



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

GABRIELA BRITO DE OLIVEIRA NOVAES

**DIAGNÓSTICOS CONVENCIONAIS E BASEADOS EM PCR PARA
IDENTIFICAÇÃO DE CEPAS EM PACIENTES CO-INFECTADOS
NEUROTOXOPLASMOSE/HIV**

Recife
2016

GABRIELA BRITO DE OLIVEIRA NOVAES

DIAGNÓSTICOS CONVENCIONAIS E BASEADOS EM PCR PARA
IDENTIFICAÇÃO DE CEPAS EM PACIENTES CO-INFECTADOS
NEUROTOXOPLASMOSE/HIV

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Doutora em Biologia Aplicada à Saúde. Área de Concentração: Biologia Molecular e Parasitologia.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho

Co-orientador:: Dr. Fábio Lopes de Melo

Recife

2016

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Novaes, Gabriela Brito de Oliveira

Diagnósticos convencionais e baseados em PCR para identificação de cepas em pacientes co-infectados neurotoxoplasmose/HIV. / Recife: O Autor, 2016.

130 folhas: il., fig., tab.

Orientador: José Luiz de Lima Filho

Coorientador: Fábio Lopes de Melo

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biologia Aplicada à Saúde, Recife, 2016.

Inclui referências, apêndice e anexos

- 1. Toxoplasmose 2. AIDS (doença)- pacientes 3. Reação em cadeia de polimerase I. Lima Filho, José Luiz de (orient.) II. Melo, Fábio Lopes de (coorient.) III. Título**

616.936

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017- 647

GABRIELA BRITO DE OLIVEIRA NOVAES

**DIAGNÓSTICOS CONVENCIONAIS E BASEADOS EM PCR PARA
IDENTIFICAÇÃO DE CEPAS EM PACIENTES CO-INFECTADOS
NEUROTOXOPLASMOSE/HIV**

Aprovada em: 22/12/2016

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Doutora em Biologia Aplicada à Saúde. Área de Concentração: Biologia Molecular e Parasitologia.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho
Orientador
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami/LIKA

Dr. Fabio Lopes de Melo
Co-orientador
Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães – CPqAM/FIOCRUZ

Prof. Dr. Luiz Carlos Alves
Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães – CPqAM/FIOCRUZ

Prof. Dr. Fábio André Brayner dos Santos
Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães – CPqAM/FIOCRUZ

Dr^a. Maria Almerice Lopes da Silva
Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães – CPqAM/FIOCRUZ

Prof^a Dr^a Patrícia Muniz Mendes Freire de Moura
Universidade de Pernambuco - UPE

Com carinho ofereço em especial à minha mãe Cláudia por todo seu esforço e dedicação para com minha educação, por ser meu maior exemplo de mulher guerreira e por sempre me estimular a buscar meus sonhos a cada dia.

Ao meu esposo Rodrigo, por estar ao meu lado em cada passo dado na jornada profissional, sempre me apoiando e ajudando, com todo meu amor dedico.

Aos meus quatros anjos, Beatriz, Daniel, Isabela e Miguel, que não estão ao meu lado fisicamente, mas em meu coração e a cada respirar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, pela maravilhosa oportunidade de viver, aprender, pela força que me proporciona todos os dias e iluminando meu caminho.

Ao meu orientador Profº. José Luiz, por confiar em mim como aluna apesar de toda minha teimosia, por acreditar que eu conseguiria, por todo apoio e incentivo.

Ao meu co-orientador Fábio Melo, por todo o ensinamento no decorrer da elaboração deste trabalho, por toda a paciência (às vezes também a falta dela), pela convivência, sabedoria diária, pelo apoio, incentivo e puxões de orelha tão valiosos no decorrer deste trabalho.

Ao meu amor maior e luz da minha vida, Cláudia Brito, pelo incentivo diário, compreensão da ausência, por tudo o que me proporcionou apesar de todas as dificuldades e por todo o amor incondicional que me foi dado.

Ao meu esposo, Rodrigo Novaes, por todo amor, paciência, alegria com as minhas conquistas e pela ajuda incondicional na vida acadêmica e pessoal.

Ao meu irmão-quase-filho, Mateus, por ser esse menino tão especial, pela amizade, companheirismo e por torcer sempre por mim.

Ao pesquisador Paulo Sérgio por toda ajuda e colaboração que me foi proporcionado durante o doutorado.

Aos professores de iniciação científica Luiz Alves e Fábio Brayner, que me apresentaram ao mundo científico, mesmo na época ainda sendo tão imatura, e fizeram com que hoje eu seja realizada com a minha profissão e apaixonada pela ciência. Obrigada pelo carinho e amizade até os dias de hoje.

As professoras da graduação e da vida Silvana Ferreira e Patrícia Moura, por me oferecer além de seus conhecimentos as suas amizades.

Ao querido professor Luiz Bezerra pelo seu carinho, amizade, alegria de viver, simplicidade, humildade e experiência de vida, além de um profissional sem igual a qual carrego com o um dos meus exemplos por toda a minha carreira acadêmica e pessoal.

A todos que fazem parte do LDT, Leo, Meri, Luiz, Patrícia, André, Walter, Elis, Mari, Ray, Luydson, Drª Ana e Drª Zulma, pelo convívio, apoio, amizade e experiências que foram de fundamental importância para a realização desta tese.

Ao meu aluno de iniciação científica pela amizade, imenso conhecimento e trabalho compartilhado de fundamental importância para a minha tese, o meu muito obrigado, Alfredo.

Aos meus familiares que torcem e rezam sempre por mim, Aos meus avós queridos e tão amados, Selma, Nelson, Mabel e Fernando (*in memoriam*) por toda dedicação e amor dado à sua primogênita. Aos meus tios, primos e sobrinhos em especial aos meus tios Celo, Guga, Fábio, Vilma, Ana e Edmar por sempre ter encontrado em vocês o suporte para a minha vida educacional, nunca esquecerei.

Em especial àqueles que me deram toda ajuda imprescindível e de fundamental importância para o caminhar da minha tese, sem a ajuda de vocês não sei se teria conseguido, muito obrigada Elisa, Geo, Leo, Elis e Walter.

Aos colegas profissionais que sem a ajuda de vocês com certeza seria muito mais difícil essa caminhada, Gerçi, Iasmine, Priscila, Renata, Fernanda e Carlos.

A todos os funcionários do LIKA e Aggeu Magalhães pelo auxílio concedido sempre que solicitado nas tarefas diárias.

E a todos que direta e indiretamente me ajudaram a desenvolver esta tese, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Toxoplasmose cerebral (TC) é a causa mais comum de lesões encefálicas em pacientes vivendo com HIV/aids, e que mesmo após a era da terapia antirretroviral (TARV) ainda é responsável por elevadas taxas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. O presente estudo consiste em analisar as características clínicas, laboratoriais, epidemiológicas e de tratamento dos pacientes com TC e aplicar os sistemas baseados em reação de cadeia de polimerase (PCR) para identificação das cepas de *Toxoplasma gondii*. Foram coletados 2µl do fluido cérebro-espinhal (FSC) de 117 pacientes admitidos no hospital de referência em neurologia de Pernambuco onde foram analisados suas características clínicas, exames de imagens e estudo do FSC. No primeiro artigo foi realizada uma análise de série de casos de 56 pacientes cujas características de apresentação clínica, de estudo encefálico por imagem e de resultados de análise líquórica foram avaliadas. TC levou ao diagnóstico de HIV em 48.2% dos pacientes, entretanto, no momento do diagnóstico de TC, apenas 16.6% referiram estar em uso de TARV e 8.9% estavam recebendo profilaxia primária para toxoplasmose. Cefaléia, déficit de força, febre, episódios convulsivos e confusão mental foram os sinais e sintomas mais frequentes durante o estudo. Cinquenta e três pacientes demonstraram alterações compatíveis com toxoplasmose em tomografia computadorizada ou ressonância magnética. Trinta e quatro amostras de líquido foram positivas para *T. gondii* nas reações de Elisa IgM e IgG, enquanto 55.4% foram positivas na reação de hemaglutinação. Cinquenta pacientes foram submetidos ao tratamento de primeira linha para toxoplasmose e destes, 4.0% tiveram a sulfadiazina substituída por clindamicina. Concluindo que apesar da atual disponibilidade de terapia antirretroviral e mesmo da profilaxia contra infecções oportunistas, a TC ainda é uma afecção neurológica bastante relevante em indivíduos vivendo com HIV/aids. Seu diagnóstico precoce é essencial, mesmo que na maioria das vezes seja presuntivo. Igualmente importante para um bom prognóstico é o início precoce do tratamento empírico e da terapia antirretroviral. Já para o segundo artigo foi utilizado sistemas de PCR para diagnosticar e genotipar *T. gondii* em pacientes com TC, onde dos 117 pacientes, 48 foram positivos na MN-PCR e destes, 31 pacientes foram sugestivos para TC e submetidos a exames de imagens, os quais 80,6% mostraram alguma lesão neurológica. Os exames de imagens revelaram que 67,7% dos indivíduos possuíam múltiplas lesões e em relação à genotipagem destes pacientes, a cepa I foi encontrada em 12%, cepas II, III e polimórficas em 4%, amostras apresentando os dois alelos 8%, mistas em 16% e não identificado em 48%. O sequenciamento foi realizado e confirmou a circulação de duas cepas no mesmo indivíduo. Em relação aos indivíduos sem TC, mas com genótipos mistos, polimórficos e com o tipo I foram encontrados em 33,3%, os quais podem vir a causar a TC por se tratarem de pacientes soropositivos. Concluimos que a cepa mais comum da América do Norte e Europa já encontra em circulação na nossa população e que mesmo utilizando apenas quatro marcadores conseguimos encontrar uma alta diversidade gênica no grupo estudado apesar da limitação da RFLP-PCR.

Palavras-chave: Toxoplasmose cerebral. Genotipagem. Multiplex-PCR. Nested-PCR. RFLP-PCR.

