioensaio) realizado por Carneiro e colaboradores (2010).

Foi calculada a frequência dos sinais clínicos e esta comparada à frequência de positividade da qPCR-rep529 através do teste exato de Fisher. No caso da análise do tipo de lesão ocular foi utilizado o teste de Qui-quadrado seguido do teste exato de Fisher entre os pares de diferentes tipos de lesão.

- Análise dos resultados quantitativos

Os valores de C_T obtidos por qPCR-rep529 nas amostras de DNA foram convertidos em número de taquizoítos por mililitro através de interpolação na reta obtida através de regressão linear da curva padrão, para a quantificação relativa da carga parasitária nos recém-nascidos.

A identificação de valores *outlier* (valores discordantes, que se afastam do padrão geral dos dados) foi feita no *software* disponível online Graphpad Quickcalcs® (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/>) através da análise de dados contínuos pelo teste de Grubbs. Os valores *outliers* encontrados foram retirados das análises estatísticas subsequentes.

O tipo de distribuição dos dados foi demonstrado pelos testes de Kolmogorov-Smirnoff, D'Agostino e Pearson e Shapiro-Wilk. A correlação entre a idade da criança (dias de vida da criança no momento da coleta da amostra de sangue periférico) e a carga parasitária foi feita utilizando o teste de Spearman.

As medianas do número de taquizoítos por mililitro de sangue dos recém-nascidos em cada grupo de sinais clínicos foram analisadas empregando o teste de Mann Whitney, quando a comparação foi feita entre dois grupos e Kruskal-Wallis, quando houve mais de dois grupos envolvidos na análise.

A variação dos valores de C_T obtidos na qPCR-rep529 das cepas TgCTBrS, testadas numa mesma diluição, foi feito através do “*One sample t test*”.

Os testes estatísticos foram realizados com o apoio instrumental do *software* GraphPad Prism 5.00 (Prism Software, Irvine, CA, USA).

5. RESULTADOS

5.1. EXTRAÇÃO DE DNA E PRESENÇA DE INIBIDORES

O DNA das 220 amostras de sangue periférico de crianças selecionadas para este estudo foi extraído e dosado. Setenta e cinco por cento destas possuíam quantidade superior a 25,5ng de DNA/ μ L. Três amostras apresentaram inibição da PCR pela ausência de bandas específicas na cnPCR tendo como alvo a β -globina humana. Outras 10 amostras apresentaram uma banda de intensidade fraca. Nesses casos o processo de extração do DNA em sangue total congelado foi repetido. Nenhuma das amostras reextraídas apresentou inibição da cnPCR.

5.2. CURVA-PADRÃO E EFICIÊNCIA DOS INICIADORES DA qPCR

O número de parasitos utilizados na curva-padrão da qPCR usando o alvo rep529 de *T. gondii* foi de 2400, 240, 24 e 2,4 taquizoítos. A equação de reta obtida através de Regressão Linear foi: $y = -1,529 \ln(x) + 24,67$ e o valor do Coeficiente de Determinação (R^2) foi igual a 0,9985, conforme demonstrado na Figura 1.

A eficiência dos iniciadores foi de 92,28% (*slope* de -3,522 e R^2 de 0,99) para os iniciadores descritos por Menotti e colaboradores em 2010, que amplificam o alvo do parasito (rep529), e de 93,31% (*slope* de -3,493 e R^2 de 0,99) para aqueles que amplificam a β -globina humana (Lee *et al.*, 2001).

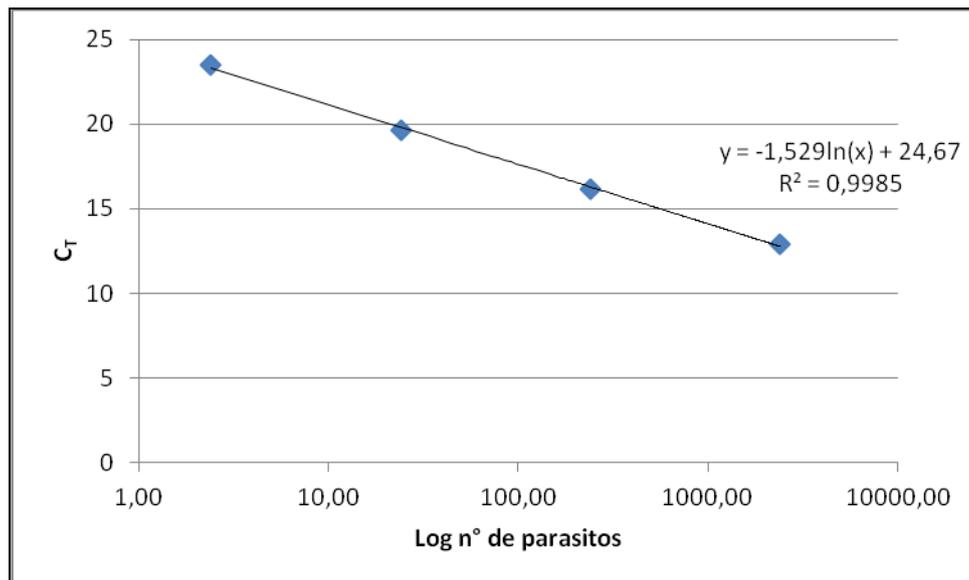


Figura 1: Gráfico da equação de reta da curva-padrão para a quantificação relativa da parasitemia nas amostras de DNA extraída de sangue periférico dos recém-nascidos pela qPCR-rep529, realizada através da diluição seriada da amostra de DNA extraído de taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* em sangue periférico de um doador negativo para toxoplasmose.

5.3. NÚMERO DE CÓPIAS DA SEQUÊNCIA ALVO (REP529) EM CEPAS RECOMBINANTES DE *T. GONDII*

Utilizando uma quantidade padronizada de DNA extraído de taquizoítos de oito cepas isoladas de casos congênitos de toxoplasmose (TgCTBr) na reação de qPCR-rep529, observou-se uma variação nos valores obtidos de C_T . A média dos valores obtidos foi $13,5 (\pm 1,47)$ e essa variação foi significativa ($p < 0,001$).

5.4. PCR EM TEMPO REAL

Do total das 220 amostras testadas, cinco não apresentaram amplificação na qPCR- β -globina, mesmo quando submetidas a nova reação utilizando uma quantidade maior de

DNA, quando possível. Trinta e duas amostras necessitaram de confirmação em gel de poliacrilamida por apresentarem picos duplos ou pouco característicos na análise da curva de dissociação (Figura 2). Essas amostras foram classificadas como indeterminadas por ter sido demonstrado em gel a presença de bandas inespecíficas (Figura 3). O resultado dessas 37 amostras (5 com inibição e 32 com bandas inespecíficas) foi desconsiderado nas análises.

Das 220 amostras de DNA extraído de sangue dos recém-nascidos, 183 (83,2%) tiveram o resultado considerado para a análise neste trabalho. A presença do parasito foi confirmada pela amplificação do elemento repetitivo rep529 de *T. gondii* em 84 (45,90%) delas. Nas demais 99 amostras o resultado da qPCR-rep529 foi negativo.

A técnica de PCR em tempo real obteve uma boa reprodutibilidade (82,86%), obtendo resultados concordantes em 29/35 amostras avaliadas.

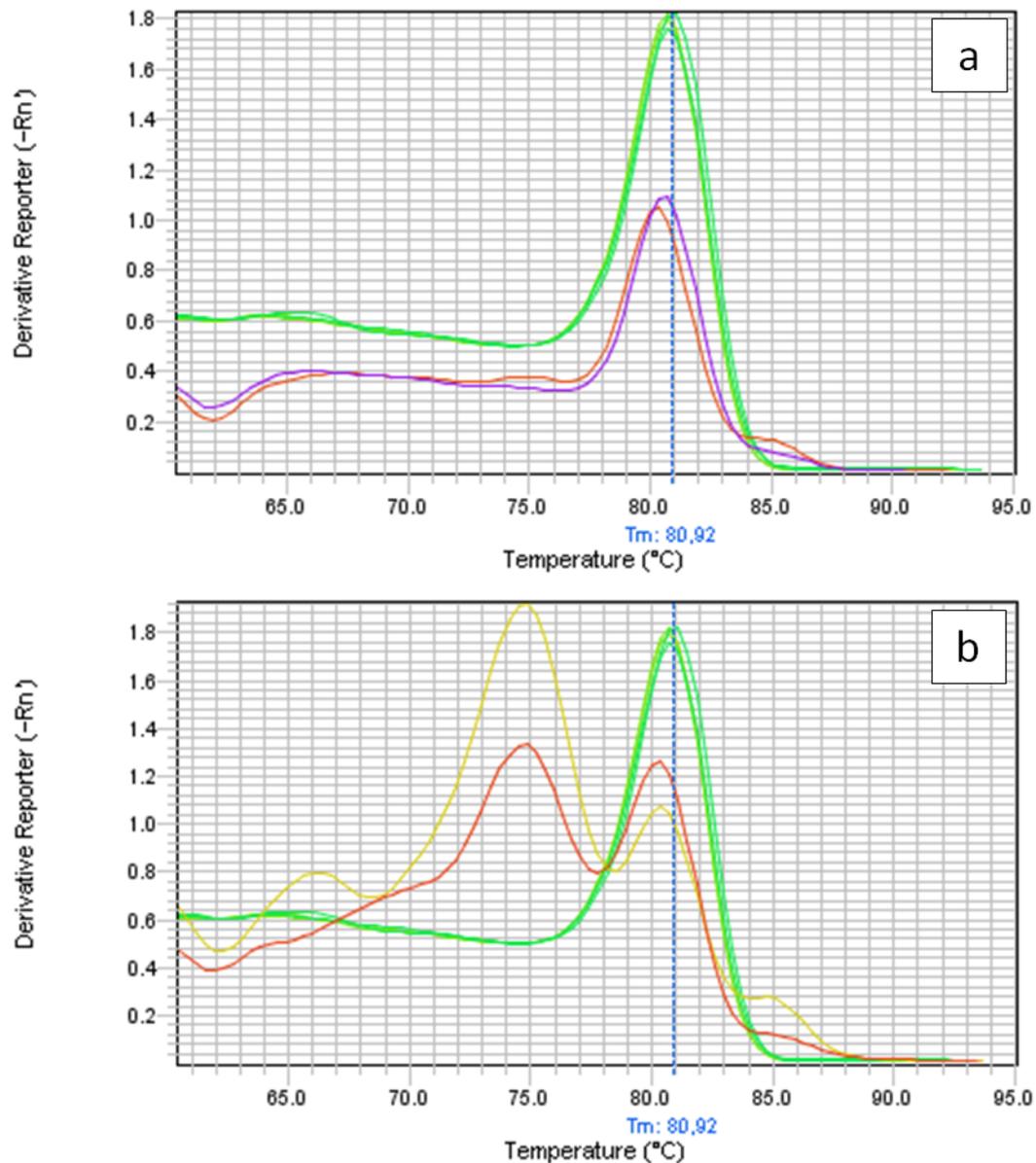


Figura 2: Curvas de dissociação representativas dos *amplicons* gerados na qPCR-rep529 de *T. gondii* em sangue periférico de crianças com toxoplasmose congênita. No eixo x está representada a temperatura de dissociação do *amplicon* e no eixo Y a derivada do valor de emissão de fluorescência. **(a)** Curva de dissociação referente ao produto obtido na curva padrão com DNA da cepa RH (verde), DNA do recém-nascido n° 1015 (azul) e do n° 1025 (vermelho). **(b)** Curva de dissociação referente ao produto obtido na curva padrão com DNA da cepa RH (verde), DNA do recém-nascido n° 1018 (vermelho) e do n° 1036 (amarelo).

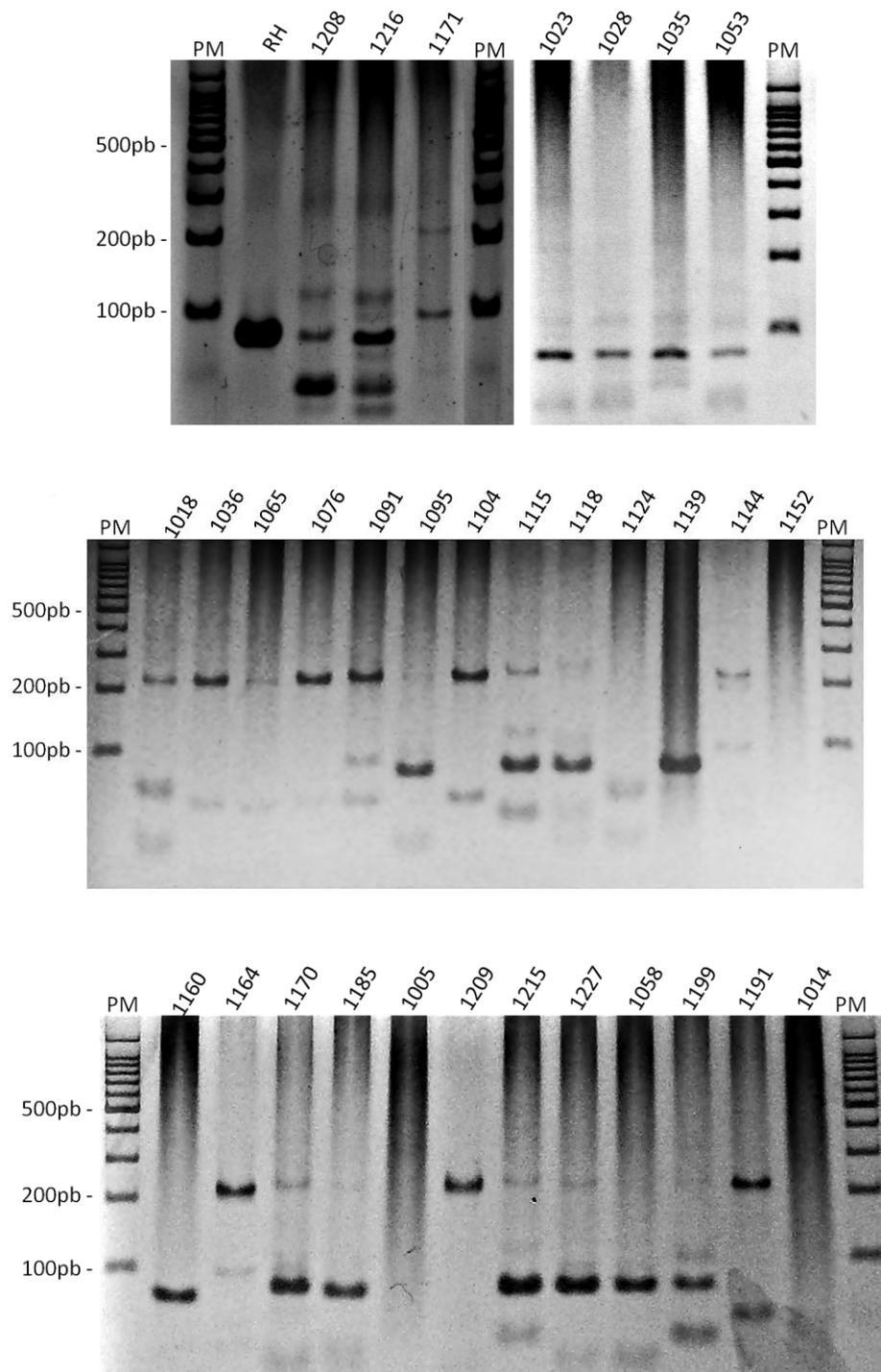


Figura 3: Produto da qPCR-rep529 em amostras de DNA de sangue periférico dos 32 recém-nascidos que apresentaram picos duplos ou pouco característicos na análise da curva de dissociação. RH: Controle positivo com DNA da cepa RH de *T. gondii* utilizado na curva padrão. PM: Padrão de peso molecular (Promega, Madison, WI, USA) 100pb.

5.4.1. RESULTADOS QUALITATIVOS DA qPCR-REP529 EM SANGUE DE CRIANÇAS COM SUSPEITA DE TOXOPLASMOSE CONGÊNITA

A tabela 2 mostra os resultados da avaliação da sensibilidade relativa, especificidade relativa e índice *Kappa* da qPCR-rep529 utilizando como teste referência a persistência de IgG anti – *T. gondii* após o 12º mês de vida: 150 crianças com TCC (IgG persistente após 12 meses de vida) e 33 crianças com TCD (desaparecimento de IgG após 12 meses de vida).

Doze amostras (6,5%) tiveram a presença do parasito confirmada por qPCR-rep529 apesar da ausência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* ao completarem 12 meses de vida. Em 78 (52%) das 150 crianças que tiveram a toxoplasmose congênita confirmada pela persistência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* não foi detectado DNA do parasito no sangue periférico pela reação qPCR-rep529.

A tabela 3 mostra os resultados da avaliação da sensibilidade relativa, especificidade relativa e índice *Kappa* da qPCR-rep529 utilizando como teste referência o resultado de isolamento de *T. gondii* por bioensaio em camundongos realizado por Carneiro e colaboradores (2010). A qPCR-rep529 foi negativa em 44% (11) das amostras positivas por bioensaio em camundongos.

O Fluxograma 2 apresenta a distribuição das 183 crianças selecionadas para esse estudo assim como o resultado das avaliações clínicas às quais as 150 crianças com confirmação de TC por persistência de IgG anti-*T. gondii* após 12 meses foram submetidas.

Tabela 2: Avaliação da sensibilidade, especificidade e índice *Kappa* da qPCR-rep529 utilizando como teste referência a persistência de IgG anti – *T. gondii* após o 12º mês de vida.

		Teste Referência: IgG após 12 meses de vida		
		POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
qPCR - rep529	POSITIVO	72	12	84
	NEGATIVO	78	21	99
TOTAL		150	33	183

Sensibilidade relativa = 0,48

Especificidade relativa = 0,64

Kappa = 0,0653

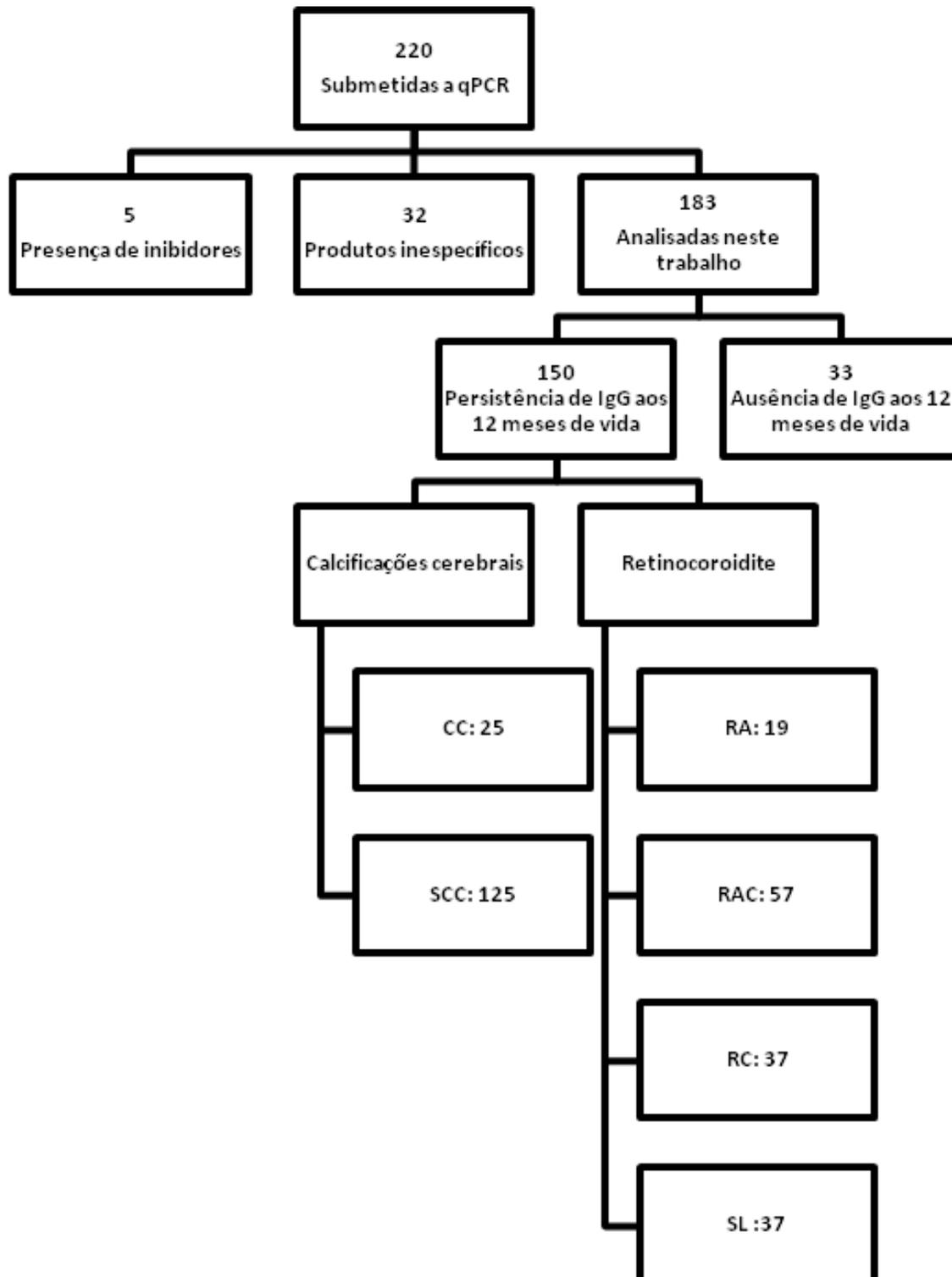
Tabela 3: Avaliação da sensibilidade, especificidade e índice *Kappa* da qPCR-rep529 utilizando como teste referência o isolamento de *T. gondii* por bioensaio em camundongos.

		Bioensaio		
		POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
qPCR - rep529	POSITIVO	14	70	84
	NEGATIVO	11	88	99
TOTAL		25	158	183

Sensibilidade relativa = 0,17

Especificidade relativa = 0,89

Kappa = 0.05868



Fluxograma 2: Amostras selecionadas para análise e distribuição das crianças submetidas às avaliações clínicas: oftalmológica e calcificações cerebrais. Retinocoroidite ativa (grupo RA), cicatrizada (grupo RC), ativa e cicatrizada simultaneamente (grupo RAC), sem lesões oculares (grupo SL), calcificações cerebrais (grupo CC), sem calcificações cerebrais (grupo SCC).

A tabelas 4 e 5 apresentam a distribuição dos casos positivos pelo diagnóstico molecular (qPCR-re529) em relação aos sinais clínicos da doença: calcificações cerebrais e lesões oftalmológicas; apenas em recém-nascidos considerados positivos pela persistência de IgG anti- *T. gondii* após 12 meses de vida (n= 150 crianças).

Dentre as 150 crianças com persistência de IgG anti-*T. gondii* e resultados conclusivos por qPCR-rep529, 25 apresentaram calcificações cerebrais. Destas, observam-se oito casos (32%) com diagnóstico molecular positivo. Dentre as 125 crianças sem calcificações, foram observados 64 casos (51,2%) com a qPCR-rep529 positiva, $p=0,123$ (Tabela 4 e Figura 4).

Tabela 4: Associação entre o resultado da qPCR-rep529 e a presença ou ausência de calcificações cerebrais dentre as 150 crianças com persistência de IgG anti-*T. gondii* após 12 meses de vida ($p=0,123$).

		Calcificações cerebrais		
		PRESENTE	AUSENTE	TOTAL
qPCR - rep529	POSITIVO	8	64	72
	NEGATIVO	17	61	78
TOTAL		25	125	150

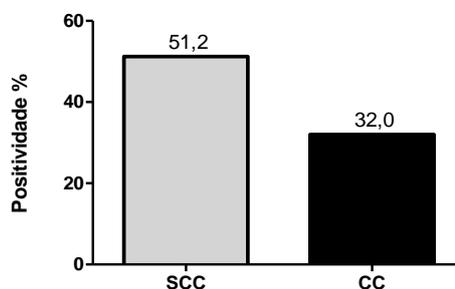


Figura 4: Positividade da qPCR-rep529 em crianças com e sem calcificações cerebrais. O número acima das barras significa a porcentagem das crianças com resultado molecular positivo dentre aquelas sem calcificações cerebrais (SCC) ou com calcificações cerebrais (CC).

A tabela 5 apresenta os resultados do diagnóstico molecular comparados com os obtidos pela avaliação oftalmológica em crianças consideradas positivas pela sorologia após 12 meses de vida. A qPCR-rep529 foi positiva em 54% (61/113) das crianças com retinocoroidite, enquanto naquelas que não apresentavam lesões oculares, a positividade foi de apenas 29,7% (11/37), $p=0,013$ (Figura 5).

Tabela 5: Associação entre o resultado da qPCR-rep529 e a presença ou ausência de lesão oftalmológica dentre as 150 crianças com persistência de IgG anti-*T. gondii* após 12 meses de vida ($p=0,013$).

		Lesão oftalmológica		
		Retinocoroidite	SL	TOTAL
qPCR - rep529	POSITIVO	61	11	72
	NEGATIVO	52	26	78
TOTAL		113	37	150

SL - Sem lesão oftalmológica

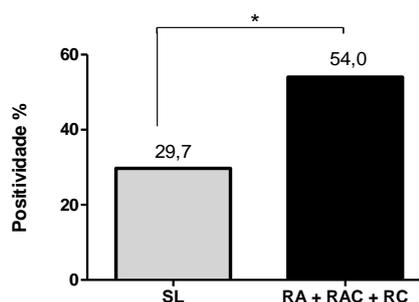


Figura 5: Positividade da qPCR-rep529 em crianças com e sem retinocoroidite. O número acima das barras significa a porcentagem das crianças com resultado molecular positivo dentre aquelas sem lesões oftalmológicas (SL) ou com retinocoroidite, independente do tipo de lesão oftalmológica (RA + RAC + RC). * Diferença significativa, $p=0,013$.

Considerando o resultado anteriormente obtido em relação à retinocoroidite descrito anteriormente, a tabela 6 apresenta a categorização das lesões oculares de acordo com a sua apresentação clínica (retinocoroidite ativa, retinocoroidite cicatrizada ou simultaneamente retinocoroidite ativa e cicatrizada) comparadas aos resultados da qPCR-rep529. As diferenças foram significativas entre os grupos ($p=0,021$). Dentre as crianças que apresentavam lesão ativa, 68,4% (13/19) foram positivas pela PCR em tempo real, resultado estatisticamente diferente daquelas sem lesão, cuja positividade foi de 29,7% (11/37), $p=0,009$. Também foi observada diferença significativa entre as crianças sem lesão ocular e aquelas com retinocoroidite cicatrizada (21/37, 56,8%), $p=0,034$. Entretanto, 47,4% (27/57) das crianças que apresentavam simultaneamente lesões típicas de retinocoroidite ativa e cicatrizada apresentaram diagnóstico molecular positivo, o que não foi estatisticamente diferente daquelas crianças sem lesão ocular, $p=0,131$ (Figura 6).