ABSTRACT

Cerebral toxoplasmosis (CT) is the most common cause of brain lesions in patients living with HIV / AIDS, and that even after the age of antiretroviral therapy (ART) it is still responsible for high morbidity and mortality rates worldwide. The present study consists of analyzing the clinical, laboratory, epidemiological and treatment characteristics of patients with CT and applying the polymerase chain reaction (PCR) based systems for *Toxoplasma gondii* strain identification. A total of 117 patients were admitted to the referral hospital in Pernambuco, where they analyzed their clinical characteristics, imaging tests and FSC study. In the first article, a case series analysis was performed of 56 patients whose characteristics of clinical presentation, brain imaging and results of CSF analysis were evaluated. TC led to the diagnosis of HIV in 48.2% of patients, however, at the time of CT diagnosis, only 16.6% reported being on ART and 8.9% were receiving primary prophylaxis for toxoplasmosis. Headache, force deficit, fever, convulsive episodes and mental confusion were the most frequent signs and symptoms during the study. Fifty-three patients demonstrated changes compatible with toxoplasmosis on computed tomography or magnetic resonance imaging. Thirty-four CSF samples were positive for *T. gondii* in Elisa IgM and IgG reactions, while 55.4% were positive in the hemagglutination reaction. Fifty patients underwent first-line treatment for toxoplasmosis, and 4.0% had sulfadiazine replaced by clindamycin. Concluding that despite the current availability of antiretroviral therapy and even prophylaxis against opportunistic infections, CT is still a very relevant neurological condition in individuals living with HIV / AIDS. Early diagnosis is essential, even if most of the time it is presumptive. Equally important for a good prognosis is the early onset of empirical treatment and antiretroviral therapy. For the second article, PCR systems were used to diagnose and genotype *T. gondii* in patients with CT. Of the 117 patients, 48 were positive in MN-PCR and 31 patients were suggestive for CT and submitted to imaging, with 80.6% showing some neurological damage. The imaging studies revealed that 67.7% of the individuals had multiple lesions and in relation to the genotyping of these patients, I strains were found in 12%, strains II, III and polymorphic in 4%, samples presenting the two 8% alleles, mixed in 16% and unidentified in 48%. Sequencing was performed and confirmed the circulation of two strains in the same individual. For individuals without CT, but with mixed genotypes, polymorphic and type I were found in 33.3%, which can cause CT because they are seropositive patients. We concluded that the most common strain in North America and Europe is already circulating in our population and that even using only four markers, we found a high genetic diversity in the studied group despite RFLP-PCR limitation.

Key Words: Cerebral toxoplasmosis. Genotyping. Multiplex-PCR. Nested-PCR. RFLP-PCR.

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

Figura 1	Microscopia eletrônica de transmissão de um vacúolo parasitóforo contendo dois taquizoítos em processo de divisão por endodiogenia.	21
Figura 2	Formas evolutivas de <i>T. gondii</i> .	22
Figura 3	Ciclo entérico de <i>T. gondii</i> no epitélio intestinal do felídeo. Mostrando as formas evolutivas dos esquizontes, gametócitos e oocistos.	24
Figura 4	O ciclo de vida da Toxoplasmose.	26
Figura 5	Formas de transmissão da Toxoplasmose.	30
Figura 6	Tomografia computadorizada (A1 e A2) e ressonância magnética (B) em pacientes com aids e encefalite por <i>T. gondii</i> .	49
Figura 7	Toxoplasmose cerebral: lesões anelares após o uso de contraste	49
Figura 8	Toxoplasmose cerebral em pacientes com aids com múltiplas lesões com realce anelar e sinal de 'alvo excêntrico'.	50

Capítulo II

Figura 1	RFLP-PCR de amostras que deram positivos na MN-PCR utilizando as enzimas específicas para cada marcador	81
----------	---	----

Apêndice

Figura 1	Curva de DNA de <i>Toxoplasma gondii</i> em STNPCR.	114
----------	---	-----

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Table 1	Signs and Symptoms in 56 Individuals with Cerebral Toxoplasmosis and AIDS	73
Table 2	Cytological, Biochemical and Immunological Characteristics of the Cerebro-Spinal Fluid of 56 Patients with Cerebral Toxoplasmosis and AIDS	74

Capítulo II

Tabela 1	Otimização de iniciadores e enzimas de restrições utilizadas na MN-PCR e RFLP-PCR para amplificação e digestão de <i>T. gondii</i> .	80
Tabela 2:.	Número de pacientes positivos na PCR convencional e na MN-PCR	80
Tabela 3:	Tabela simplificada dos 31 pacientes com TC e sem TC baseados nos seus exames imunológicos, PCR convencional, MN-PCR, RFLP-PCR, Genótipo encontrado e exames de imagens.	83

Apêndice

Tabela 1	Iniciadores externos e internos utilizados para NST-PCR.	113
----------	--	-----

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

TC	Toxoplasmose cerebral
DNA	ácido desoxirribonucleico
RNA	ácido ribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos
TCD4+	Linfócitos T auxiliar
RM	Ressonância magnética
Ig	Imunoglobulina
IgA	Imunoglobulina de classe A
IgG	Imunoglobulina de classe G
IgE	Imunoglobulina de classe E
IgM	Imunoglobulina de classe M
CDC	Centre for Disease Control and Prevencion
PCR	Reação em cadeia de polimerase
M-PCR	Multiplex-PCR
N-PCR	Nested-PCR
MN-PCR	Multiplex-Nested-PCR
qPCR	PCR quantitativa
RFLP-PCR	“Restriction fragmente lenght polymorphisms” (Polimorfismo por tamanho de fragmentos de DNA gerados por enzima de restrição)
IFI	Imunofluorescência indireta
EIA	Ensaio imunoenzimáticos
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ELFA	Imunoensaio enzima-fluorescente
HSPs	Proteínas de choque térmico

Rapd-PCR	Amplificação aleatória do DNA polimórfico – reação em cadeia de polimerase
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
TARV	Terapia antirretroviral
RNM	Ressonância Magnética
HS/AC	Teste de aglutinação diferencial antígeno HS/Antígeno AC
LAT	Teste de aglutinação em látex
ISAGA	Ensaio de aglutinação imunossorvente
STNPCR	“Single Tube Nested”- Reação em Cadeia de Polimerase (Reação em Cadeia de Polimerase de Único Tubo)
PVHA	Pessoas vivendo com HIV/aids
FSC	Fluído Cérebro-Espinal
SNC	Sistema Nervoso Central
Pb	Pares de base
HAART	“Highly active antirretroviral therapy”
Kb	Kilobase
Mb	Megabase
DL100	Dose letal de 100%

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 ASPECTOS GERAIS DA TOXOPLASMOSE	18
2.2 O <i>TOXOPLASMA GONDII</i>	18
2.3 HISTÓRICO DA TOXOPLASMOSE	19
2.4 FORMAS EVOLUTIVAS	20
2.5 CICLO DE VIDA DO <i>T. GONDII</i>	25
2.6 TRANSMISSÃO DA TOXOPLASMOSE	26
2.7 EPIDEMIOLOGIA DA TOXOPLASMOSE	31
2.8 PATOGENIA	31
2.9 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA TOXOPLASMOSE	39
2.10 GENOMA DO <i>T. GONDII</i>	51
2.11 ESTUDOS DAS CEPAS	55
3 OBJETIVOS	59
3.1 OBJETIVO GERAL	59
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	59
4 CEREBRAL TOXOPLASMOSIS IN PATIENTS WITH ACQUIRED IMMUNE DEFICIENCY SYNDROME IN THE NEUROLOGICAL EMERGENCY DEPARTMENT OF A TERTIARY HOSPITAL	60
4.1 INTRODUCTION	62
4.2 MATERIALS AND METHODS	63
4.3 ETHICS	64
4.4. RESULTS	64
4.5. DISCUSSION	65
4.6. ACKNOWLEDGEMENTS	68
4.7. REFERENCES	69
4.8 TABLES	73

5 AVALIAR OS SISTEMAS BASEADOS EM PCR PARA IDENTIFICAÇÃO DE CEPAS EM PACIENTES COM TOXOPLASMOSE CEREBRAL	75
5.1 INTRODUÇÃO	76
5.2 MATERIAIS E MÉTODOS	77
5.3 RESULTADOS	80
5.4 DISCUSSÃO	83
5.5 CONCLUSÃO	87
5.6 REFERÊNCIAS	87
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	93
REFERÊNCIAS	94
PERSPECTIVA	110
<i>Apêndice A- Capítulo III: Otimização de um NESTED-PCR em único tubo para o diagnóstico de neurotoxoplasmose.</i>	111
Anexo A- Parecer consubstanciado do CEP	115
Anexo B- Apresentação oral do Capítulo III	118
Anexo C- Artigo I publicado na Clinical Neurology and Neurosurgery	119

1 INTRODUÇÃO

Toxoplasmose é uma doença causada pelo protozoário intracelular apicomplexo, *Toxoplasma gondii*, o qual é amplamente distribuído no mundo todo provocando várias morbidades e mortalidades (LUFT; CHUA, 2000; DUBEY, 2008).

A parasitose pode se apresentar de diversas formas no organismo humano, porém estudos sorológicos indicam que mais de 80% das infecções primárias por *T. gondii* são assintomáticas, resultando em infecção crônica com latência dos parasitas dentro de cistos teciduais que pode ocorrer durante toda a vida do hospedeiro (HILL; DUBEY, 2002; HILL et al, 2005; DUBEY, 2008; DUBEY et al, 2012). A infecção basicamente consiste na rápida divisão dos taquizoítos, encontrados em grandes quantidades na fase aguda. Em seguida, com o desenvolvimento de imunidade, formam-se cistos teciduais principalmente encontrados nos músculos e cérebros, contendo centenas de bradizoítos, esta fase já é caracterizada a fase crônica da doença e estima-se que até 30% da população mundial estejam nesta fase (TENTER; HECKEROTH; WEISS; 2000).

Nos pacientes com o sistema imunológico debilitado, principalmente com aids, pode ocorrer a reativação da infecção latente quando o número de linfócitos TCD4⁺ apresentar menos de 100 células CD4⁺/mm³ de sangue, causando a Toxoplasmose Cerebral (TC), uma das mais comuns infecções neurológicas oportunistas tornando a doença extremamente grave, neste grupo de risco (PEREIRA-CHIOCCOLA et al, 2009).

No Brasil, a TC é uma das infecções neurológicas mais comuns em pessoas vivendo com aids e é tipicamente observada nas fases de morbidade posteriores do vírus da imunodeficiência humana (HIV- Human Immunodeficiency Virus) causando infecção e mortalidade significativas (VIDAL, et al., 2005).