Tabela 6: Associação entre o resultado da qPCR-rep529 e o tipo de lesão oftalmológica dentre as 150 crianças com persistência de IgG anti-*T. gondii* após 12 meses de vida ($p=0,021$).

		Lesão oftalmológica				
		RA	RAC	RC	SL	TOTAL
qPCR	POSITIVO	13	27	21	11	72
	NEGATIVO	6	30	16	26	78
TOTAL		19	57	37	37	150

RA – Retinocoroidite Ativa, RC – Retinocoroidite Cicatrizada, RAC - Retinocoroidite Ativa e Cicatrizada, SL - Sem lesão oftalmológica.

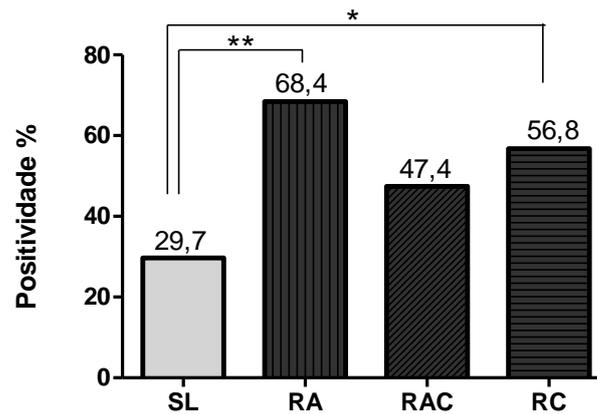


Figura 6: Positividade da qPCR-rep529 em crianças com diferentes manifestações de retinocoroidite. O número acima das barras significa a porcentagem das crianças com resultado molecular positivo dentre o grupo sem lesões oftalmológicas (SL) e com lesões oftalmológicas ativas (RA), ativas e cicatrizadas (RAC) e apenas cicatrizadas (RC). * Diferença significativa, $p = 0,034$. ** Diferença significativa, $p = 0,009$.

Considerando os resultados obtidos, a tabela 7 apresenta os valores de risco relativo para todos os sinais clínicos analisados. O risco relativo de uma criança ter lesão ocular, uma vez que a qPCR-rep529 é positiva é 1,8 vezes maior do que em uma criança com o diagnóstico molecular negativo. Ao considerar isoladamente cada tipo de lesão oftalmológica pode-se observar que as crianças que apresentam qPCR-rep529 positiva tem o risco 2,3 vezes maior de apresentar lesão ocular ativa e no caso das lesões cicatrizadas o risco é 1,9 vezes maior. O risco relativo para desenvolvimento simultâneo de lesões oculares ativas e cicatrizadas, assim como para a presença de calcificações cerebrais ou déficit auditivo, não possuem relevância estatística.

Tabela 7: Risco relativo para sinais clínicos em crianças com toxoplasmose congênita em relação aos resultados da qPCR-rep529.

Sinais Clínicos (n/N)	qPCR-rep529		
	RR	IC (95%)	p valor
Lesão Ocular (113/150)	1,816	(1,075 – 3,066)	0,013
Retinocoroidite ativa (19/150)	2,301	(1,286 – 4,119)	0,009
Retinocoroidite ativa e cicatrizada (57/150)	1,593	(0,904 – 2,806)	0,131
Retinocoroidite cicatrizada (37/150)	1,909	(1,080 – 3,375)	0,034
Calcificações cerebrais (25/150)	0,625	(0,344 – 1,135)	0,123

n: número de crianças com sinal clínico. N: número total de crianças submetidas à avaliação clínica; qPCR-rep529: PCR quantitativa; RR: Risco Relativo; IC: Intervalo de Confiança de 95%;

5.4.2. RESULTADOS QUANTITATIVOS DA QPCR-REP529 EM SANGUE DE CRIANÇAS COM SUSPEITA DE TOXOPLASMOSE CONGÊNITA CONFIRMADA

A análise da carga parasitária no sangue periférico dos recém-nascidos foi feita considerando apenas as 72 amostras com diagnóstico molecular positivo dentre aquelas que tiveram a infecção pelo *T. gondii* confirmada pela presença de anticorpos IgG específicos aos 12 meses de vida (Tabela 2). Uma amostra foi identificada com valor discrepante em relação aos demais dados, considerada *outlier* (20,55 parasitos/mL) e foi, portanto, retirada das análises estatísticas posteriores. O sangue deste paciente foi coletado aos 63 dias de vida, momento no qual também foram realizados os exames clínicos que identificaram a presença de retinocoroidite ativa e cicatrizada em ambos os olhos, além de hepatoesplenomegalia. O bioensaio com elementos celulares do sangue deste bebê foi positivo e resultou no isolamento da cepa TgCTBr25. Essa cepa apresentou caráter virulento em camundongos, com letalidade de 100% mesmo com inóculo de um único parasito, e genótipo recombinante ainda não descrito na literatura (Carneiro *et al.*, 2010; Carneiro *et al.*, 2011).

A mediana da carga parasitária das 12 amostras que foram positivas na qPCR-rep5529 embora negativas para a presença de anticorpos IgG anti-*T. gondii* aos doze meses de vida não foi diferente da mediana das demais 71 amostras positivas para ambos os testes ($p=0.113$). Cinquenta por cento destas amostras (6/12) tiveram carga menor do que 0,1 parasito/mL, porém duas crianças apresentaram carga parasitária estimada maior do que um taquizoíto/mL.

Os valores obtidos pela quantificação relativa da carga parasitária no sangue das 71 amostras restantes não seguem a distribuição Gaussiana. O número de parasitos por mililitro estimado pela qPCR-rep529 em tempo real foi, em geral, pequeno. O valor mínimo encontrado foi de 0,005 parasitos/mL e o valor máximo 6,14 parasitos/mL, sendo que a mediana foi de 0,133 parasitos/mL. A frequência de distribuição da parasitemia pode ser observada na figura 7. Neste histograma está representado o número de amostras (eixo Y) pertencente a cada categoria de valores de carga parasitária (eixo X). Quarenta e nove amostras (68%) apresentaram carga menor que 0,5 parasitos/mL.

Das sete crianças que apresentaram mais de 1 taquizoíto/mL de sangue total, duas possuíam lesão ativa e cicatrizada e cinco possuíam retinocoroidite cicatrizada. Uma delas teve o resultado de bioensaio positivo (TgCTBr 24).

Não foi encontrada uma correlação significativa entre a carga parasitária dos recém-nascidos positivos na qPCR-rep529 e a idade destas crianças no momento da coleta de sangue ($p= 0,677$).

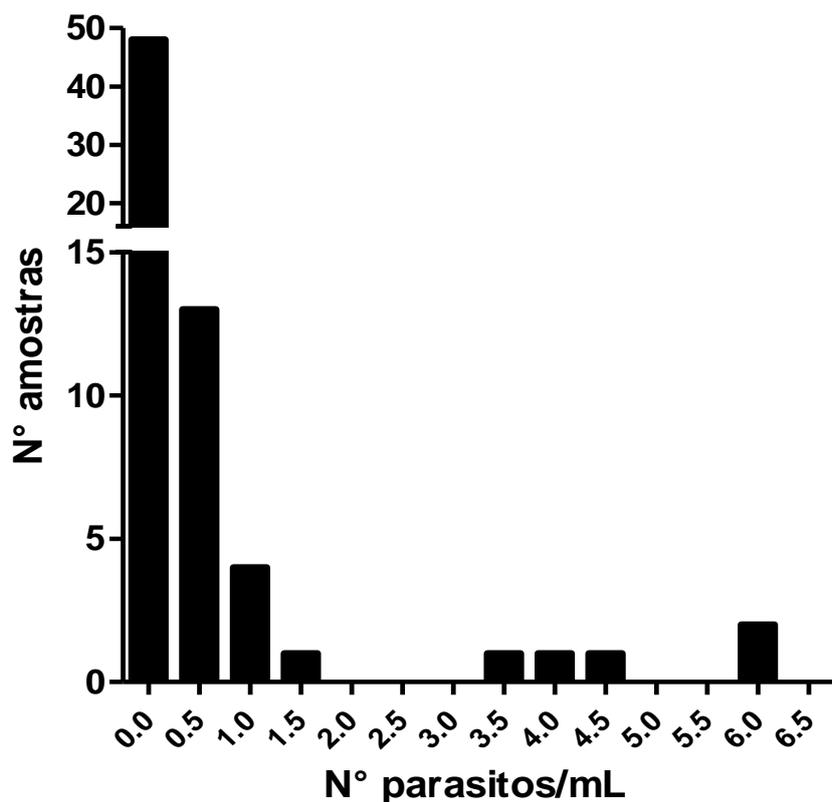


Figura 7: Histograma de frequência de distribuição da carga parasitária de *T. gondii* estimada pela qPCR-rep529 nas amostras de DNA de sangue periférico de 71 crianças.

A carga parasitária estimada no sangue através da PCR em tempo real foi comparada entre os grupos de crianças com as formas clínicas de TC avaliadas nesse estudo. Em relação às calcificações cerebrais, não houve diferença significativa entre as medianas da parasitemia nas crianças com e sem calcificações cerebrais, $p=0,743$ (Figura 8). Da mesma forma, quando foram consideradas as alterações oftalmológicas, não houve diferença entre a carga parasitária nas crianças que apresentavam alguma lesão ocular e naquelas sem nenhuma lesão, $p=0,413$ (Figura 9). A figura 10 apresenta a distribuição da carga parasitária considerando os diferentes tipos de lesão ocular. Também não foi observada diferença significativa entre os diferentes tipos de lesão no que diz respeito ao número de taquizoítos por mililitro de sangue ($p=0,172$).

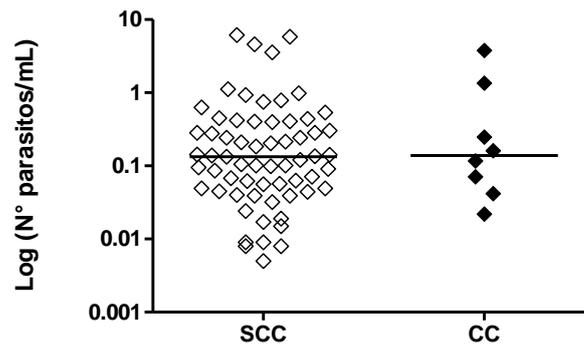


Figura 8: Comparação da carga parasitária no sangue periférico dentre as crianças que não apresentam calcificações cerebrais (SCC) e as que possuem calcificações cerebrais (CC).

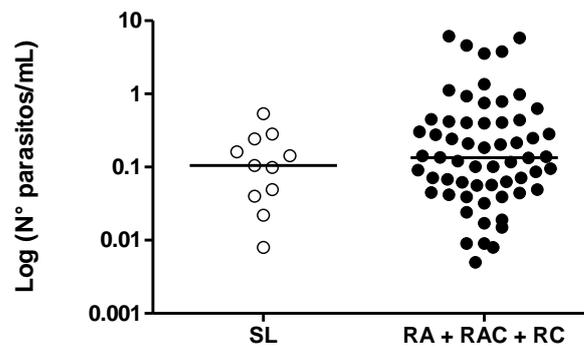


Figura 9: Comparação da carga parasitária no sangue periférico dentre as crianças que não apresentam lesões oftalmológicas (SL) e as que possuem lesões oftalmológicas independente do tipo (RA + RAC + RC).

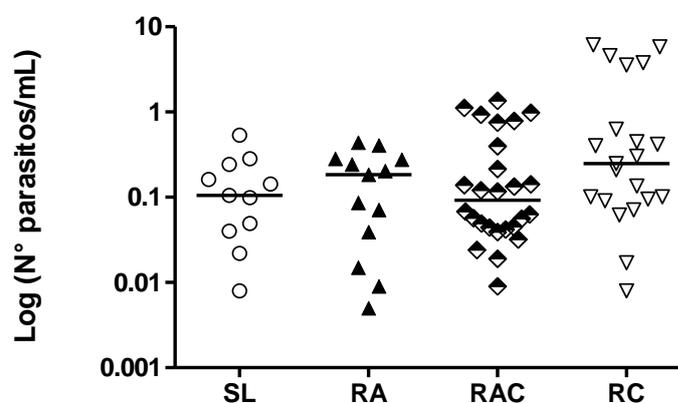


Figura 10: Comparação da carga parasitária no sangue periférico dentre as crianças que não apresentam lesões oftalmológicas (SL) e as que possuem lesões oftalmológicas ativas (RA) ativas e cicatrizadas (RAC) e cicatrizadas (RC).

Todas as análises descritas neste item 5.4.1 foram realizadas levando-se em consideração apenas as 72 crianças positivas por qPCR-rep529 e com infecção confirmada pela persistência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* aos 12 meses de vida (ver Tabela 2), exceto uma criança *outlier*. Posteriormente todas as análises foram refeitas considerando todas as 84 crianças positivas pela qPCR-rep529 identificadas na triagem inicial realizada pela pesquisa de anticorpos IgM anti-*T. gondii* pelo Teste do Pezinho. Realizando as análises com estas 84 crianças, não ocorreu alteração da significância em nenhum dos resultados descritos anteriormente para 71 amostras (dados não mostrados).

6. DISCUSSÃO

O diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita é essencial no curso da doença, pois permite o início do tratamento antiparasitário a fim de minimizar as consequências clínicas da toxoplasmose e ainda o risco de perdas durante o acompanhamento dos recém-nascidos até que um diagnóstico definitivo esteja estabelecido (Sterkers *et al.*, 2011).

O ideal, portanto é que se estabeleça um diagnóstico ainda durante a gestação. A identificação da soroconversão materna e o início do tratamento, entretanto, não impedem integralmente a transmissão do parasito ao feto, como observado por Robert-Gangneux e colaboradores em 2010, onde quarenta e cinco por cento das mães identificadas na triagem pré-natal e que receberam tratamento com espiramicina durante a gestação foram positivas para o diagnóstico molecular da toxoplasmose através de PCR na placenta.

Na tentativa de avaliar a infecção fetal o mais cedo possível comumente é realizada a PCR no líquido amniótico. Apesar de oferecer alguns riscos, a PCR em fluido amniótico para a detecção de DNA específico do *T. gondii* realizada até os 18 semanas de gestação é mais sensível, rápida e segura do que o diagnóstico envolvendo amostra de sangue fetal (Remington *et al.*, 2004). Entretanto, alguns autores relatam que o aparecimento de sintomas nos fetos pode ocorrer posteriormente à amniocentese (Romand *et al.*, 2004).

A confirmação da fase aguda da toxoplasmose é de extrema importância para a definição do tipo de tratamento que o paciente receberá. Após o nascimento da criança, basicamente, essa confirmação se dá por parâmetros sorológicos muitas vezes demorados, com avaliações após um ano de vida. Considerando, portanto, todas as

dificuldades envolvidas no diagnóstico da toxoplasmose congênita tanto durante a gestação quanto após o nascimento do bebê, apesar de ser bem menos usual, a realização de PCR em sangue periférico de recém-nascidos com suspeita de infecção congênita pode ser mais uma ferramenta, com valor significativo na definição do diagnóstico (Sterkers *et al.*, 2011).

Do total de 220 amostras de DNA, extraído de sangue periférico dos recém-nascidos, cinco apresentaram inibição da qPCR, evidenciada pela ausência de amplificação da β -globina humana. Esse fato ocorreu apesar das amostras terem sido previamente testadas em cnPCR utilizando o mesmo alvo e, inclusive, o mesmo par de iniciadores. É descrito na literatura que os inibidores de PCR podem afetar especificamente um alvo e não outro. Esse fato foi observado por Filisetti e colaboradores em 2003 ao testarem a mesma amostra em três diferentes reações com iniciadores que amplificavam como alvo as regiões 18S, B1 e rep529. No caso do presente estudo, a sequência de iniciadores e o alvo são os mesmos, porém as condições de reação são distintas. As variações nas concentrações dos componentes do mix de reação, a presença da molécula repórter (*Sybr Green*), assim como o tipo de Taq polimerase utilizada, podem justificar a inibição da PCR em tempo real apesar da ausência de inibição na cnPCR.

A eficiência calculada para os iniciadores utilizados para o diagnóstico (Menotti *et al.*, 2010) pela qPCR-rep529 foi superior a 90%. Por esse motivo, foi considerada boa, porém não excelente. Essa eficiência parcialmente limitada pode ter sido um dos fatores que favoreceram o aparecimento de produtos inespecíficos em algumas amostras. A observação desta inespecificidade se deu primeiramente pela apresentação incomum de picos na curva de dissociação e posteriormente pela confirmação das bandas em gel de poliacrilamida corado pela prata.

Alguns trabalhos ressaltam que a quantidade de DNA genômico humano pode interferir na qualidade de detecção do DNA do parasito (Mattos *et al.*, 2011). Porém, antes de serem testadas na qPCR, as amostras foram quantificadas e diluídas para uma concentração padronizada (25 ng/μL). Dessa forma 75% das amostras foram testadas com um total de 100ng de DNA, restringindo o efeito deste interferente. As demais 25% possuíam uma concentração de DNA menor que 25ng/μL e, portanto, foram utilizadas sem diluir.

Conforme demonstrado pela quantificação da carga parasitária, a quantidade de DNA do *T. gondii* presente nas amostras de sangue periférico dos bebês era, de fato, muito pequena. Além disso, a extração do DNA ocorreu em um volume bastante reduzido de sangue, apenas 300μL.

Edvinsson e colaboradores em 2006, avaliando esse alvo para o diagnóstico da toxoplasmose, concluíram que em comparação ao B1, rep529 é mais sensível e acurado quando a reação é feita com pequenas quantidades de DNA do parasito, possuindo 10 ou menos genoma equivalente de *T. gondii*.

Avaliando o valor diagnóstico da PCR, Cassaing e colaboradores (2006) ressaltam a necessidade das amostras suspeitas serem testadas em duplicata. Em seu trabalho ocorreram dois casos em que apenas uma repetição da duplicata foi positiva. Entretanto, no presente estudo as amostras não foram testadas em duplicata e em contrapartida, foi analisada a capacidade de reprodutibilidade da técnica utilizando uma quantidade significativa das amostras (20%). A reprodutibilidade calculada foi considerada boa, aproximadamente 83%, o que aumenta a confiabilidade dos resultados obtidos.

6.1. ANÁLISE QUALITATIVA EM AMOSTRAS DE SANGUE DE RECÉM-NASCIDOS PELA qPCR-REP529

A baixa especificidade relativa da qPCR-rep529 encontrada nesse estudo (64%) se deve às 12 amostras com resultado positivo para o diagnóstico molecular apesar da ausência de confirmação sorológica da infecção congênita via persistência de IgG anti-*T.gondii* após 12 meses de vida.

Esses resultados podem ocorrer em decorrência de uma inespecificidade do alvo e/ou limitação da técnica de PCR em tempo real. A presença de “falso positivos” também foi relatada por Mesquita e colaboradores assim como por Wahab e colaboradores, ambos no ano de 2010, trabalhando com pacientes HIV positivos. Os autores observaram uma baixa especificidade na qPCR utilizando o alvo rep529 em comparação ao B1. Cerca 10% das amostras negativas apresentaram resultado positivo quando este alvo foi utilizado, principalmente em amostras de DNA extraído de sangue.

Entretanto, em outros trabalhos essa perda de especificidade não é relatada (Filisetti *et al.*, 2003; Menotti *et al.*, 2010). Filisetti e colaboradores (2003) utilizando diferentes alvos (B1, 18S e rep529) para o diagnóstico da TC no líquido amniótico e sangue do cordão umbilical e tendo critérios sorológicos para a confirmação ou exclusão da infecção, demonstraram a ocorrência de resultado falso positivo por qPCR-B1, porém não por qPCR-rep529.

Além disso, apesar do uso frequente de testes imunológicos no diagnóstico da TC, a confirmação sorológica está longe de ser conclusiva. Atualmente, um dos métodos convencionais mais utilizados para a confirmação da toxoplasmose congênita é a pesquisa continuada de anticorpos IgG anti-*T. gondii* até 12 meses de vida (Pinon *et al.*, 2001; Kompalic-Cristo *et al.*, 2004; Kompalic-Cristo *et al.*, 2007; Vasconcelos-Santos

et al., 2009; Machado *et al.*, 2010). Todavia, observa-se em alguns recém-nascidos e indivíduos imunossuprimidos, ausência da produção dessa imunoglobulina devido à imaturidade do sistema imune e queda da produção de células CD4+, respectivamente (Guy & Joynson, 1995; Kompalic-Cristo *et al.*, 2007).

O desenvolvimento da resposta imune inicia na embriogênese e somente torna-se maduro após a adolescência. Em comparação com os adultos, as células dos recém-nascidos têm menor capacidade funcional e produzem menos citocinas. Durante a primeira semana de vida, os recém-nascidos tem um grande aumento no número de linfócitos, de forma que o desenvolvimento desta célula pode ser considerado extra uterino. Porém, os linfócitos recém produzidos ainda são pouco funcionais, com baixa produção de IL-12, não estando aptos a responder prontamente. Além disso, essas células necessitam de maior estímulo para tal. Após o nascimento, com o aumento da exposição à antígenos exógenos, observa-se um aumento no repertório de IgG. Apesar disso, com um ano de vida, os níveis de IgG de uma criança ainda somam apenas 70% dos níveis de um adulto (Ygberg & Nilsson, 2012). Dessa forma, a sorologia positiva para o *T. gondii* em casos de imunossupressão ou de imaturidade imunológica (casos congênitos) se torna apenas um indicativo da infecção (Spalding 2002).

Alguns autores relatam ainda que crianças tratadas continuamente com sulfadiazina e pirimetamina podem ter a síntese desses anticorpos suprimida temporariamente possibilitando assim possíveis resultados falso negativos (Carvalho *et al.*, 2005; Petersen 2007).

A detecção direta do *T. gondii* no sangue ou em outras amostras clínicas, por sua vez, confirma a presença do parasito que conduz ao diagnóstico conclusivo da toxoplasmose. A PCR realizada em fluidos corporais como sangue e líquido amniótico representa uma

alternativa pouco invasiva de diagnóstico da infecção (Kompalic-Cristo *et al.*, 2007; Wahab *et al.*, 2010). A possibilidade de se detectar o *T. gondii* em sangue humano através do diagnóstico molecular foi descrita primeiramente por Ho-Yen e colaboradores (1992) e, recentemente, sua aplicação no diagnóstico neonatal foi observada (Sterkers *et al.*, 2011). Este grupo avaliou a cnPCR em sangue periférico de recém-nascidos com menos de três semanas de vida como uma alternativa ainda pouco usual no auxílio do diagnóstico da toxoplasmose congênita. Testados isoladamente, o fluido amniótico, a placenta e o sangue do cordão umbilical, tanto na cnPCR quanto na inoculação em camundongos, assim como o screening sorológico ao nascimento, não contribuíram para o diagnóstico da TC. A PCR, por outro lado, foi positiva em 83% dos casos (5/6) (Sterkers *et al.*, 2011).

No presente estudo, das 12 crianças com resultado positivo pela qPCR apesar da ausência de anticorpos IgG anti-*T.gondii*, quatro não apresentam nenhum dado clínico sugestivo da ocorrência da infecção congênita. As crianças nasceram a termo. A sorologia materna durante os exames confirmatórios demonstrou a presença de anticorpos específicos IgG e ausência de IgM, indicando possivelmente uma infecção materna mais antiga. Nenhuma das crianças sequer foi tratada e elas receberam alta ao longo do primeiro ano de vida (a primeira com 7 meses de vida, a segunda com 10 e as outras duas com 12 meses) pela ausência de anticopos anti- *T. gondii* no soro.

Outras quatro crianças também não possuíam nenhum sinal clínico, entretanto, a sorologia materna no momento dos testes confirmatórios, realizados em média aos dois meses de vida do bebê, detectou a presença de IgM assim como de IgG anti-*T. gondii*.

Foi detectada a presença de anticorpos IgM e IgG anti-*T. gondii* no soro da mãe da 9ª criança aos 7 meses de gestação. Não existem dados de exames anteriores realizados no

pré-natal desta gestante. Apesar disto, a gestante não recebeu medicamento antiparasitário. A criança nasceu a termo e recebeu alta aos 11 meses de vida sem apresentar nenhum sinal clínico da toxoplasmose.

De maneira similar observou-se a presença de IgM anti-*T. gondii* no soro das mães das crianças n° 10 e 11 durante o período gestacional. Na décima criança, a detecção ocorreu no segundo mês de gestação e a grávida utilizou espiramicina por três meses. A criança nasceu a termo, sem alterações clínicas e recebeu alta do projeto com um ano e três meses de vida. No caso da décima primeira criança, a detecção de IgM se deu no quarto mês de gestação e a grávida utilizou espiramicina por aproximadamente dois meses. A criança nasceu a termo e aos seis meses de vida apresentou numerosos pontos de atrofia em ambos os olhos, avaliados como alterações constitucionais pelo oftalmologista DVVS (colaborador deste trabalho) e aos 12 meses de vida apenas um pequeno ponto de atrofia foi observado no olho esquerdo. A criança recebeu alta após um ano e quatro meses de vida.

Foi identificada a presença de IgM anti-*T. gondii* no soro materno ainda no primeiro mês de gestação da 12° criança. A gestante foi medicada com espiramicina e o tratamento perdurou até o fim da gestação. Durante o parto a criança aspirou mecônio sofrendo com hipóxia. Ao nascimento foi observado retinocoroidite no olho direito, porém, no momento do diagnóstico foi observado o fundo de olho em “sal e pimenta” não sugestivo de toxoplasmose. A criança apresentou comprometimento neurológico com hipotonia cervical importante e foi solicitado sorologia para rubéola, citomegalovírus e VDRL além de toxoplasmose, porém o resultado foi negativo. Com 10 meses de vida a criança não sentava e não seguia com o olhar além de apresentar microcefalia e estrabismo. Com 12 meses de vida a criança recebeu alta do projeto pela sorologia repetidamente negativa para toxoplasmose sendo mantido, porém, o

acompanhamento com pediatra e neurologista. Todas essas doze crianças tiveram a medicação suspensa antes da realização do último teste sorológico.

Bidgoli e colaboradores (2011) também relatam discordância entre sorologia e diagnóstico molecular. Em seu trabalho os autores descrevem um caso de retinocoroidite macular recorrente em um paciente de 13 anos de idade com história de infecção congênita. Os resultados de sorologia permaneciam repetidamente negativos ou inconclusivos. Entretanto, a etiologia da lesão pôde ser confirmada pela detecção de DNA do *T. gondii* no humor vítreo.