A encefalite é o acometimento cerebral mais frequente da toxoplasmose em indivíduos com aids, causando necroses cerebrais, preferencialmente nos gânglios da base em ambos os hemisférios cerebrais. Devido a esses sintomas é considerada uma doença definidora de aids tanto nos países em desenvolvimento quanto nos países desenvolvidos (PEREIRA-CHIOCCOLA; VIDAL; SU, 2009). Estima-se que cerca de 30% a 50% dos pacientes com HIV positivos e infectados

pelo *T. gondii* desenvolverão em algum momento da sua evolução a neurotoxoplasmose (SCHOEDER et al., 2006).

No Brasil, a neurotoxoplasmose representa a doença cerebral com lesões focais mais comum em pacientes com aids e a terceira doença definidora de aids mais frequente encontrada nestes pacientes (BAHIA-OLIVEIRA, et al., 2003; VIDAL; OLIVEIRA; HERNANDEZ, 2003).

Os sinais e sintomas clínicos da neurotoxoplasmose nos pacientes com imunodeprimidos podem ser agudos e subagudos e o diagnóstico para definir toxoplasmose requer a identificação do parasita em biópsias de tecidos e eventualmente exame do líquido cefalorraquidiano (LCR) (PALM; TUMAN; PIETZCKER, 2008).

Os sintomas da TC podem ser confundidos por outras infecções oportunistas que comumente infectam os indivíduos com aids. Portanto o diagnóstico não pode ser baseado somente em observações clínicas. Classicamente o diagnóstico da toxoplasmose é baseado na pesquisa de anticorpos por métodos sorológicos. Os testes mais utilizados para detecção de anticorpos são Imunofluorescência indireta (IFI) e ELISA (MONTROYA; LIESENFELD, 2008).

No entanto, para a identificação de TC os métodos de diagnósticos para detecção dos anticorpos IgG e IgM são pouco utilizados, embora a presença de alto títulos de IgG seja comum nestes pacientes, porém, a ausência de anticorpos não exclui o diagnóstico (PALM; TUMAN; PIETZCKER, 2008; VIDAL et al, 2011).

O diagnóstico de neurotoxoplasmose, como preconizado pelo Ministério da Saúde, é realizado principalmente por tomografias computadorizadas e ressonância magnética os quais muitas vezes não consegue distinguir entre outras doenças cerebrais. As imagens demonstram múltiplas lesões granulomatosas, mas não diferencia toxoplasmose de outras lesões como abscessos e linfomas (KASTRUP; WANKE; MASCHKE, 2008; VERMA; BERGER, 2012). Estes pacientes podem realizar também exames de biópsia cerebral, mas é muito limitado por ser um método invasivo. Pensando neste aspecto, técnicas de biologia molecular como a reação em cadeia de polimerase (PCR) em amostras como fluído cérebro-espinhal (FCS) representa uma excelente alternativa para o diagnóstico etiológico da TC ou para tomar decisões em casos em que a doença cursa um quadro desfavorável

apesar do tratamento específico (BASTIEN, PROCOP, REISCHL, 2008; FERREIRA et al, 2008; MONTOYA; LIESENFELD, 2008).

Estudos realizados com objetivo de comparar sensibilidade de seqüências iniciadoras mostraram que as seqüências alvo B22 e B23 do gene B1 apresentaram maior sensibilidade e especificidade (CHABBERT et al., 2004). Entretanto, alguns estudos têm sido desenvolvidos com objetivo de usar um conjunto de primers para diferentes marcadores de DNA em um número pequeno de amostras (BASTIEN, 2002; VIDAL et al, 2004).

Métodos de genotipagem através da técnica de PCR-RFLP distinguiram três linhagens clonais de *T. gondii* com correspondentes diferenças fenotípicas (PENA et al.; FERREIRA et al; SU et al. 2006; DUBEY et al. 2007) conhecidas como tipos I, II e III (DARDE et al., 2004; SU et al. 2006). Em estudos utilizando camundongos como hospedeiros demonstraram que as infecções com as diferentes linhagens clonais tiveram resultados diferentes. As cepas do tipo I são altamente virulentas e mais frequentemente encontradas em pacientes com aids e toxoplasmose ocular (KHAN et al.; VALLOCHI et al. 2005), enquanto que o tipo II e III são encontradas com frequência na América do Norte e Europa são significativamente menos virulentas e causa mais comum em infecção congênita (NOWAKOWSKA et al. 2006). Cepas mistas e genótipos atípicos são encontrados na América do Sul (FERREIRA et al. 2006, 2008; DUBEY et al. 2007).

Devido a complexidade diagnóstica de toxoplasmose cerebral se faz necessário o desenvolvimento de testes de diagnóstico mais preciso, mais sensível, específico e rápido, principalmente em pacientes imunocomprometidos, além de saber quais as cepas circulantes em Pernambuco. Assim, este estudo teve como objetivo aplicar os sistemas baseados em PCR para diagnóstico da Neurotoxoplasmose e investigar as características clínicas e genéticas das cepas de *T. gondii* isolados de pacientes com toxoplasmose cerebral e aids.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ASPECTOS GERAIS DA TOXOPLASMOSE:

A toxoplasmose é causada por um protozoário unicelular, intracelular, apicomplexo e cosmopolita, o *Toxoplasma gondii* (DUBEY, 2010). Protozoário amplamente distribuído podendo ser encontrado de 15 a 68% da população adulta da América do Norte e até mais de 90% em alguns países, como por exemplo, o Brasil (SROKA, et al, 2010). A doença em geral é benigna e pode passar despercebido em indivíduos imunocompetentes. Quando presentes, os sintomas são inespecíficos como a linfadenopatia, e apenas 10-20% de casos de infecção pelo *T. gondii* são sintomáticos, porém, complicações raras podem acontecer e trazer graves consequências em mulheres grávidas podendo levar a óbito fetos infectados (mais de três mil casos por ano só nos EUA) e indivíduos imunocomprometidos principalmente os que possuem aids, já que pelo menos 30% dos aidéticos que são soropositivos pra *T. gondii* desenvolverão encefalite toxoplásmica (MONTROYA; LIESENFELD, 2008; REY, 2011; SAADATNIA; GOLKAR; 2012). Em crianças, a soroprevalência é relativamente baixa, aumentando de acordo com a idade, devido à exposição a mais fatores de riscos, durante o transcorrer da vida (TENTER et al., 2000).

2.2 O TOXOPLASMA GONDII

O *T. gondii* é um protozoário intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa por possuir uma organela específica encontrada neste filo, o apicoplasto, e de subfamília Toxoplasmatinae (LEVINE, 1988), constituído por complexo apical composto por organelas secretoras especializadas tais como róprias e micronemas, e de elementos do citoesqueleto, com os anéis polares e conóide, tais organelas são específicas para a adesão, invasão e ajuda na replicação do parasita dentro do vacúolo parasitóforo como os grânulos densos, além de uma importante organela que também é característica deste filo o apicoplasto, localizada próximo ao núcleo de origem endossimbiótica de algas

verdes e têm a função de biossíntese de aminoácidos e ácidos graxos (NEVES, et al; 2011; REY, et al; 2011; ATTIAS; VOMMARO; DE SOUZA; 2014)

Os membros dessa subfamília possuem o ciclo heteroxênico (dois hospedeiros) e oocisto com dois esporocistos com quatro esporozoítos cada. O gênero *Toxoplasma* foi descrito por Nicolle e Manceaux em 1908 em um roedor do norte da África de denominação *gondii* no mesmo ano que Splendore identificou o protozoário em coelhos em laboratórios no Brasil. Em 1909, Nicolle e Manceaux descreveram o protozoário e o classificaram criando o gênero *Toxoplasma* e a espécie *T. gondii*.

São encontrados oito espécies do gênero *Toxoplasma* (DUBEY, 2010). Esta espécie infecta inúmeros animais de sangue quente entre eles aves (mais de 30 espécies) e mamíferos (mais de 300 espécies conhecidas) e neles invadem as células e se multiplicam. Essa alta capacidade de infecção está relacionada aos antígenos de superfícies e às suas organelas citoplasmáticas, como os micronemas, rôptrias e grânulos densos, que os ajudam a aderir, invadir e reproduzir-se dentro de vacúolos parasitóforos no interior das células.

Três linhagens diferentes do parasita foram descritas, divididos em tipo I, II e III; Onde a linhagem do tipo I é a menos encontrada e mais patogênica, a do tipo II é a mais difundida no hemisfério norte e relacionada a doenças oculares e reativação dos cistos em imunocomprometidos e a do tipo III ocorre mais em animais; linhagens mistas I-II também pode ser encontradas (REY; 2011, FEKKAR et al, 2011).

2.3 HISTÓRICO DA TOXOPLASMOSE

A identificação do *T. gondii* aconteceu em 1908 ao mesmo tempo tanto na Tunísia quanto no Brasil, mas apenas em 1937 foi identificado por Sabin e Olitsky que o *Toxoplasma* era um parasita intracelular obrigatório. Nesta época foi verificado que a doença poderia ser transmitida pela alimentação de tecidos com o parasita após o experimento de alimentar camundongos com animais mortos recém-infectados. A doença cursava desconhecida no homem, até que 1939 foi identificado o primeiro caso de transmissão congênita. Mas o ciclo evolutivo, distribuições geográficas e vias de transmissão ainda não tinham sido estudados até os meados

de 1950, quando o estudo sobre o agente etiológico foi intensificado devido a inquéritos epidemiológicos sorológicos que mostravam que esta doença era amplamente distribuída entre os homens e diversos animais. Estes inquéritos só foram realizados devido ao desenvolvimento do teste do corante ou reação de Sabin e Feldman em 1948.

Após o conhecimento sobre os estágios de infecção como taquizoítos e bradizoítos por Weinman e Chandler (1954), a hipótese de transmissão por carnivorismo foi ratificada e a partir dos anos 60 mais estudos sobre a doença foram intensificados, como por Jacob e colaboradores (1960), após descobrirem que existia uma forma de resistência deste parasito que era os bradizoítos que formavam os cistos teciduais confirmando posteriormente que era uma das formas de transmissão. Mas, tais resultados geraram conflitos quando comparados também ao alto número de herbívoros e vegetarianos infectados onde posteriormente (em 1965) a forma de oocisto foi identificada e a dúvida solucionada. Nos anos 70, o ciclo de vida foi identificado e revisado por Dubey (2009) e Ferguson (2009), assim como as vias de transmissão, a qual foi revisada em 2010 por Jones e Dubey.

2.4 FORMAS EVOLUTIVAS

T. gondii possui dois hospedeiros e por isto seu ciclo é definido como heteroxênico e que pode ser amplamente encontrado no seu hospedeiro intermediário, divididos em mamíferos tais como, homem, bois, roedores, cavalos, porcos, cães e aves, onde neles realizam seus ciclos assexuados e hospedeiros definitivos que são os felídeos em geral, onde neles realizam o ciclo tanto assexuado como sexuado (AFONSO et al, 2010).

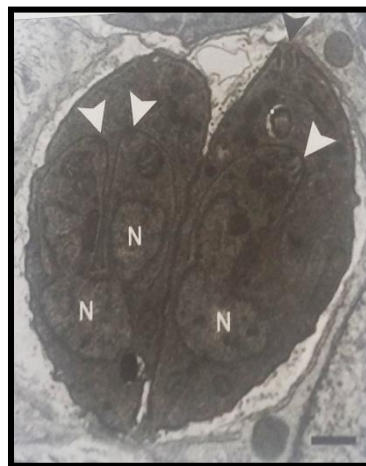
As formas evolutivas e infectantes do *T. gondii* são: (I) taquizoítos, encontrados em diversas células, fluídos e tecidos orgânicos, (II) cistos teciduais contendo os bradizoítos presentes em carnes e vísceras contaminadas e (III) esporozoítos encontrados dentro de oocistos eliminados pelas fezes dos hospedeiros definitivos (DUBEY, 2002).

No epitélio intestinal do hospedeiro definitivo o parasita desenvolve cinco tipos de estágios multiplicativos e sexuais antes de ser eliminado como oocistos nas fezes

e dois estágios encontrados nos tecido são importantes para a patogênese da infecção: taquizoítos e bradizoítas (MOURA; AMENDOEIRA; BARBOSA, 2009).

Frenkel (1973) descreveu o termo 'taquizoíta' (em grego, *taqui*= rápido) por ser a forma evolutiva do parasita que se multiplica rapidamente dentro de diversos tipos de células nos hospedeiros intermediários e nas células epiteliais não intestinais dos hospedeiros definitivos (BARBOSA; MUNO; MOURA, 2014). Eles possuem formato elíptico ($6\mu\text{m}$ de comprimento x $2\mu\text{m}$ de largura) e são obrigatoriamente intracelulares das células nucleadas. Por penetração ativa, invadem as células pela sua região apical com a ajuda de algumas organelas citoplasmáticas e se alojam no interior do vacúolo parasitóforo, onde ocorrerá sua multiplicação por endodiogenia (figura 1), forma especializada em multiplicação assexuada, onde dentro de uma célula-mãe se formará duas células-filhas. Após a multiplicação, os taquizoítos deixam o vacúolo parasitóforo, rompem a membrana plasmática das células e alcançam o meio extracelular, disseminando-se pela circulação hematogênica ou linfática para vários tecidos. Esta forma é responsável pela fase aguda da infecção (figura 2A) (DUBEY, 2002; BARBOSA et al, 2005; JONES; DUBEY, 2010).

Figura 1: Taquizoíto dentro do vacúolo parasitóforo.

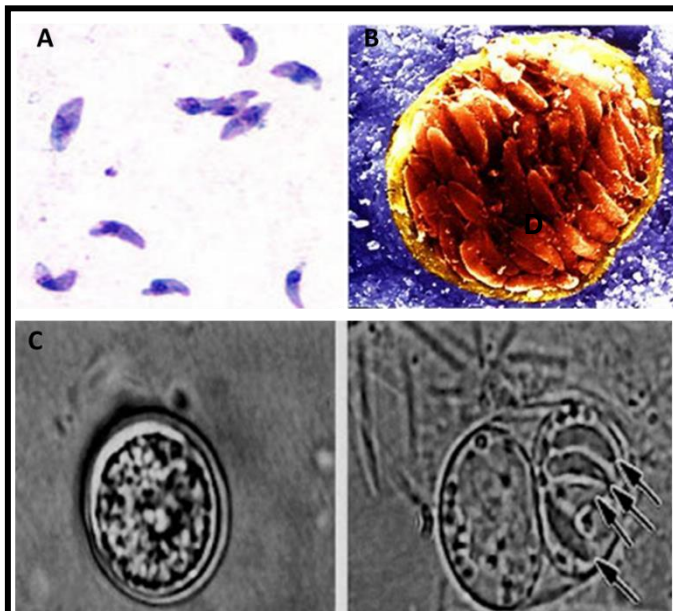


Legenda: Forma evolutiva de *T. gondii* analisada por microscopia eletrônica de transmissão, onde mostra a presença de um vacúolo parasitóforo contendo dois taquizoítos em processo de divisão por endodiogenia.

N: Núcleo; Conóides das células-filhas. Barra de $0,5\mu\text{m}$.

Bradizoítos são originados dos taquizoítos por mecanismos ainda não esclarecidos após um número desconhecido de divisões no interior das células. Esta forma evolutiva possui uma multiplicação mais lenta (*bradi*= lento, em grego) e medem cerca de 7µm de comprimento x 1,5µm de largura, possuem antígenos de superfície e plasmáticos diferentes dos taquizoítos e têm a maior quantidade de micronemas sendo mais resistentes à pepsina e tripsina (WEISS; KIM, 2000; BARBOSA; MUNO; MOURA, 2014). Alterações morfológicas da membrana e do vacúolo parasitóforo vão dar origem aos cistos teciduais que variam de tamanho devido à quantidade de parasitas, onde os mais jovens são menores e podem ser encontrados apenas dois parasitas e os mais velhos são maiores e podem ser encontradas centenas de bradizoítos. Tais cistos podem se desenvolver em diversos tecidos, mas têm preferências em tecidos musculares (cistos mais alongados), nervoso (cistos mais esféricos) e retina (WEISS; KIM, 2010; JONES; DUBEY, 2010) (Figura 2B).

Figura 2: Micrografias das formas evolutivas de *T. gondii*.



Legenda: A. Taquizoítos; B. Bradizoítos dentro da parede cística. C. Oocisto imaturo. Em D oocisto maduro com dois esporocistos e quatro esporozoitos.

Fonte: A, B: elportalde lasalud.com; C e D: Dubey et al, 1988.

Estes cistos teciduais podem permanecer latentes por toda a vida do hospedeiro sem causar respostas inflamatória ou imunológica, evitando que o sistema imune do hospedeiro os destrua (HILL; DUBEY, 2002). Vivendo dentro das células do hospedeiro, sem destruí-las, eles fogem do sistema imunológico servindo como um mecanismo de escape, desenvolvendo a fase crônica da infecção que podem durar anos. Porém, estes cistos podem romper e os bradizoítos se diferenciarem para taquizoítos invadindo novas células hospedeiras formando um novo cisto tecidual (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

Alguns estudos afirmam existir um tropismo para formação de cistos cerebrais em pequenos roedores independentemente da cepa de *T. gondii*, enquanto que em grandes mamíferos, como bois, ovelhas e cabras, os cistos são predominantemente musculares (DUBEY; JONES, 2008).

Oocisto é uma das formas infectantes do parasita e são produzidos nos epitélios intestinais dos felídeos e eliminados ainda imaturos no meio ambiente junto com suas fezes, onde irão amadurecer (figura 2C, 2D) (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). Este amadurecimento pode durar de um a cinco dias e decorre por influência de oxigenação, temperatura e umidade adequada (HILL; DUBEY, 2002; DUBEY, 2004). Esta forma evolutiva é ovoide e possui dupla membrana que ajuda a passar pela acidez do estômago quando ingeridos e a viver no meio ambiente em condições inadequadas sem morrer. Quando esporulados são elípticos com dois esporocistos cada um com quatro esporozoítos. Os esporozoítos medem cerca de 6-8 μm de comprimento x 2 μm de largura e representam uma forma intermediária entre taquizoítos e bradizoítos (figura 2D). Eles são formados após a reprodução sexuada por esquizogonia, gamegonia e esporogonia as quais são realizadas apenas nos hospedeiros definitivos (HILL; DUBEY, 2002; FERGUSON, 2009; JONES; DUBEY, 2010).

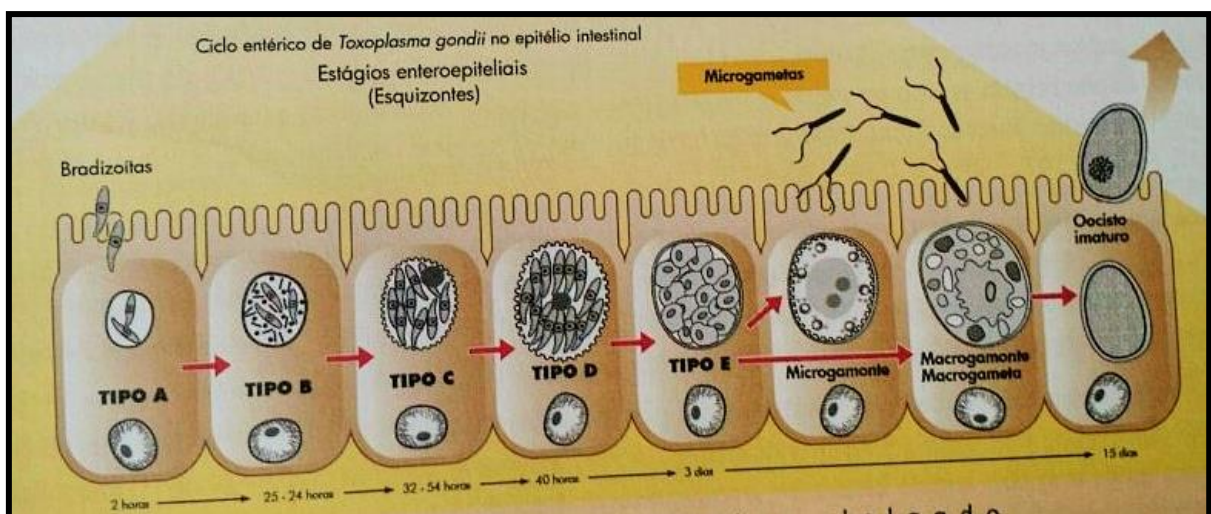
Nos felídeos, os esquizontes localizam-se dentro dos enterócitos entre a superfície interna e o núcleo e são divididos em A, B, C, D e E (figura 3). A partir da ingestão dos cistos e após 12 a 18 horas nas células entéricas mais superficiais e lâmina própria intestinal são encontrados os esquizontes do tipo A (FERGUSON, 2004; SPEER; DUBEY, 2005). O esquizonte B ocorre de 12 a 54 horas após a infecção e se multiplica por endodiogenia, enquanto que os demais se multiplicam

por endopoligenia (multiplicação assexuada em que várias células-filhas se formam no interior da célula-mãe). Esquizonte C é alongado e se desenvolve entre 24 a 32 horas no interior do vacúolo parasitóforo de enterócitos e multiplica-se por endopoligenia. Esquizonte do tipo D desenvolve-se entre 32 a 15 dias após a ingestão dos cistos teciduais e são abundantes nas células epiteliais das vilosidades intestinais e após 40h dividem-se e geram organismos de vários aspectos morfológicos e de 3 a 15 dias após a infecção já se observam os esquizontes E que surgem a partir do esquizonte D que escaparam das células vizinhas (FERGUSON, 2004; SPEER; DUBEY, 2005).