No mesmo ano, Ferreira e colaboradores (2011) realizaram diagnóstico laboratorial através de cnPCR e qPCR e imunofluorescência em 20 pacientes com suspeita de toxoplasmose congênita ou adquirida. Os autores observaram um paciente de 29 anos, negativo para HIV, com sorologia negativa tanto para IgM quanto para IgG e diagnóstico molecular positivo em amostra de sangue periférico. Esse paciente apresentava toxoplasmose cerebral aguda e focal, confirmada por histopatologia de amostra cerebral.

Sterkers e colaboradores (2011) avaliando a presença do parasito em sangue periférico de 12 recém-nascidos com suspeita de TC encontraram, em um dos seis casos confirmados, a cnPCR positiva apesar da sorologia e imunoblotting negativos. Os autores atribuíram esse fato à contaminação materna ter sido tardia (aproximadamente 39 semanas de gestação). Desta forma a cnPCR no sangue periférico foi o primeiro teste que confirmou o diagnóstico de TC.

A sensibilidade da qPCR-rep529 em relação à persistência de IgG anti-*T. gondii* após o 12º mês de vida foi baixa (48%). Entretanto esses dados são concordantes com resultados publicados por outros grupos. Realizando o diagnóstico de TC em fluido

amniótico, Filisetti e colaboradores (2003) encontraram uma sensibilidade de 42% para o alvo rep529. Fekkar e colaboradores em 2008 obtiveram uma sensibilidade de 38,2% e no estudo de Talabani e colaboradores (2009) a sensibilidade obtida foi de 55%, ambos trabalhando com amostras de humor aquoso. Contudo, utilizando DNA extraído de 5 mL de sangue periférico de pacientes com suspeita de toxoplasmose cerebral, Mesquita e colaboradores (2010) encontraram uma sensibilidade maior, de 97,2%.

A ocorrência de resultados falso negativos nesse estudo pode ser explicada, em parte, pelo tamanho reduzido da amostra clínica submetida à extração de DNA, apenas 300µL de sangue periférico. Como a distribuição do parasito nos tecidos e fluidos corporais não é homogênea, o tamanho da amostra submetida à extração de DNA deve ser considerado um ponto chave nessa questão. Cassaing e colaboradores (2006) obtiveram uma diferença significativa nos valores de C_T obtidos quando compararam volumes diferentes (4 e 7 mL) de líquido amniótico submetidos à extração de DNA. Conseqüentemente, um resultado de PCR negativo não exclui definitivamente a presença do *T. gondii* em uma amostra clínica (Reischl *et al.*, 2003).

A sensibilidade do teste utilizado nesse estudo provavelmente seria aumentada caso o volume de sangue submetido à extração de DNA fosse maior. Porém, esse fato é inviável por questões éticas uma vez que os pacientes são recém-nascidos. Outra alternativa seria realizar a coleta até no máximo a terceira semana de vida dos bebês, devido a transitoriedade da parasitemia e baixa carga parasitária em recém-nascidos mais velhos (Yo-Hen *et al.*, 1992; Mesquita *et al.*, 2010), o que não foi possível pela logística metodológica do trabalho.

Pelos baixos valores de especificidade e sensibilidade em relação ao teste de pesquisa de IgG anti-*T. gondii* aos 12 meses de vida, a concordância calculada pelo índice *Kappa* (0,06) foi considerada muito fraca.

Quando os resultados obtidos na qPCR foram comparados ao isolamento por bioensaio em camundongos observamos que das amostras com resultado positivo pelo bioensaio, 44% foram negativas para a qPCR-rep529. Resultados similares são descritos em alguns trabalhos (Homan *et al.*, 2000; Higa *et al.*, 2010), nos quais foram observadas concordâncias em torno de 50% entre os testes moleculares e bioensaio em camundongo. Essas diferenças podem estar relacionadas ao volume da amostra utilizada em cada teste. O DNA utilizado na qPCR foi extraído de 300µL de sangue periférico total enquanto que, no bioensaio, foram inoculados os elementos celulares obtidos de aproximadamente 0,5 mL de sangue.

Considerando os resultados positivos na qPCR e negativos no bioensaio, é possível que fatores genéticos do hospedeiro conjugados com baixa carga parasitária possam levar à morte do parasito e persistência de DNA residual sendo, portanto, a causa dos resultados discrepantes (Robert-Gangneux *et al.*, 2010). Já foi relatado que o diagnóstico molecular de amostras de sangue de recém-nascidos é mais sensível que a inoculação em camundongos (Castro *et al.*, 2001; Costa *et al.*, 2009). Quando se faz uso de inoculação de sangue em camundongos, junto com as células utilizadas podem estar presentes fatores inibitórios de proliferação do parasito. Por outro lado, frações do genoma do parasito podem ser identificadas por PCR, porém não são viáveis para a proliferação em camundongos (Spalding *et al.*, 2002).

Neste trabalho também foram analisadas possíveis associações da qPCR-rep529 com os dados clínicos dos recém-nascidos. A presença ou ausência de DNA do parasito,

definida pela qPCR-rep529, foi associada à presença ou ausência dos sinais clínicos apresentados pelas crianças nas quais a TC havia sido confirmada pela persistência de IgG específico após um ano de vida (n = 150).

Não foi possível observar nenhum tipo de associação estatística significativa quando consideramos a presença de calcificações cerebrais. O número de crianças que apresentaram calcificação craniana foi pequeno, apenas 25 em 150, o que provavelmente limita a avaliação estatística comparativa entre os grupos definidos pela avaliação do sinal clínico em questão. Também não foi observada uma medida de associação significativa, através do valor de risco relativo, para este grupo de crianças.

Por outro lado, a associação entre a positividade pela qPCR-rep529 e a presença de lesões oculares foi significativa ($p=0,013$). A retinocoroidite é o tipo de lesão mais frequente associada à infecção congênita pelo *T. gondii*. Cinquenta e quatro por cento dos pacientes com retinocoroidite, independente do tipo de lesão, apresentaram qPCR positiva. A partir desta observação realizamos o cálculo de associação através do risco relativo, sendo demonstrado que os recém-nascidos com TC tem 1,8 vezes mais chance de apresentar lesão ocular, no caso da qPCR positiva, do que se forem negativos para o teste molecular. Esses resultados são ainda mais interessantes se for considerado o fato de que na América do Sul as lesões oftalmológicas são mais graves que as encontradas na América do Norte ou Europa (Gilbert *et al.*, 2008; Vasconcelos-Santos & Queiroz Andrade, 2011).

Ao categorizarmos o tipo de lesão ocular foi possível identificar que a maioria das crianças com retinocoroidite ativa (68%) foram positivas na qPCR-rep529 e, quando comparadas às crianças sem lesão, cuja positividade foi de 29,7% essa diferença foi estatisticamente significativa. Observamos também uma maior positividade entre as

crianças que possuíam lesões simultaneamente ativas e cicatrizadas (47,4%) em relação às aquelas sem lesão, contudo esse aumento não foi significativo em termos estatísticos. Em relação às crianças com lesões cicatrizadas a diferença foi novamente significativa, uma vez que a positividade neste grupo foi de 56,8%. Os resultados obtidos nesse estudo demonstram que é possível detectar DNA do parasito em sangue periférico dos pacientes com infecção ocular ainda que cicatrizada.

O tipo de lesão ocular demonstrou influenciar a associação observada entre qPCR - rep529 e retinocoroidite. Foi observado que o risco de uma criança ter lesão ocular ativa (RA), considerando o diagnóstico molecular positivo, é 2,3 vezes maior do que naquelas com resultado negativo. No caso das lesões cicatrizadas (RC) esse risco é um pouco menor, 1,9. Contudo, o cálculo de risco relativo para as crianças com RAC não foi significativo e deve ser desconsiderado, uma vez que o intervalo mínimo de confiança (95%) é menor que 1.

De maneira similar aos resultados obtidos nesse trabalho, o DNA do *T. gondii* foi encontrado em 90% das amostras de sangue de pacientes com RA e em 50% das amostras de sangue dos pacientes com RC no estudo realizado por Silveira e colaboradores em 2011. Os autores avaliaram a toxoplasmose ocular em adultos imunocompetentes e não categorizaram a presença simultânea de lesões ativas e cicatrizadas. Os autores sugerem que os resultados obtidos pela cnPCR com o gene B1 indicam que uma parasitemia subclínica está presente em pacientes com toxoplasmose tanto aguda como crônica, independentemente da presença de lesões oculares ativas ou apenas de cicatrizes.

Por outro lado, Mattos e colaboradores em 2011 encontraram a maioria dos resultados positivos na PCR (75%) oriundos de amostras de sangue de pacientes com cicatrizes de

retinocoroidite, e apenas 25% dos resultados positivos foram encontrados em sangue de pacientes com lesão exudativa, ou seja, ativa.

É possível que a prevalência de PCR positiva seja maior nos indivíduos com retinocoroidite ativa porque a parasitemia resultaria da multiplicação e disseminação do parasito a partir da retina e não vice-versa (Silveira *et al.*, 2011). Contudo, a casualidade simples não pode ser inferida somente a partir da observação da parasitemia nos pacientes com retinocoroidite ativa. Durante os primeiros dias de uma lesão ativa, o DNA do *T. gondii* atinge o sangue via circulação coroidal ou drenagem do humor aquoso e os níveis do parasito se tornam detectáveis. Essa hipótese é corroborada pelo fato da maioria das recorrências oculares ocorrerem na borda ou perto das lesões antigas (Contini *et al.*, 2005).

No presente estudo as crianças com retinocoroidite cicatrizada (RC) apresentaram maior positividade do que aquelas que tinham simultaneamente lesões ativas e cicatrizadas (RAC). Apesar da categorização do tipo de lesão, a manifestação ocular trata-se de um processo dinâmico. As crianças com RAC possuem ativação da resposta imunológica frente à inflamação e infecção presentes, evidenciada pelo início do estabelecimento do processo cicatricial. Por outro lado, nos recém-nascidos com RC, essa resposta já ocorreu e o exame de fundo de olho demonstrou apenas a presença de cicatriz como resultado do processo. De acordo com Cortina-Borja e colaboradores (2010) os períodos de reativação em recém-nascidos infectados pela via congênita são mais frequentes. Apesar da maioria das recorrências oculares ocorrerem na borda das lesões antigas, novas lesões também podem ocorrer distantes destas e a parasitemia em curso em tais pacientes pode ajudar a explicar tais ocorrências (Silveira *et al.*, 2011). Portanto, é possível que a identificação do parasito no sangue dos recém-nascidos com RC esteja ocorrendo anteriormente aos eventos de recorrência das lesões oculares. As crianças

deste estudo foram submetidas ao início do tratamento antiparasitário logo após a coleta de sangue para qPCR-rep529, não sendo possível que esta hipótese fosse confirmada.

6.2. ANÁLISE QUANTITATIVA PELA QPCR-REP529 EM AMOSTRAS DE SANGUE DE RECÉM-NASCIDOS COM TOXOPLASMOSE CONGÊNITA

Sabe-se que na toxoplasmose o número de parasitos presentes em amostras clínicas não é muito grande (Contini *et al.*, 2005) No presente trabalho foi encontrada uma baixa carga parasitária no sangue periférico dos recém-nascidos. Esse resultado era esperado considerando tanto a transitoriedade da parasitemia quanto o avançado tempo de vida dos bebês no momento da coleta de sangue.

Os valores encontrados na estimativa da carga parasitária estão de acordo com os resultados do bioensaio obtido por Carneiro e colaboradores (2010) utilizando amostras de sangue destes mesmos pacientes coletadas simultaneamente ao sangue destinado à extração de DNA e realização da qPCR-rep529. A positividade de isolamento no bioensaio foi pequena (apenas 15%) e dentre todos os isolados, apenas um foi obtido simultaneamente dos dois camundongos utilizados no experimento de bioensaio. Nos demais isolados, somente um dos dois camundongos inoculados com sangue suspeito foi infectado, indicando um baixo número de parasitos viáveis circulantes nas amostras de sangue das crianças.

Romand e colaboradores em 2004 encontraram uma variação maior nos valores obtidos da quantificação do número de parasitos em amostras de líquido amniótico, em relação ao presente estudo. Utilizando o alvo B1, o valor mínimo encontrado foi de 1.1 parasitos/mL e o máximo 8920 parasitos/mL. Entretanto, de maneira similar à nossa, a maioria das amostras (39%) possuíam baixo número estimado de parasitos, menor que 10 parasitos/mL.

Já foi demonstrado um limite de detecção de 1/50 do genoma do parasito nas reações tendo como alvo o elemento repetitivo rep529 (Kasper *et al.*, 2009), o que justifica a capacidade de detecção da carga parasitária pequena, menor que 0,5 parasito/mL, em 68% das amostras analisadas nesse estudo.

Apenas uma amostra apresentou elevada carga parasitária, 20,55 parasitos/mL. A partir do bioensaio com material deste paciente isolou-se a cepa TgCTBr25, posteriormente caracterizada como virulenta para camundongos e apresentando genótipo recombinante. O fenótipo virulento pode estar associado à elevada capacidade de promover a regulação da inflamação através de proteínas efetoras do complexo apical (Melo *et al.*, 2011). Provavelmente, por se tratar de um isolado virulento foi possível encontrar uma carga parasitária elevada na criança, mesmo com 63 dias de vida.