Os tipos A conduz a formação do tipo B e C, onde estes amadurecem rapidamente e desaparece quando surge o tipo D os gametócitos só aparecem com o surgimento do D e E, sugerindo que apenas estes tipos sejam as formas precursoras dos gametas (SPEER; DUBEY, 2005).

Macrogametas e microgametas (figura 3) são as formas sexuais encontrados na parede intestinal dos felídeos, onde este último sai das células intestinais e caem na luz intestinal e são atraídos por quimiotaxia até os macrogametas onde acontecerá a fecundação dando origem ao ovo ou zigoto que se diferenciara em oocisto imaturo rompendo os enterócitos e após a liberação nas fezes ocorrerá a esporulação formando oito esporozoítos dentro de cada oocistos (FERGUSON, 2004; SPEER; DUBEY, 2005).

Figura 3: Ciclo entérico de *T. gondii* no epitélio intestinal do felídeo.



Legenda: A figura mostra as formas evolutivas dos esquizontes, gametócitos e oocistos.
Fonte: Moura, Amendoeira e Barbosa, 2009.

2.5 CICLO DE VIDA DO *T. GONDII*

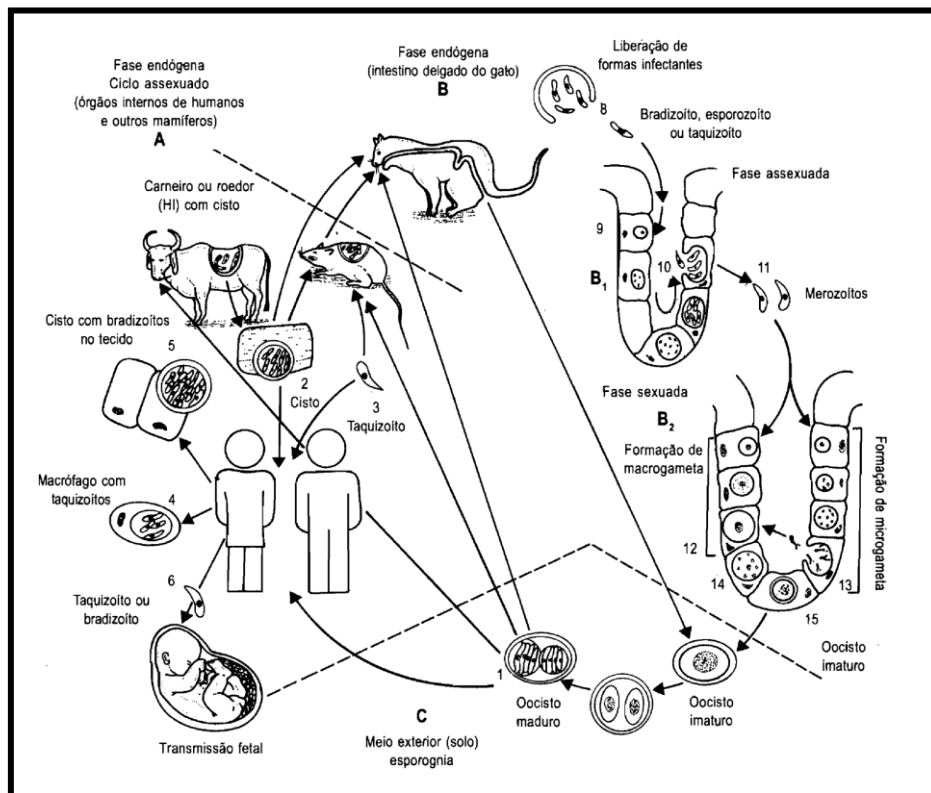
Em um hospedeiro intermediário susceptível ocorre o ciclo assexuado do parasita onde a infecção pode acontecer por transmissão ambiental, seja ela fecal-oral ou por contaminação de carnes mal passadas e cozidas e leites não pasteurizados, e acontece quando oocistos e cistos teciduais contendo bradizoítos passam através do estômago e nele começa o desencistamento da parede do oocisto e do cisto e com a atuação de enzimas proteolíticas que destroem a dupla membrana liberando os esporozoítos e bradizoítos na parede intestinal, os quais invadem ativamente as células epiteliais intestinais, dando origem a uma infecção generalizada. Após a penetração na célula hospedeira, dentro do vacúolo parasitóforo, os esporozoítos, bradizoítos ou taquizoítos se convertem para taquizoítos iniciando sua rápida reprodução por endodiogenia e assim, esta forma atravessa as células epiteliais intestinais alcançam diversos tipos celulares em diversos tecidos por meio da circulação sanguínea e linfática. Esta fase da doença é considerada a fase aguda ou proliferativa e pode acarretar até a morte do hospedeiro principalmente naqueles indivíduos com o sistema imune ainda não completamente formado ou debilitado. O sistema imune tende a eliminar os parasitas extracelularmente de uma forma eficiente nos pacientes com a imunidade inalterada, porém alguns parasitos podem evoluir para a formação de cistos teciduais driblando o sistema imune do hospedeiro diminuindo a sintomatologia e entrando na fase crônica que poderá durar vários anos (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000; FERGUSON, 2009; NEVES, et al, 2011).

A fase sexuada só acontece no epitélio intestinal de felídeos jovens não imunes e são designados de hospedeiros definitivos por que neles os parasitos desenvolvem duas partes dos ciclos, uma assexuada realizada por merogonia (esquizogonia) e uma sexuada realizada por gamogonia (REY, 2011).

Neles, o ciclo acontece após a ingestão de formas infectantes e após passarem pelo estômago (menos os taquizoítos que penetram na mucosa oral), chegam ao epitélio intestinal e sofrem merogonia dando origem a merozoítos. Os conjuntos destes merozoítos dentro das células intestinais nos vacúolos parasitóforos são chamados de merontes ou esquizontes, que após romperem irão

liberar os merozoítos que penetrarão em novas células epiteliais e se transformarão nas formas sexuais gamontes ou gametócitos, sendo o gameta masculino os microgametas os quais são menores e móveis (possuindo dois flagelos) e os femininos, os macrogametas maiores e imóveis. Após o encontro do microgameta com o macrogameta ocorrerá à fecundação e a formação do ovo ou zigoto, a qual evoluirá para oocisto que será liberado nas fezes ainda imaturo. Este no meio externo será amadurecido por um processo chamado de esporogonia que finalizará com dois esporocistos com quatro esporozoítos cada (figura 5). (NEVES, et al, 2011)

Figura 4: Ciclo de vida e transmissão do *T. gondii*.



Fonte: ABN News

2.6 TRANSMISSÃO DA TOXOPLASMOSE

T. gondii é disseminado por diversas formas entre aves e mamíferos, incluindo os seres humanos, o qual é o hospedeiro intermediário ocorrendo nele à

reprodução assexuada do parasita e atuando como um potencial reservatório desta doença.

As vias de transmissão do parasita no hospedeiro intermediário são estabelecidas por dois principais caminhos: pela via vertical por transmissão transplacentária dos taquizoítos, a infecção congênita e pela via horizontal (MONTROYA; LIESENFIELD, 2008), a infecção oral, que pode acontecer por diferentes estágios infecciosos quer pela ingestão de cistos teciduais por carnivorismo, pela ingestão da carne crua ou mal passada, quer pela ingestão oral de oocistos presentes em alimentos, no solo e na água, o que justifica a sua alta incidência entre os vegetarianos e herbívoros e ainda (mas raramente) por taquizoítos eliminados em leites de cabras e vacas não pasteurizados, mas se eles não penetrarem na mucosa oral rapidamente morrerão ao chegar no estômago devido ao suco gástrico pois é a única forma evolutiva que não possui uma parede protetora de resistência (BOYER et al, 2011, NEVES et al, 2011). Além dessas vias de transmissão a disseminação pode acontecer por veículos mecânicos como insetos, vermes e pequenos roedores (JONES; DUBEY, 2010). Assim, a prevalência da infecção não é restrita à presença dos hospedeiros definitivos (felídeos) (TENTER; HECKROTH; WEISS, 2000).

Cada uma das formas evolutivas do *T. gondii* possuem diferenças em relação à infectividade, no qual o cisto tecidual é a forma mais efetiva de infecção para os felídeos, onde este irá liberar oocistos nas fezes que contaminará os hospedeiros intermediários. Porém, eles podem se contaminar também por taquizoítos e oocistos que após a ingestão produzem oocistos em menos de 30% dos animais infectados (DUBEY, 2009). Além de frutas e vegetais crus provenientes de solos contaminados possam também causar infecção.

A transmissão por carnivorismo é o mais comum e bastante eficiente nos carnívoros e onívoros e acontece pela ingestão dos cistos teciduais em carnes cruas e malcozidas e assadas (FERGUSON, 2009) que são predominantes durante a infecção crônica em todos os hospedeiros, mas podem começar a ser produzidos na fase aguda (DUBEY; JONES, 2008). Tais cistos são mais frequentemente encontrados no sistema nervoso central, musculatura esquelética, cardíaca e retina, porém, pode ser encontrados também nas vísceras e pulmão. Da mesma forma que

os oocistos, a parede cística será digerida por enzimas proteolíticas estomacais liberando os bradizoítos que penetram ativamente na mucosa intestinal e transforma-se em taquizoítos alcançando as circulações e disseminando-se onde novamente pode acontecer o seu encistamento (DUBEY; JONES, 2008; DUBEY et al, 2011).

Na transmissão transplacentária ou congênita da toxoplasmose acontece pela infecção primária materna para o feto (MONTROYA; LIESENFELD, 2008) diferentemente do que acontece em ratos ou *hamsters* e outros mamíferos pequenos onde a infecção congênita pode ocorrer por dez ou mais gerações e podem não desenvolver anticorpos contra *T. gondii*, provavelmente por causa da tolerância imune. A infecção pode ocorrer pela ingestão de oocistos ou cistos teciduais, com a liberação de esporozoítos ou bradizoítos respectivamente, e, intracelularmente, ocorrerá à transformação em taquizoítos onde serão liberados ao ambiente extracelular e alcançará a circulação materna atravessando assim a barreira fetoplacentária e proliferando ativamente nos tecidos fetais imunologicamente imaturos (KRAVETZ; FEDERMAN, 2005).

Outras formas de transmissão de baixo risco epidemiológico são apresentadas e estão relacionadas à falta de cuidados com a manipulação do material infectado como em acidentes em laboratórios, que ocorre pela manipulação e ingestão de oocistos esporulados em amostras de fezes de felinos ou contato direto com os taquizoítos ou bradizoítos isolados de animais infectados por cultivos celulares (HERWALDT, 2001).

O leite materno, de vaca e de cabra pode conter e eliminar taquizoítos durante a infecção aguda, onde aconteceria a infecção pela mucosa bucal ao ingerir os leites contaminados. Já que não possuem uma parede cística protetora, tal forma seria eliminada pelas secreções gástricas do estômago, sendo assim, os leites de vacas e cabras devem ser pasteurizados para eliminação desta forma de *T. gondii* (JONES, DUBEY, 2014).

A transmissão por transfusão de sangue ocorre por transfusão de taquizoítos dentro dos leucócitos e transplante de órgãos também pode ocorrer quando os cistos presentes nos tecidos transplantados são provavelmente fonte de infecção, que pode ocorrer por duas maneiras: primeiro, de implante do órgão ou de medula

óssea de um doador infectado em um receptor não imune imunocomprometido; segundo, de um doador não infectado em um receptor imunocomprometido com infecção latente que é ativada pelo próprio procedimento, nesses casos podem estar envolvidos taquizoítos e bradizoítos, apesar da maior propabilidade ser dos bradizoítos. A terapia citotóxica e imunossupressora administrada ao receptor aumenta as chances de infecção ativa em ambas as circunstâncias (HILL; DUBEY, 2002; MONTOYA; LIESENFELD, 2004; BARBOSA; MUNO; MOURA, 2014,).

Apesar de *T. gondii* já ter sido encontrado no sêmen de machos de cabras e de ovelhas e do homem, não há risco de infecção por relação sexual como também já foi encontrado na saliva, mas não existe evidência de sua disseminação pelo beijo (JONES; DUBEY, 2014).

A ingestão de ovos mal cozidos não é considerada um fator de risco importante para toxoplasmose (DUBEY, 2009). No entanto, os ovos devem ser completamente cozidos antes do consumo humano em razão de risco de infecção por outros patógenos.

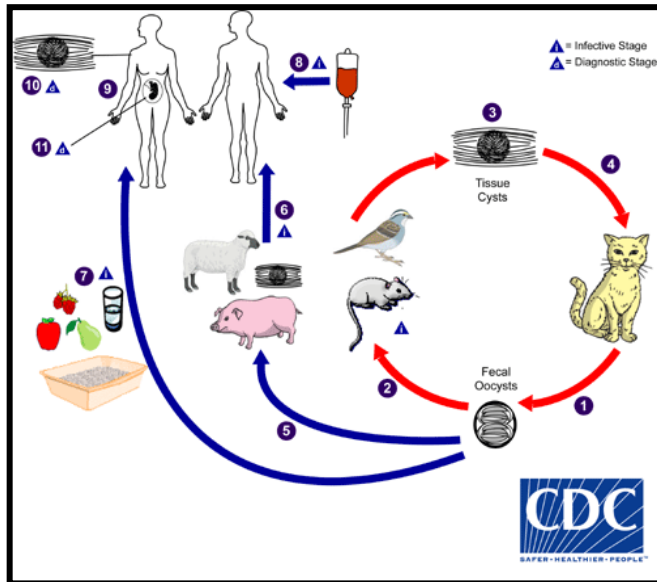
A ingestão de água foi bastante associada à infecção por este protozoário no Brasil (BAHIA-OLIVEIRA et al, 2003; HEUKELBACH et al, 2007), já que eles são resistentes à inativação por cloro, uma filtração especial é necessária para tratar a água potável que pode estar contaminada com oocistos (JONES; DUBEY, 2014)

Os hábitos culturais e de higiene apresentam um papel importante na transmissão, onde, por exemplo, na França, a prevalência sorológica de *T. gondii* é relativamente alta. Isto deve principalmente aos hábitos alimentares e cozimento dos alimentos. O hábito de comer carne crua e mal passada está relacionado a alguns costumes e padrões de vida mais encontrados no mundo ocidental. A maioria dos asiáticos cozinha bem a carne que consome. Essa diferença nos hábitos de cozimento pode ser responsável pelas menores taxas de prevalência de *T.gondii* em algumas regiões como na Ásia e África do que na Europa e América (JONES; DUBEY, 2014).

Além disso, os humanos podem adquirir toxoplasmose por meio de cães domésticos que brincaram com fezes infectadas de gatos. Gatos jovens são capazes de eliminar oocistos durante um mês e estes podem sobreviver em condições favoráveis por 12 a 18 meses e o período pré-patente dos felídeos

depende da forma evolutiva ingerida, onde ocorre até três dias por cistos, dezenove dias por taquizoítos e vinte dias por oocistos (figura 6). (NEVES; 2011)

Figura 5: Formas de transmissão da toxoplasmose.



Fonte: CDC.

Para eliminar os espécimes de *T. gondii* nas carnes de animais infectados alguns cuidados são utilizados na manipulação desse alimento, como tratamento com sais (rotulados como carne “aprimorada”) que matam os cistos teciduais de *T. gondii*, frangos vendidos em varejos são congelados, o que também mata o parasita (JONAS; DUBEY, 2014). Os cistos teciduais não são resistentes ao cozimento convencional a mais de 60°C ou ao armazenamento abaixo de -12°C, além da salga, a defumação e a preparação de conservas se feitas de modo adequado podem matar os cistos teciduais, porém tais procedimentos não são padronizados (DUBEY et al, 1990). O aquecimento ao forno de micro-ondas não pode garantir a morte do parasita na carne devido aos pontos quentes e frios, o armazenamento da carne em temperaturas mais altas não matam os cistos teciduais, pois eles sobrevivem ao armazenamento à temperatura de 4 a 6°C por até 2 meses (LUNDEN; UGGLA, 1992).

2.7 EPIDEMIOLOGIA DA TOXOPLASMOSE

A infecção por *T. gondii* em homens e animais é bastante disseminada ao redor do mundo e tem sido relatado com taxas de até 75% (PAPAS; ROUSSOS; FALAGAS, 2009), mas modifica em diferentes áreas geográficas de um país, podendo variar de 4% na Coreia a um máximo de 92% no Brasil (dependendo da região) o que deduz que um terço da população mundial esteja infectado por *T. gondii* sob a forma da doença crônica assintomática por vários anos (SROKA, et al, 2010). As causas para esta variação ainda não são conhecidas, mas acredita-se que o fator ambiental esteja relacionado ao aumento da infecção em determinados países.

Condições ambientais que estão relacionadas à esporulação e à sobrevivência dos oocistos no ambiente podem determinar o grau de disseminação natural da infecção por *T. gondii*. Estudos relacionados à localização geográfica indica existir uma prevalência mais alta em regiões de clima tropical e subtropical, com umidade e temperaturas altas favorecendo a sobrevivência dos oocistos no meio ambiente, já que precisam de calor e umidade para se tornar infectantes (BARRAGAN; SIBLEY, 2003; BOJAR; SZYMANSKA; 2010; JONES; DUBEY, 2014).

Na Europa, América Central e América do Sul a soroprevalência por este parasita é maior podendo atingir em torno de 50 a 80% dos adultos. Nos Estados Unidos e na Inglaterra de 16 a 40% da população estão infectados (HILL; DUBEY, 2002; BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003). Porém, segundo Jones et al (2007) foi constatada uma diminuição na prevalência e taxa de infecção nos EUA e na Europa que podem ser devido a uma manutenção mais higiênica de chiqueiros, aumento da proporção de carne congelada e educação em saúde.

Um estudo realizado por Dubey e colaboradores em 2005 nos Estados Unidos não se detectou infecção por *T. gondii* na carne bovina, e as carnes de cavalos não são frequentemente ingeridas por humanos, as aves são geralmente bem cozidas antes do consumo. O cordeiro é provavelmente uma fonte de infecção em muitos países, porém o consumo deste animal nos Estados Unidos e em outros países é relativamente pequeno. Algum tempo depois Bobic e colaboradores (2007) fazendo um estudo de caso-controle realizado também nos Estados Unidos

descobriu que a carne mal cozida é um importante fator de risco para infecção por este parasita e na Europa a ingestão de carne cozida inapropriadamente, seja de cordeiro, boi ou de caça, foi identificada como principal fator de risco.

Em alguns países africanos pode-se encontrar uma variação de 35 a 84% (TENTER et al., 2000), porém neles a situação é mais grave, já que aproximadamente 25 milhões de africanos estão expostos ao HIV/aids (UNAIDS, 2005).

Quando estudamos a taxa de prevalência do Brasil e seus fatores de risco vemos uma variável taxa de infecção por *T. gondii*, mas relativamente alta que pode estar relacionada ao solo, água, alimentação e região. Alguns estudos de prevalência da toxoplasmose clínica, e tem sido determinada entre 50% e 80% (CANTOS et al., 2000; HOFFMANN, 2006; DUBEY et al, 2012). No Rio de Janeiro se observou uma soroprevalência de 79%; 71% em Manaus, e variou de 52% a 65% entre indígenas brasileiros (BÓIA et al, 2008); em São Paulo essa taxa é de 68% (KAWARABAYASHI et al., 2007) e em Recife varia de 64 a 79% (COELHO et al., 2003). Porém, um estudo de soroprevalência realizado por Cabral e colaboradores (2008) em Brasília, foi verificado uma baixa prevalência de *T. gondii*, devido a esta cidade possuir uma estrutura socioeconômica diferente do resto do país. Outra cidade onde o alto fator socioeconômico está relacionado à baixa prevalência deste parasita é em Campos dos Goytacazes no Rio de Janeiro (BAHIA-OLIVEIRA et al, 2003).