Curiosamente as sete crianças que tiveram carga parasitária estimada maior que 1 parasito/mL possuíam lesão oftalmológica, cinco com RC e duas com RAC. Porém nenhuma delas com RA apenas, apesar das crianças deste grupo terem apresentado as maiores taxas de positividade pela qPCR-rep529. Esse fato pode estar relacionado ao reduzido número de crianças com retinocoroidite exclusivamente ativa dentre o grupo das crianças com lesões oculares (19/113).

A mediana da carga parasitária estimada foi comparada entre cada grupo de manifestação clínica analisada neste trabalho. Não foi observada diferença significativa entre a carga parasitária nas crianças com presença de calcificações cerebrais e aquelas sem este sinal clínico. Da mesma maneira, as crianças com lesão oftalmológica possuem parasitemia similar àquela observada nas crianças sem lesão. Dentre os grupos formados pela categorização dos tipos de retinocoroidite a diferença também não foi significativa.

Diferentemente dos resultados obtidos neste trabalho, Romand e colaboradores (2004) observaram que a concentração média de *T. gondii*, encontrada no fluido amniótico dos infectados sintomáticos, foi significativamente maior do que nos com infecção subclínica. Porém, essa diferença não foi significativa considerando as infecções que ocorreram após a 20ª semana de gestação (Romand *et al.*, 2004). A detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii* que foi utilizada na triagem neonatal do presente estudo favorece, justamente, a detecção de crianças infectadas na segunda metade da gestação (Gilbert *et al.*, 2007).

Outras variáveis podem influenciar a ausência de associações significativas entre carga parasitária e sinais clínicos, por exemplo, as características imunológicas individuais de cada paciente, possuindo maior ou menor capacidade de controle da infecção (Ygberg e Nilsson 2012). A resposta imune pró-inflamatória ocasiona a regulação da infecção com consequente diminuição no número de parasitos nos tecidos. Entretanto, na ausência ou mesmo ineficácia de mecanismos regulatórios, essa mesma resposta efetora pode ocasionar lesões teciduais por processos inflamatórios exacerbados (Munoz *et al.*, 2011).

Outra questão importante é o tempo de infecção. Ao analisarmos a carga parasitária em relação aos dias de vida das crianças, não foi possível estabelecer uma correlação significativa. Esses dados sugerem que a associação entre dias de vida da criança e carga parasitária não é fidedigna porque não é capaz de refletir ou estimar quando ocorreu a infecção materna. Por exemplo, uma gestante pode ter se infectado no último mês da gestação e a criança apresentar parasitemia detectada pela qPCR-rep529 aos 60 dias de vida, enquanto outra gestante poderia ter se infectado no segundo terço de gestação e, ao nascimento, os taquizoítos não estarem mais presentes na circulação sanguínea.

Romand e colaboradores em 2004, observaram associação significativa entre carga parasitária e tempo de infecção, pois foi possível identificar o momento da soroconversão materna uma vez que a triagem foi realizada durante o pré-natal. No caso deste projeto, porém, o tipo de triagem implementada foi a neonatal, impossibilitando análise similar.

Podemos ainda citar, como fator interferente na associação entre carga parasitária e apresentação clínica da TC, as limitações do processo de quantificação relativa realizado neste estudo. Em 2003, Reischl e colaboradores demonstraram que além de possuir um número muito maior de cópias do que o gene B1, o alvo rep529 possui um alto nível de conservação entre as sequências nucleotídicas de cepas e isolados distintos. Todavia, esse trabalho foi realizado com amostras de líquido amniótico na França, onde circulam cepas de genótipo clonal. Provavelmente as amostras continham cepas de *T. gondii* do tipo II, que é o genótipo mais prevalente em casos congênitos na Europa (Su *et al.*, 2006).

Para identificar uma possível variação intra-específica no número de cópias do alvo rep529 foi utilizada uma quantidade padronizada de DNA de oito cepas isoladas através do bioensaio em camundongos. Essas cepas foram anteriormente isoladas por Carneiro e colaboradores (2010) através de bioensaio em camundongos inoculados com amostras de sangue periférico de crianças selecionadas para esse estudo. Todas as cepas apresentaram fenótipo virulento em camundongos, de modo que a dose letal para 100% dos animais é de apenas um taquizoíto. O estudo do genótipo dessas cepas demonstrou um perfil recombinante através da análise por PCR-RFLP. Das oito cepas utilizadas nesse estudo, três compartilham o genótipo tipo BrII e as outras 5 possuem genótipos únicos que ainda não haviam sido descritos na literatura (Carneiro *et al.*, 2011). A quantificação da região repetitiva rep529 apresentou uma variação significativa entre

estes isolados, indicando que pode ocorrer uma variação no número de cópias desta região não codificadora entre as cepas com genótipo recombinantes. Dessa forma, algumas amostras de sangue de recém-nascidos positivas na qPCR poderiam estar com a carga superestimada ou subestimada, já que a curva padrão foi feita com taquizoítos da cepa referência RH, que possui genótipo clonal tipo I, o que pode justificar a ausência de associações significativas entre a estimativa da carga parasitária e as diferentes formas de apresentação clínica da toxoplasmose congênita.

De maneira geral, os resultados deste trabalho demonstraram que a qPCR-rep529 em DNA extraído de sangue periférico de recém-nascidos é uma boa ferramenta para auxiliar no diagnóstico da TC. Em 12 amostras este teste foi o primeiro indicativo de infecção pelo *T. gondii*. Foi demonstrada uma associação significativa entre as lesões oculares e o resultado positivo pela qPCR. E ainda, o risco relativo indica que o monitoramento de *T. gondii* em amostras de sangue periférico pode auxiliar na identificação de pacientes com maior ou menor risco de desenvolverem lesão ocular ativa. Esse fato pode ser determinante na escolha de um esquema terapêutico mais adequado. A sensibilidade do teste foi baixa, podendo ser otimizada caso a coleta de sangue ocorra em recém-nascidos logo após o nascimento. A estimativa da carga parasitária, entretanto, parece possuir falhas e necessita ser validada por outros estudos.

Uma das perspectivas futuras deste estudo é realizar a genotipagem do *T. gondii*, através de PCR-RFLP utilizando onze marcadores descritos por Su e colaboradores em 2009, diretamente nas amostras clínicas que apresentaram maior carga parasitária. O estudo da estrutura populacional do *T. gondii* possibilitaria correlacionar o genótipo do parasito às manifestações da doença (dentre elas a carga parasitária) e dessa forma fornecer marcadores que definam o seu prognóstico. Outra abordagem é realizar a validação da quantificação observando as variações no número de cópias do alvo rep529 em cepas

isoladas de hospedeiros distintos, com diferentes genótipos e padrões de virulência em camundongos. Essa mesma validação pode ser feita *in silico* através de ferramentas de bioinformática utilizando as sequências das cepas cujo genoma completo se encontra depositado no Genbank[®]. E ainda como perspectiva futura deste trabalho está a identificação da banda inespecífica de aproximadamente 200pb que ocorreu de forma recorrente nas amostras que apresentaram produtos inespecíficos.

7. CONCLUSÕES

- A qPCR é pouco específica quando comparada ao teste de persistência de IgG anti *T. gondii* aos 12 meses de vida mas possui sensibilidade razoável no diagnóstico da toxoplasmose em sangue congelado de recém-nascidos com toxoplasmose congênita.
- A qPCR-rep529 possui boa reprodutibilidade.
- Não há associação entre o diagnóstico molecular (qPCR-rep529) e a presença de calcificações cranianas.
- A positividade na qPCR-rep529 é maior nas crianças com lesão oftalmológica.
- Existe associação entre o tipo de lesão ocular e o resultado da qPCR-rep529, corroborada pelo maior risco relativo em crianças com lesão ativa seguido daquelas com lesão cicatrizada.
- A carga parasitária no sangue periférico dos recém-nascidos com toxoplasmose congênita é pequena, porém não correlacionada ao tempo de vida da criança.
- Não há associação entre carga parasitária e presença de calcificações cerebrais ou retinocoroidite.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdul-Ghani R 2011 Polymerase chain reaction in the diagnosis of congenital toxoplasmosis: more than two decades of development and evaluation. *Parasitol Res* 108: 505-512.
- Aigner CP, da Silva AV, Sandrini F, Osorio PD, Poiares L, Largura A 2010. Real-time PCR-based quantification of *Toxoplasma gondii* in tissue samples of serologically positive outdoor chickens. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105: 935-937.
- Andrade GMQ, Resende LM, Goulart EMA, Siqueira AL, Vitor RWA, Januário JN 2008. Hearing Loss In Congenital Toxoplasmosis Detected By Newborn Screening. *Braz J Otorhinolaryngol* 74: 21-28.
- Andrade GMQ, Vasconcelos-Santos DV, Carellos EVM, Romanelli RMC, Vitor RWA, Carneiro ACAV, Januario J 2010. Congenital toxoplasmosis from a chronically infected woman with reactivation of retinochoroiditis during pregnancy. *J Pediatr* 86: 85-88.
- Barbosa IR, de Carvalho Xavier Holanda CM, de Andrade-Neto VF 2009. Toxoplasmosis screening and risk factors amongst pregnant females in Natal, northeastern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103: 377-382.
- Berger F, Goulet V, Le Strat Y, Desenclos JC 2009. Toxoplasmosis among pregnant women in France: Risk factors and change of prevalence between 1995 and 2003. *Rev Epidemiol Sante Publique* 57: 241-248.
- Bidgoli S, Koch P, Caspers L 2011. Toxoplasmic chorioretinitis: positive PCR on vitreous with negative serology for *Toxoplasma gondii*. *J Fr Ophthalmol* 34: 385e1-5.
- Blader IJ, Saeij JP 2009. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. *Apmis* 117: 458-476.
- Bonametti AM, Passos JN, Da Silva EMK, Bortoliero AL 1997. Surto de Toxoplasmose Aguda Transmitida através da Ingestão de Carne Crua de Gado Ovino. *Rev Soc Bras Med Trop* 30: 21-25.
- Bretagne S 2003. Molecular diagnostics in clinical parasitology and mycology: limits of the current polymerase chain reaction (PCR) assays and interest of the real-time PCR assays. *Clin Microbiol Infect* 9:505-511.
- Brown ED, Chau JK, Atashband S, Westerberg BD, Kozak FK 2009. A systematic review of neonatal toxoplasmosis exposure and sensorineural hearing loss. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 73: 707-711.

- Carellos EV, de Andrade GM, de Aguiar RAL 2008. Evaluation of prenatal screening for toxoplasmosis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil: a cross-sectional study of postpartum women in two maternity hospitals. *Cadernos De Saude Publica* 24: 391-401.
- Carneiro ACAV, Andrade GMQ, Januario JN, Carellos EVM, Vasconcelos-Santos D, Romanelli RMC, Costa JGL, Ferreira AM, Vitor RWA 2010. Congenital toxoplasmosis in Minas Gerais, Brazil: Isolation, virulence and molecular diagnosis of *Toxoplasma gondii*. Anais do XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Protozoologia Foz do Iguaçu. Resumo BM123, pg 124
- Carneiro ACAV, Andrade GMQ, Januário JN, Carellos EVM, Vasconcelos-Santos D, Costa JGL, Pinheiro BV, Ferreira AM, Vitor RWA 2011. Caracterização molecular de *Toxoplasma gondii* obtido de casos humanos de toxoplasmose congênita no estado de Minas Gerais. Anais do XXII Congresso Brasileiro de Parasitologia São Paulo, Resumo 934.
- Carvalho CG, Mussi-Pinhata MM, Yamamoto AY, De Souza CBS, Maciel LMZ 2005. Incidence of congenital toxoplasmosis estimated by neonatal screening: relevance of diagnostic confirmation in asymptomatic newborn infants. *Epidemiol Infect* 133: 485-491.
- Cassaing S, Bessieres MH, Berry A, Berrebi A, Fabre R, Magnaval JF 2006. Comparison between Two Amplification Sets for Molecular Diagnosis of Toxoplasmosis by Real-Time PCR. *J Clin Microbiol* 44: 720-724.
- Castro FC, Castro MJBV, Cabral ACV, Filho GB, Vitor RWA, Lana AMA, Andrade GMQ 2001. Comparação dos métodos para diagnóstico da toxoplasmose congênita. *Rev Brasil Gin e Obstetricia* 23: 277-282.
- Cenci-Goga BT, Rossitto PV, Sechi P, McCrindle CME, Cullor JS 2011. Toxoplasma in Animals, Food, and Humans: An Old Parasite of New Concern. *Foodborne Pathog Dis* 8: 751-762.
- Commodaro AG, Belfort RN, Rizzo LV, Muccioli C, Silveira C, Burnier MN 2009. Ocular toxoplasmosis - an update and review of the literature. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 345-350.
- Contini C, Seraceni S, Cultrera R, Incorvaia C, Sebastiani A, Picot S 2005. Evaluation of a Real-time PCR-based assay using the lightcycler system for detection of *Toxoplasma gondii* bradyzoite genes in blood specimens from patients with toxoplasmic retinochoroiditis. *Int J Parasitol* 35: 275-283.
- Cortina-Borja M, Tan HK, Wallon M, Paul M, Prusa A, Buffolano W 2010. Prenatal Treatment for Serious Neurological Sequelae of Congenital Toxoplasmosis: An Observational Prospective Cohort Study. *Plos Med* 7: 1-10.
- Costa JGL, Carneiro ACAV, Andrade GMQ, Januário JN, Carellos EVM, Romanelli RMC, Vitor RWA 2009. Nested PCR do Gene B1 em sangue periférico de