A proporção de infecção dos homens por este parasita causada pela ingestão de carne crua ou malpassada contendo cistos teciduais e a porcentagem de casos decorrentes da presença de oocistos nas mãos ou em vegetais não lavados não são ainda conhecidas, mas é provável que em lugares onde haja uma maior quantidade de gatos, como em Costa Rica e Brasil, a infecção maior seja por oocistos, quando comparado com Paris onde a população de gatos é controlada, mas se come muita carne crua e malpassada a infecção ocorra por cistos teciduais (JONES; DUBEY, 2014).

Sabendo que os gatos são animais domésticos que auxiliam ao combate de roedores e que o *T. gondii* pode lesionar o tecido neural de ratos e camundongos infectados, causando prejuízo na memória e anormalidades comportamentais, um

estudo realizado por Lamberton, Donnelly e Webster em 2008 sugere uma hipótese de que *T. gondii* pode manipular o comportamento do seu hospedeiro para sua própria vantagem. Esse comportamento pode ajudar a garantir que os roedores infectados por este protozoário sejam comidos pelos gatos devido à infecção tornarem os roedores menos neofóbicos, levando a uma menor aversão ao odor dos gatos, e devido a isto, o ciclo de vida do parasita seria preservado.

São poucos os relatos sobre a prevalência em crianças pequenas. Em 2005 um estudo realizado por Jones e colaboradores com crianças da Guatemala de 3-10 anos foram encontrados anticorpos circulantes de *T. gondii* em 37,8% dos casos, a soroprevalência aumentou de 25% aos três anos para 45% aos cinco anos de idade.

Em relação à etnia a prevalência também varia, mas é relacionada aos hábitos sanitários e de alimentação e não às diferenças genéticas. A maioria das pesquisas demonstrou uma prevalência rural maior do que a urbana, mas algumas não mostraram diferenças e outras tiveram maior prevalência em indivíduos urbanos do que nos rurais, além de descobrir que trabalhadores de matadouros e pessoas que tiveram muito contato com solo e animais, existem também uma maior prevalência em garís. Foi visto também que a prevalência aumenta com a idade e não tem uma diferença significativa entre os gêneros (MONTROYA; LIESENFIELD; 2008).

2.8 PATOGENIA

Nos homens, após a ingestão de cistos ou oocistos de toxoplasma, a infecção geralmente é benigna e autolimitada, mas dependem do tamanho do parasita, virulência do parasita, suas características gênicas e sistema imunológico do hospedeiro. As reações imunes serão desenvolvidas nas primeiras semanas de infecção provocando uma resposta imunológica associada à produção de anticorpos específicos do *T. gondii* (AMATO NETO et al, 2008).

Após disseminar-se pela via hematogênica, os bradizoítos e taquizoítos podem acometer qualquer órgão, podendo iniciar uma necrose e inflamação tecidual e em seguida organizar-se em cistos, que é a forma de resistência do *T. gondii*, contendo inúmeros parasitas no seu interior por vários anos. Nos

imunocomprometidos podem ocorrer lesões e sequelas importantes após infecção inicial, apesar de que o mais comum é que a reincidência ocorra após a infecção latente (CYPE, 2014).

Sabendo que as três linhagens distintas de *T. gondii* parecem influenciar no prognóstico da doença, estudos indicam que o genótipo tipo I está envolvido nos casos de infecção com coriorretinite e que pode evoluir para uma forma mais agressiva e que é encontrado em alta prevalência nos países da América do Sul, inclusive no Brasil (MERCIER et al, 2005; KHAN et al, 2006; DEMAR et al, 2007; GILBERT et al, 2008; MERCIER et al, 2010). O genótipo II predomina nos casos de encefalite dos pacientes imunocomprometidos da América do Norte e Europa (CARRUTHERS; SUZUKI, 2007).

As cepas com genótipos atípicos são responsáveis por infecções graves ou letais nos indivíduos imunocompetentes, o que pode ocasionar uma pneumonia, miocardite ou meningoencefalite.

Estudos experimentais em diversos animais verificaram que na fase aguda e generalizada os parasitas invadem diversas células, como leucócitos e macrófagos e tecidos, como cérebro (toxoplasmose cerebral) e pulmões (toxoplasmose pulmonar). O envolvimento do SNC e o pulmão podem ocorrer isoladamente ou em associação com a toxoplasmose disseminada que afeta múltiplos órgãos, tais como os gânglios linfáticos, baço, fígado, rim, coração, glândulas suprarrenais, medula óssea, trato digestivo e testículos. Nesta fase, pode-se encontrar de dezenas a centenas de parasitas intracelularmente. Como taquizoítos, a multiplicação é rápida nesta fase inicial da doença e em alguns animais essa ação destrutiva logo pode levar à morte, se, por exemplo, o hospedeiro for infectado pela linhagem mais virulenta. Quando a infecção ocorre devido a linhagens pouco ou não virulenta, a quantidade de parasitas encontrados dentro das células possui menos de 20 parasitas, a parasitemia começa então a diminuir, mas a partir do quarto dia já pode ser encontradas células parasitadas no cérebro e aos quatro meses os cistos já possuem seu alcance máximo podendo medir de 40 a 50µm e pode possuir até 3000 parasitas. Na fase crônica podem ser visualizados pequenos cistos ao redor dos cistos maiores e em torno deles não se observa nenhuma reação do tecido (REY; et al, 2011).

Em relação aos aspectos clínicos, a toxoplasmose pode ser dividida nos imunocompetentes em infecção congênita (adquirida ou reincidiva), nos imunodeficientes e infecções oculares (SAADATNIA; GOLKAR; 2012). Em 80 % dos casos a infecção primária nos imunocompetentes é assintomática nos países da América do Norte e Europa (MONTROYA; LIESENFELD; 2008), nos casos sintomáticos os pacientes podem apresentar febre, linfadenopatia cervical, mialgia, astenia e outros sinais clínicos inespecíficos (BOYER et al; 2005) e por isto o diagnóstico diferencial deve ser considerado em todos os casos e suas interpretações devem ser analisadas juntamente com suas características clínicas (REMINGTON et al; 2006). A linfadenopatia pode ser transmitida por várias semanas e ser confundida com a mononucleose infecciosa (BOYER et al; 2005).

A coriorretinite toxoplásmica pode manifestar-se como infecção primária, embora pensasse que a toxoplasmose ocular era devido a uma infecção congênita. Delair e colaboradores (2008) realizaram um estudo retrospectivo e atribuiu que 100 dos 425 casos de toxoplasmose oculares estudados (23,5%) foram conferidos a toxoplasmose adquirida.

Embora a maioria das infecções congênicas seja primárias adquiridas durante a gestação, a transmissão parasitária também pode ocorrer em grávidas imunocompetentes e previamente imunizada que são reinfetadas com o *T. gondii* durante a gestação (KODJIKIAN et al, 2004; ELBEZ-RUBINSTEIN et al, 2009).

A taxa de transmissão congênita e gravidade de doença no feto são inversamente relacionadas. O risco de transmissão aumenta durante a gestação (a partir de 1% a 90%), mas a gravidade da doença no feto diminui (MONTROYA; ROSSO, 2005; SROKA et al, 2010). Durante o início da gestação, a placenta (órgão que serve para proteger o feto durante a gestação) é mais eficaz em relação às barreiras placentárias levando à passagem de parasitas em menos de 10% dos casos durante o primeiro trimestre, mas torna-se mais permeável no decorrer da gestação permitindo a passagem em torno de 30% dos casos no segundo trimestre e de 60 a 70% dos casos no terceiro trimestre e ainda mais perto durante o parto (DUNN et al, 1999; MONTROYA; LIESENFELD, 2008).

Quando a infecção acontece no primeiro trimestre pode ocorrer anormalidades graves e levar ao aborto. As multiplicações do parasita leva a focos

de necrose e processos inflamatórios graves, levando a maiores gravidades no tecido cerebral. As principais sequelas incluem retardo mental, convulsões, microcefalia, hidrocefalia, surdez, deficiência psicomotora (REMINGTON et al, 2001). Lesões oculares também são encontradas e as mais graves com microftalmia, catarata, estrabismo e necrose na retina são também observados (ROBERTS et al, 2001; DELAIR et al, 2011). No segundo trimestre a infecção fetal pode variar podendo ocorrer hepatoesplenomegalia ou calcificações cerebrais. Manifestações clínicas após o nascimento pode ocorrer como a epilepsia, anemia, petéquias, erupções cutâneas, distúrbios hepáticos, pneumonite ou retinocoroidite (REMINGTON et al, 2001, ANDRADE et al, 2010).

Em um estudo realizado por Villena e colaboradores (2010) utilizando 272 casos realizado na França em 2007, foi verificado que onze casos resultaram em terminos da gravidez por lesões cerebrais ou morte fetal e 87% dos nascidos vivos foram assintomáticos, 13% apresentaram calcificações intracranianas ou hidrocefalia e/ou retinocorióide de gravidade variável. Em qualquer caso, a patogenicidade pode diferenciar de acordo com o genótipo da cepa, já que as lesões retinianas são mais frequentes em lactentes brasileiros infectados durante a gestação (VASCONCELOS-SANTOS et al, 2009). Um estudo de coorte prospectivo comparando as crianças brasileiras e européias contaminadas por toxoplasmose congênita mostrou que as crianças brasileiras apresentavam cinco vezes mais risco para se desenvolverem e suas lesões eram maiores, múltiplas, recorrentes e propensas a prejudicar a visão (GILBERT et al, 2008).

A reativação da infecção pode levar a infecção congênita em grávidas com HIV onde já foram relatados vários casos (LINDSEY; DUBEY, 2011), outros foram descritos em mulheres grávidas previamente imunizadas, mas viajaram para locais que circulavam genótipos atípicos e desenvolveram toxoplasmose congênita (ELBEZ-RUBINSTEIN et al, 2009).