- recem nascidos de Minas Gerais: Diagnóstico da Toxoplasmose Congênita. XVIII Semana de Iniciação Científica da UFMG.
- Delair E, Latkany P, Noble AG, Rabiah P, McLeod R, Brezin A 2011. Clinical Manifestations of Ocular Toxoplasmosis. *Ocul Immunol Inflamm* 19: 91-102.
- Edvinsson B, Lappalainen M, Evengard B 2006. Real-time PCR targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis. *Clin Microbiol Infect* 12: 131-136.
- Elbez-Rubinstein A, Ajzenberg D, Darde ML, Cohen R, Dumetre A, Yera H 2009. Congenital Toxoplasmosis and Reinfection during Pregnancy: Case Report, Strain Characterization, Experimental Model of Reinfection, and Review. *J Infect Dis* 199: 280-285.
- Elsheikha HM 2008. Congenital toxoplasmosis: Priorities for further health promotion action. *Public Health* 122: 335-353.
- El-Nawawi, F. A.; Tawfik, M. A.; Shaapan, R. M 2008. Methods for Inactivation of *Toxoplasma gondii* Cysts in Meat and Tissues of Experimentally Infected Sheep. *Foodborne Pathog Dis* 5: 687- 690.
- Fekkar A, Bodaghi B, Touafek F, Le Hoang P, Mazier D, Paris L 2008. Comparison of Immunoblotting, Calculation of the Goldmann-Witmer Coefficient, and Real-Time PCR Using Aqueous Humor Samples for Diagnosis of Ocular Toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 46: 1965-1967.
- Ferreira AD, Vitor RWA, Gazzinelli RT, Melo MN 2006. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. *Infect Genet and Evol*, 6(1):22-31.
- Ferreira IMR, Vidal JE, Mattos CCB, Mattos LC, Daofeng Q, Chunlei S, Pereira-Chiocola VL 2011. *Toxoplasma gondii* isolates: Multilocus RFLP-PCR genotyping from human patients in Sao Paulo State, Brazil identified distinct genotypes. *Exp Parasitol* 129: 190-195.
- Ferreira Dias RC, Ruiz Lopes-Mori FM, Mitsuka-Bregano R, Ferreira Dias RA, Tokano DV, Vissoci Reiche EM 2011. Factors associated to infection by *Toxoplasma gondii* in pregnant women attended in basis health units in the city of Rolândia, Paraná, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 53: 185-191.
- Filisetti D, Gorcii M, Pernet-Marino E, Villard O, Candolfi E 2003 Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis: Comparison of Targets for Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR. *J Clin Microbiol* 41: 4826-4828.
- Filisetti D, Cocquerelle V, Pfaff A, Villard O, Candolfi E 2010. Placental testing for *Toxoplasma gondii* is not useful to diagnose congenital toxoplasmosis. *Pediatr Infect Dis J* 29: 665-667.

- Freeman K, Tan HK, Prusa A, Petersen E, Buffolano W, Malm G 2008. Predictors of retinochoroiditis in children with congenital toxoplasmosis: European, prospective cohort study. *Pediatrics* 121: E1215-E22.
- Gilbert RE, Thalib L, Tan HK, Paul M, Wallon M, Petersen E 2007. Screening for congenital toxoplasmosis: accuracy of immunoglobulin M and immunoglobulin A tests after birth. *J Med Screen* 14: 8-13.
- Gilbert RE, Freeman K, Lago EG, Bahia-Oliveira LMG, Tan HK, Wallon M, 2008. Ocular Sequelae of Congenital Toxoplasmosis in Brazil Compared with Europe. *PLoS Negl Trop Dis* 2:e277-e2783.
- Guerina NG, Hsu HW, Meissner HC, Maguire JH, Lynfield R, Stechenberg B 1994. Neonatal serologic screening and early treatment for congenital *Toxoplasma gondii* infection. *N Engl J Med* 330: 1858-1863.
- Guglietta S, Beghetto E, Spadoni A, Buffolano W, Del Porto P, Gargano N 2007. Age-dependent impairment of functional helper T cell responses to immunodominant epitopes of *Toxoplasma gondii* antigens in congenitally infected individuals. *Microbes Infect* 9: 127-133.
- Guy EC & Joynson HM 1995. Potential of the polymerase chain reaction in the diagnosis of active *Toxoplasma* infection by detection of parasite in blood. *J Infect Dis* 172: 319-322.
- Higa LT, Araujo SM, Tsuneto L, Castilho-Pelloso M, Garcia JL, Santana RG 2010. A prospective study of *Toxoplasma*-positive pregnant women in southern Brazil: a health alert. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 104: 400-405.
- Hill D, Sreekumar C, Dubey JP 2005. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Anim Health Res Rev* 6: 41-62.
- Homan WL 2000. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int J Parasitol* 30: 69-75.
- Howe DK, Sibley LD 1995. *Toxoplasma gondii* comprises 3 clonal lineages – correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis* 172:1561-1566.
- Ho-Yen DO, Joss AWL, Balfour AH, Smyth ETM, Baird D, Chatterton JMW 1992. Use of the polymerase chain reaction to detect *Toxoplasma gondii* in human blood samples. *J Clin Pathol* 45: 910-913.
- Jauregui LH, Higgins J, Zarlenga D, Dubey JP, Lunney JK 2001. Development of a real-time PCR assay for detection of *Toxoplasma gondii* in pig and mouse tissues. *J Clin Microbiol* 39: 2065-2071.

- Kafsack BFC, Pena JDO, Coppens I, Ravindran S, Boothroyd JC, Carruthers VB 2009. Rapid Membrane Disruption by a Perforin-Like Protein Facilitates Parasite Exit from Host Cells. *Science* 323: 530-533.
- Kasper DC, Sadeghi K, Prusa AR, Reischer GH, Kratochwill K, Forster-Waldl E 2009. Quantitative real-time polymerase chain reaction for the accurate detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid. *Diagn Microbiol Infect Dis* 63: 10-15.
- Kaye A 2011. Toxoplasmosis: Diagnosis, Treatment, and Prevention in Congenitally Exposed Infants. *J Pediatr Health Care* 25: 355-364.
- Kim K, Weiss LM 2008. Toxoplasma: the next 100 years. *Microb infect* 10: 978-984.
- Kompalic-Cristo A, Nogueira SA, Guedes AL, Frota C, Gonzalez LF, Brandao A 2004. Lack of technical specificity in the molecular diagnosis of toxoplasmosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 98: 92-95.
- Kompalic-Cristo A, Britto C, Fernandes O 2005. Diagnóstico molecular da toxoplasmose: revisão. *J Bras Patol Med Lab* 41: 229-235.
- Kompalic-Cristo A, Frotta C, Suarez-Mutis M, Fernandes O, Britto C 2007. Evaluation of a real-time PCR assay based on the repetitive B1 gene for the detection of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood. *Parasitol Res* 101: 619-625.
- Kravetz JD, Federman DG 2005. Toxoplasmosis in pregnancy. *Am J Med* 118: 212-216.
- Kupferschmidt O, Kruger D, Held TK, Ellerbrok H, Siegert W, Janitschke K 2001. Quantitative detection of *Toxoplasma gondii* DNA in human body fluids by TaqMan polymerase chain reaction. *Clin Microbiol Infect* 7: 120-124.
- Lago EG, Baldisserotto M, Hoefel JR, Santiago D, Jungblut R 2007. Agreement between ultrasonography and computed tomography in detecting intracranial calcifications in congenital toxoplasmosis. *Clin Radiol* 62: 1004-1011.
- Laliberte J, Carruthers VB 2008. Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. *Cell Mol Life Sci* 65: 1900-1915.
- Lee CN, Cavanagh HM, Lo ST, Ng CS 2001. Human papillomavirus infection in non-neoplastic uterine cervical disease in Hong Kong. *Br J Biomed Sci* 58: 85-91.
- Levine ND 1988. The protozoan phylum apicomplexa. Boca Raton, Flórida: CRC Press 2
- Lin MH, Chen TC, Kuo TT, Tseng CC, Tseng CP 2000. Real-time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol* 38: 4121-4125.
- Machado AS, Andrade GMQ, Januário JN, Fernandes MD, Carneiro ACAV, Carellos EVM, Romanelli RMC, Vasconcelos-Santos DV, Vitor RWA 2010. IgG and IgM western blot assay for diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105: 757-761

- Magi B, Migliorini L 2011. Western blotting for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. *New Microbiol* 34: 93-95.
- Manual Applied Biosystems Real-Time PCR Vs. Traditional PCR, pag 1-15.
- Mattos CCB, Meira CS, Ferreira AIC, Frederico FB, Hiramoto RM, Almeida GC 2011. Contribution of laboratory methods in diagnosing clinically suspected ocular toxoplasmosis in Brazilian patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 70: 362-366.
- McLeod R, Kieffer F, Sautter M, Hosten T, Pelloux H 2009. Why prevent, diagnose and treat congenital toxoplasmosis? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 320-344.
- Melo MB, Jensen KDC, Saeij JPJ 2011. *Toxoplasma gondii* effectors are master regulators of the inflammatory response. *Trends Parasitol* 27: 487-495.
- Menotti J, Garin YJF, Thulliez P, Sérugue MC, Stanislawiak J, Ribaud P, Castro N, Housé S, Derouin F 2010. Evaluation of a new 5'-nuclease real-time PCR assay targeting the *Toxoplasma gondii* AF146527 genomic repeat. *Clin Microbiol Infect* 16: 363-368.
- Mesquita RT, Vidal JE, Pereira-Chioccola VL 2010. Molecular diagnosis of cerebral toxoplasmosis: comparing markers that determine *Toxoplasma gondii* by PCR in peripheral blood from HIV-infected patients. *Braz J Infect Dis* 14: 346-350.
- Montoya JG, Liesenfeld O 2004. Toxoplasmosis. *Lancet* 363: 1965-1976.
- Montoya JG, Rosso F 2005. Diagnosis and management of toxoplasmosis. *Clin Perinatol* 32: 705-726
- Mozzatto L, Procianoy Soibelman R 2003. Incidence of congenital toxoplasmosis in southern Brazil: A prospective study. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 43: 147-151.
- Munoz M, Liesenfeld O, Heimesaat MM 2011. Immunology of *Toxoplasma gondii*. *Immunol Rev* 240: 269-285.
- Nguyen TD, DeKesel M, Bigaignon G, Hoet P, Pazzaglia G, Lammens M 1996. Detection of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradyzoites in blood, urine, and brains of infected mice. *Clin Diagn Lab Immunol* 3: 635-369.
- Norose K, Naoi K, Fang H, Yano A 2008. In vivo study of toxoplasmic parasitemia using interferon-gamma-deficient mice: Absolute cell number of leukocytes, parasite load and cell susceptibility. *Parasitol Int* 57: 447-453.
- Patrat-Delon S, Gangneux JP, Lavoué S, Lelong B, Guigen C, Tulzo Y, Robert-Gangneux F 2010. Correlation of parasite load determined by quantitative PCR to clinical outcome in a heart transplant patient with disseminated toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 48: 2541-2545.
- Paul M, Petersen E, Szczapa J 2001. Prevalence of congenital *Toxoplasma gondii* infection among newborns from the Poznan region of Poland: Validation of a

- new combined enzyme immunoassay for *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin A and immunoglobulin M antibodies. *J Clin Microbiol* 39: 1912-1916.
- Petersen E, Edvinsson B, Lundgren B, Benfield T, Evengard B 2006. Diagnosis of pulmonary infection with *Toxoplasma gondii* in immunocompromised HIV-positive patients by real-time PCR. *European J Clin Microbiol & Infectious Diseases* 25: 401-404.
- Petersen E 2007. Toxoplasmosis. *Semin Fetal Neonatal Med* 12: 214-223.
- Peyron F, Wallon M 2011. Geographic Difference in Outcomes of Congenital Toxoplasmosis In Reply. *Pediatr Infect Dis J* 30: 817-821.
- Pinard JA, Leslie NS, Irvine PJ 2003. Maternal serologic screening for toxoplasmosis. *J Midwifery Womens Health* 48: 308-316.
- Pinon JM, Dumon H, Chemla C, Franck J, Petersen E, Lebech M 2001. Strategy for diagnosis of congenital toxoplasmosis: Evaluation of methods comparing mothers and newborns and standard methods for postnatal detection of immunoglobulin G, M, and A antibodies. *J Clin Microbiol* 39: 2267-2271.
- Reischl U, Bretagne S, Kruger D, Ernault P, Costa JM 2003. Comparison of two DNA targets for the diagnosis of Toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *BMC Infect Dis* 2: 3-7.
- Remington JS, Thulliez P, Montoya JG 2004. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 42: 941-945.
- Remington JS, Mcleod R, Thulliez P, Desmonts G 2005. Toxoplasmosis. *Infect dis fetus newborn infant* p. 947-1091.
- Resende LM, Andrade GMQ, Azevedo M, Perissinoto J, Vieira ABQ 2010. Congenital toxoplasmosis: Auditory and language outcomes in early diagnosed and treated children. *Sc Me* 20: 13-19.
- Robert-Gangneux F, Commere V, Tourte-Schaefer C, Dupouy-Camet J 1999. Performance of a Western blot assay to compare mother and newborn anti-toxoplasma antibodies for the early neonatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 18: 648-654.
- Robert-Gangneux F, Dupretz P, Yvenou C, Quinio D, Poulain P, Guiguen C 2010. Clinical Relevance of Placenta Examination for the Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis. *Pediatr Infect Dis J* 29: 33-38.
- Rodrigues IMX 2006. Diagnóstico pós-natal da toxoplasmose congênita através da detecção de anticorpos das classes IgG, IgM e IgA anti-*Toxoplasma gondii*, MSc thesis, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 115 pp.

- Roiko MS, Carruthers VB 2009. New roles for perforins and proteases in apicomplexan egress. *Cell Microbiol*, 11: 1444-1452.
- Romand S, Chosson M, Franck J, Wallon M, Kieffer F, Kaiser K 2004. Usefulness of quantitative polymerase chain reaction in amniotic fluid as early prognostic marker of fetal infection with *Toxoplasma gondii*. *Am J Obstet Gynecol*, 190: 797-802.
- Rorman E, Zamir CS, Rilkis I, Ben-David H 2006. Congenital toxoplasmosis - prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. *Reprod Toxicol* 21: 458-472.
- Sauer A, de la Torre A, Gomez-Marin J, Bourcier T, Garweg J, Speeg-Schatz C 2011. Prevention of Retinochoroiditis in Congenital Toxoplasmosis Europe Versus South America. *Pediatr Infect Dis J* 30: 601-603.
- Segundo GRS, Silva DAO, Mineo JR, Ferreira MS 2004. Congenital toxoplasmosis in Uberlandia, MG, Brazil. *J Trop Pediatr* 50: 50-53.
- Silveira C, Vallochi AL, da Silva UR, Muccioli C, Holland GN, Nussenblatt RB 2011. *Toxoplasma gondii* in the peripheral blood of patients with acute and chronic toxoplasmosis. *Br J Ophthalmol*, 95: 396-400.
- Spalding SM 2002. Otimização da reação de polimerase em cadeia para detecção de *Toxoplasma gondii* em sangue venoso e placenta de gestantes. *J Bras Patol Med Lab* 105-110.
- Stagni L, Romano MA, Romano A, Magli A, Briganti F, Del Pezzo MA 2009. Prenatal screening for congenital toxoplasmosis in Campania: preliminary report on activities and results. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 374-377.
- Sterkers Y, Varlet-Marie E, Cassaing S, Brenier-Pinchart M-P, Brun S, Dalle F 2010. Multicentric Comparative Analytical Performance Study for Molecular Detection of Low Amounts of *Toxoplasma gondii* from Simulated Specimens. *J Clin Microbiol* 48: 3216-3222.
- Sterkers Y, Ribot J, Albaba S, Issert E, Bastien P, Pratlong F 2011. Diagnosis of congenital toxoplasmosis by polymerase chain reaction on neonatal peripheral blood. *Diagn Microbiol Infect Dis* 71: 174-176.
- Su C, Zhang X, Dubey JP 2006. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: A high resolution and simple method for identification of parasites. *Int J Parasitol* 36: 841-848.
- Su C, Shwab EK, Zhou P, Zhu XQ, Dubey JP 2009. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol* 137: 1-11.
- Talabani H, Asseraf M, Yera H, Delair E, Ancelle T, Thulliez P 2009. Contributions of Immunoblotting, Real-Time PCR, and the Goldmann-Witmer Coefficient to

- Diagnosis of Atypical Toxoplasmic Retinochoroiditis. *J Clin Microbiol* 47: 2131-2135.
- Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* 30: 1217-1258.
- Thulliez P, Daffos F, Forestier F 1992. Diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in the pregnant woman and the unborn child – Current problems. *Scandinavian J Infect Dis* 18-22.
- Varella IS, Canti ICT, Santos BR, Coppini AZ, Argondizzo LC, Tonin C 2009. Prevalence of acute toxoplasmosis infection among 41,112 pregnant women and the mother-to-child transmission rate in a public hospital in South Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 383-388.
- Vasconcelos-Santos DV, Machado Azevedo DO, Campos WR, Orefice F, Queiroz-Andrade GM, Carellos EV, Romanelli RMC, Januário JN, Resende LM, Martins-Filho AO, Carneiro ACAV, Vitor RWA, Caiaffa WT, 2009. Congenital Toxoplasmosis in Southeastern Brazil: Results of Early Ophthalmologic Examination of a Large Cohort of Neonates. *Ophthalmology* 116: 2199-2205.
- Vasconcelos-Santos DV, Queiroz Andrade GM 2011. Geographic Difference in Outcomes of Congenital Toxoplasmosis. *Pediatr Infect Dis J* 30: 816-817.
- Vaz RS, Thomaz-Soccol V, Sumikawa E, Guimares ATB 2010. Serological prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in pregnant women from Southern Brazil. *Parasitol Res* 106: 661-665.
- Wahab T, Edvinsson B, Palm D, Lindh J 2010. Comparison of the AF146527 and B1 Repeated Elements, Two Real-Time PCR Targets Used for Detection of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol* 48: 591-592.
- Weiss LM, Dubey JP 2009. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *Int J Parasitol* 39: 895-901.
- Ygberg S, Nilsson A 2012. The developing immune system – from foetus to toddler. *Acta Paediatr* 101: 120-127.

9. ANEXOS

9.1. PARECER COEP-UFMG Nº 0298/06

Universidade Federal de Minas Gerais
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP

Parecer nº. ETIC 0298/06

Interessada: Profa. Gláucia Manzan Queiroz de Andrade
Departamento de Pediatria
Faculdade de Medicina-UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP, aprovou no dia 27 de setembro de 2006, o projeto de pesquisa intitulado "Triagem neonatal para toxoplasmose congênita no Estado de Minas Gerais" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do referido projeto.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia
Presidente do COEP/UFMG

9.2. CONSENTIMENTO PARA PARTICIPAR NA PESQUISA CLÍNICA: “TRIAGEM NEONATAL PARA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA NO ESTADO DE MINAS GERAIS”

CONSENTIMENTO PARA PARTICIPAR NA PESQUISA CLÍNICA: “**Triagem neonatal para Toxoplasmose Congênita no Estado de Minas Gerais**”

EQUIPE MÉDICA (ordem alfabética): Daniel Vitor Vasconcelos Santos, Gláucia Manzan Queiroz de Andrade (coordenadora), José Nélio Januário, Luciana Macedo de Resende, Roberto Martins Gonçalves, Wesley Ribeiro Campos

INTRODUÇÃO:

Antes de aceitar participar desta pesquisa clínica, é importante que você leia e compreenda a seguinte explicação sobre os procedimentos propostos. Esta declaração descreve o objetivo, procedimentos, benefícios, riscos, desconfortos e precauções do estudo. Também descreve os procedimentos alternativos que estão disponíveis a seu filho e o seu direito de sair do estudo a qualquer momento.

OBJETIVO:

O objetivo deste estudo é avaliar a ocorrência de Toxoplasmose Congênita em recém-nascidos no Estado de Minas Gerais e estudar se a triagem neonatal é uma estratégia adequada para o diagnóstico e tratamento precoces da infecção. Pretende-se ainda conhecer as características clínicas, auditivas e oculares, das crianças positivas e a evolução, nas crianças tratadas, das complicações tardias da doença.

RESUMO:

A toxoplasmose ocorre em todo o Brasil e estudo realizado em Belo Horizonte mostrou que a infecção é freqüente em recém-nascidos, na proporção de um recém-nascido infectado para cada 1590 nascidos vivos. Estima-se que em Minas Gerais a infecção também seja comum e que muitas crianças nasçam com a infecção, sem sintomas, apresentando manifestações tardias, principalmente oculares, na adolescência ou vida adulta, o que dificulta o tratamento.

As crianças que nascem com toxoplasmose congênita podem ser prematuras, ter baixo peso, podem nascer com sintomas de infecção, mas acredita-se que a maioria nasça a termo e sem sintomas, o que atrasa o diagnóstico e tratamento nestes casos. Atualmente todas as crianças

com toxoplasmose congênita, com ou sem sintomas, são tratadas com antimicrobianos (sulfas, pirimetamina e ácido fólico) durante o primeiro ano de vida e, em todo o mundo, os resultados desse tratamento indicam que a toxoplasmose congênita tratada no primeiro ano de vida apresenta menor ocorrência de complicação ocular e de atrasos no desenvolvimento da criança. A possibilidade de se conhecer as áreas de maior ocorrência da infecção no estado e tratar as crianças infectadas, torna este estudo de fundamental importância.

PROCEDIMENTOS:

Os pacientes incluídos no estudo serão as crianças participantes do programa “Teste do Pezinho” residentes no estado de Minas Gerais.

Solicitamos a participação do seu filho/filha neste estudo porque o exame para toxoplasmose feito com o sangue colhido para o Teste do Pezinho foi positivo. Por esta razão, a senhora e seu filho/sua filha precisarão fazer outro exame de sangue que será colhido no Posto de Saúde perto de sua casa. Este material será encaminhado para Belo Horizonte, onde será examinado no Laboratório da Faculdade de Medicina da UFMG (NUPAD) para confirmar ou excluir o diagnóstico de toxoplasmose. Se esse exame de triagem para toxoplasmose for negativo, a senhora será informada de que seu filho não nasceu com a doença.

Se esse segundo exame for positivo, a senhora será orientada a levar seu filho no posto de saúde de referência ou no Hospital das Clínicas da UFMG, em Belo Horizonte, para outros exames (exame de fundo de olho e radiografia de crânio) e tratamento.

A realização dos testes será encerrada após seis meses de avaliação no Estado. Mas, o controle e tratamento das crianças com toxoplasmose congênita será garantido pelo sistema de saúde no local de referência mais próximo.

DESCONFORTOS:

A retirada do sangue poderá resultar em sensação de tontura, inflamação da veia ou dor, ferimento, ou sangramento no local da punção. Há também a remota possibilidade de ocorrer infecção.

DANOS:

No caso de seu filho apresentar algum sinal/sintoma anormal que possa estar associado ao uso da medicação para toxoplasmose, durante a realização do estudo, você deverá entrar imediatamente em contato com a Dra. Glúcia Queiroz, nos telefones: 3248 9547, 3277 4341

ou 9950-5155. Se ela não estiver disponível, peça para falar com a Dra Andrea Lucchesi no mesmo telefone: 3248 9547 ou 3277 4341.

Se seu filho vier a sofrer qualquer dano físico como resultado desse estudo, observadas as recomendações do protocolo, ele receberá todos os cuidados médicos providos pela Instituição na qual o estudo se realizou. Seu filho não abrirá mão de seus direitos legais após você assinar o termo de consentimento informado.

BENEFÍCIOS:

Um benefício da participação de seu filho neste estudo é a contribuição ao conhecimento médico. Ele também poderá se beneficiar do diagnóstico e tratamento da toxoplasmose congênita, com boas chances de evoluir sem complicações de acometimento ocular e danos neurológicos. Os exames e procedimentos exigidos durante sua participação no estudo são os realizados na rotina do atendimento das crianças com toxoplasmose congênita e serão custeados pelo convênio entre a Secretaria de Estado da Saúde e a Faculdade de Medicina da UFMG. A medicação será oferecida gratuitamente para os participantes desse projeto de pesquisa.

TRATAMENTO ALTERNATIVO:

Existe a alternativa de não participar do estudo. Você poderá discutir com o médico esta alternativa antes de permitir que seu filho participe do estudo. Até o momento, não existe outra proposta de tratamento, diferente da que está sendo oferecida nesse projeto, para a criança com toxoplasmose congênita.

Ainda não dispomos de um programa de triagem neonatal implantado para diagnóstico da toxoplasmose congênita. Como a maior parte das crianças portadoras dessa infecção nascem sem sintomas, geralmente o diagnóstico é feito tardiamente, a partir de queixas visuais ou atrasos no desenvolvimento observadas na vida escolar.

CONFIDENCIALIDADE:

Os registros da participação de seu filho neste estudo serão mantidos confidencialmente até onde é permitido por lei. No entanto, o Comitê de Ética em Pesquisa/UFMG poderá verificar e ter acesso aos dados confidenciais que o identificam pelo nome. Qualquer publicação dos dados não o identificará. Ao assinar este formulário de consentimento, você autoriza o pesquisador a fornecer os registros médicos do seu filho para o Comitê de Ética e Pesquisa da UFMG.

CONFIDENCIALIDADE:

A participação de seu filho neste estudo é voluntária e sua recusa em participar ou seu desligamento do estudo não significará perda de benefícios aos quais seu filho tem direito. Você poderá interromper a participação de seu filho a qualquer momento sem afetar seu acompanhamento médico e tratamento, que será mantido pelo tempo necessário.

Seu médico poderá finalizar sua participação neste programa de pesquisa por qualquer uma das seguintes razões:

- Incapacidade de tomar o medicamento conforme orientado;
- Incapacidade de comparecer às consultas agendadas;
- Se o programa for cancelado pelo patrocinador ou por questões administrativas.

COMPENSAÇÃO:

Você não receberá qualquer compensação financeira pela participação do seu filho no estudo.

CONTATO COM A COMISSÃO DE ÉTICA:

Durante o estudo, se você tiver qualquer dúvida sobre este estudo, por favor, contate o Comitê de Ética em Pesquisa-COEPE/UFMG, no telefone: 34994592.

CONSENTIMENTO:

Li e entendi todas as informações. Tive oportunidades de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas satisfatoriamente. Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim, representante legal desta criança, indicando meu consentimento para participar neste estudo, até que eu decida o contrário.

Assinatura do representante legal do paciente

Data

Assinatura da testemunha

Data

Assinatura do pesquisador

Data