Contrastando com a toxoplasmose nos imunocompetentes a toxoplasmose é sempre fatal em imunocomprometido independentemente da cepa, ainda que a resposta imune do hospedeiro seja de importância primordial. As infecções pelo HIV e as terapias imunossupressoras são os principais fatores que podem levar à imunodepressão. A infecção acontece quando o cisto é reativado e rompido

liberando os parasitas, mas o risco difere dependendo das categorias dos pacientes. Em pacientes transplantados, a toxoplasmose grave ou disseminada pode resultar da ativação da infecção linfática no receptor ou infecção no órgão contendo cisto de um doador soropositivo dado a um receptor soronegativo (ROGERS et al, 2008; MARTINA et al, 2011).

A patogenia da toxoplasmose nos imunodeprimidos tem uma relação ainda desconhecida sobre a conversão dos bradizoítos em taquizoítos, sabe-se que a integridade do sistema imune tem um papel importante em manter o estado de latência clínica da toxoplasmose. Na infecção aguda, a resposta imune não é capaz de eliminar todos os parasitas do organismo e muito deles são conservados em cistos teciduais latentes durante toda a vida do hospedeiro (AMATO NETO et al, 2008).

Foi a partir da década de 80, com o advento da aids, que as formas de reativação do parasita nos indivíduos imunocomprometidos tiveram maior importância epidemiológica. A soroprevalência da toxoplasmose nestes pacientes varia de acordo com o país de origem e o grupo socioeconômico a que pertencem, assim como, fatores geográficos, clima, hábitos culturais, alimentares e sociais, porém tem uma maior importância epidemiológica em regiões de alta prevalência para o *T. gondii* como o Brasil (REMINGTON et al., 2001; AMATO NETO et al, 2008; PEREIRA-CHIOCCOLA; VIDAL; SU, 2009).

Em PVHA está intimamente relacionada aos linfócitos TCD4⁺, com aumento de risco quando sua contagem cai para menos de 100 células/mm³. A encefalite toxoplásmica é a manifestação mais frequente nestes indivíduos e pode levar a vários sintomas como dores de cabeça, letargia, ataxia, hemiparesia, perda de memória, demência e crises epilépticas focais. Outros órgãos podem estar envolvidos seja por que ocorreu o encistamento do parasita na infecção inicial nos órgãos de preferência do parasita ou por que são secundariamente infectados após a liberação do parasita de um local de reativação da infecção inicial. Após o cérebro, os órgãos mais envolvidos nestes processos são: pulmões, olhos e coração, resultando em miocardite, além de fígado, pâncreas, medula óssea, bexiga, gânglios linfáticos, rins, baço e pele (ROBERT-GANGOUX; DARDÉ, 2012). Toxoplasmose pulmonar e disseminada é principalmente vista em pacientes transplantados que

desenvolve rapidamente e de disseminação maciça dos parasitas (PATRAT-DELON et al, 2010).

Em PVHA a toxoplasmose atua como uma importante infecção oportunista e pode causar reativação de uma infecção latente resultando em uma encefalite toxoplásmica a qual é potencialmente fatal se não tratada adequadamente (SAADATNIA; GOLKAR, 2012).

A encefalite por *T. gondii* é considerada uma doença definidora de aids, sendo a mais frequente doença neurológica oportunista encontrada tanto nos países em desenvolvimentos como nos desenvolvidos. Com a introdução da terapia antirretroviral (TARV) observou um importante progresso no tratamento da infecção pelo HIV e recuperação imunológica dos pacientes e com isso a incidência de TC diminuiu. No entanto, em alguns países em desenvolvimento, as terapias com antibióticos ou TARV não são amplamente disponíveis e com isso o impacto da terapia na redução das doenças definidoras tende a ser menor, portanto, a toxoplasmose continua sendo um grande problema em PVHA e devido a isto, a prevalência de distúrbios cerebrais ainda conta com uma considerável proporção de mortalidade e morbidade, especialmente em países em desenvolvimento (ANTINORI et al., 2004; VIDAL et al., 2005; PEREIRA-CHIOCCOLA; VIDAL; SU, 2009).

Em países com altas taxas de incidência pelo *T. gondii* estão se utilizando a triagem sorológica em pacientes infectados pelo HIV com a finalidade de se evitar uma encefalite toxoplásmica (MOHRAZ, et al, 2011).

Um terço dos pacientes com IgG anti-*T.gondii* desenvolve a doença de reativação, porém, mesmo raro, a ausência dessa IgG não exclui a encefalite toxoplásmica. A diminuição da doença acontece quando os pacientes são submetidos ao uso da sulfametoxazol-trimetoprim ou dapsona e pirimetamina (WALKER e ZUNT, 2005; KAPLAN et al, 2009; OLIVEIRA et al, 2016).

Analisando macroscopicamente a encefalite toxoplásmica nota-se vários pontos necróticos hemorrágicos e não hemorrágicos de até 4cm de diâmetro, estas lesões podem atravessar um sulco e envolver o córtex adjacente. Quando a doença já está avançada e com aumento da pressão intracraniana podem-se encontrar alterações típicas de herniação. Ao analisar a microscopia, os focos necróticos encontram-se com monócitos, linfócitos e plasmócitos e na periferia encontram-se os

taquizoítos, medindo de 1 a 2µm e que após múltiplas replicações e preencher toda a célula, eles começarão a ter contornos irregulares e são denominados de pseudocistos, já que os cistos verdadeiros são mais arredondados. Em um estágio mais avançado os focos necróticos tornam-se calcificados o que explica os achados radiológicos característicos de calcificação e quando atinge o aqueduto cerebral, ocorre a hidrocefalia (BURNIER JR; FERNANDES, 2014).

A patogenia da TC nos indivíduos imunocomprometidos acontece quando os cistos latentes sofrem reativação, com resultado ocorre uma conversão de bradizoítos em taquizoítos ativos e que devido a sua alta capacidade de replicação e preferência do SNC acometem principalmente o encéfalo e a retina. Esta preferência do *T. gondii* ao SNC ainda não é bem compreendida, mas acredita que é devido ao ambiente imunoprivilegiado e que apresenta um estrito controle anti-inflamatório (WALKER e ZUNT, 2005; PEREIRA-CHIOCCOLA, VIDAL e SU, 2009).

As manifestações clínicas da TC em PVHA podem variar conforme o tipo e a intensidade da imunossupressão. Acontece diferenças dessas manifestações nos pacientes imunocomprometidos, onde nos pacientes com aids existe uma diminuição nos linfócitos TCD4⁺ e nos transplantados existe uma imunossupressão mais ampla (WALKER e ZUNT, 2005).

A encefalite nos PVHA caracteriza-se com lesões focais únicas ou mais frequente, múltiplas e a infecção geralmente pode apresentar de subaguda para aguda em cerca de 10% dos casos e as manifestações variam conforme o número e a localização das lesões. Raramente podem ocorrer lesões na medula espinhal, paraparesias, déficits sensoriais e bexiga neurogênica. Em alguns pacientes observam-se também alterações comportamentais sugestivas de quadro psiquiátrico como ansiedade exagerada, agitação e perda rápida das competências cognitivas com aspecto demencial (AMATO NETO et al, 2008; PEREIRA-CHIOCCOLA, VIDAL e SU, 2009; KAPLAN et al, 2009; CYPEL, 2014; OLIVEIRA et al, 2016).

2.9 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA TOXOPLASMOSE

As diversas formas de apresentação clínica da toxoplasmose faz com que o diagnóstico laboratorial necessite de constante atualização (FLORI et al, 2009). Com

isto, inúmeros recursos laboratoriais têm sido desenvolvidos para uma melhor análise clínica sempre tentando alcançar uma ótima sensibilidade, especificidade. Assim, o diagnóstico pode ser detectado por via indireta que se dá pela detecção de anticorpos e citocinas direta, e por via direta que inclui a detecção do próprio organismo (KASPER et al, 2009). Além de juntar a estes resultados as informações clínicas e epidemiológicas e de outros dados laboratoriais para se chegar a uma conclusão definitiva do microorganismo estudado (GARWEG, 2005).

O diagnóstico laboratorial inclui um conjunto de avaliações sorológicas indicativas de toxoplasmose aguda adquirida, da doença crônica latente ou mesmo de infecções congênitas. A infecção produz nos indivíduos respostas de imunidade humoral e celular, os anticorpos presentes podem ser evidenciados com técnicas laboratoriais específicas para a determinação do diagnóstico, servindo também para apurar o tempo de aquisição da doença (CYPEL, 2014).

Quando realizado diagnóstico indireto, o mais empregado é a pesquisa de anticorpos, e existem várias técnicas que podemos utilizar e que permite até caracterizar o isótipo e a subclasse do anticorpo detectado (KASPER et al, 2009).

Sabin-Feldman ou teste do corante (dye-test) foi primeiro teste descrito em 1948 e detecta praticamente todas as classes de anticorpos contra *T. gondii* (SABIN; FELDMAN, 1948). Foi o primeiro teste desenvolvido para o diagnóstico laboratorial da infecção *T. gondii* e ainda é considerado o padrão-ouro para sorologia de *Toxoplasma*. É altamente sensível, específico e quantitativo, no entanto, só pode ser realizados em centros de referência devido a exigência de taquizóitos vivos e diluídos, que são amplificados nos peritônios dos ratos ou em cultura de células. Esta última proporciona a oportunidade para que o ensaio seja mais amplamente disponível (CHATTERNON et al, 2002). O teste utiliza os *Toxoplasmas* que ao contato com o anticorpo do soro irão neutralizar tais parasitas e o azul de metileno não penetrará no parasita, este terá uma cor azulada se não tiver anticorpos no soro. Esta técnica necessita da manutenção dos parasitas vivos em cultura e possui subjetividade de leitura os que a torna dispendiosa não sendo realizada de rotina (GARWEG, 2005; KASPER et al, 2009).

A imunofluorescência indireta (IFI) é mais um teste econômico e mais seguro para realizar do que o Sabin e que mede os mesmos anticorpos que este. Neste

teste, os anticorpos específicos de *T. gondii* presentes nas amostras de soro diluídas em série se ligam aos taquizoítos intactos, fixados a uma lâmina de vidro. O complexo é então detectado usando uma enzima imunohistoquímica fluorescente IgG anti-humana ou IgM. O IFI requer a utilização de um microscópio de fluorescência. Os resultados do teste são fáceis de avaliar visualmente, mas a interpretação é subjetiva e demorada (RORMAN et al, 2006). IFI provou ser muito específica tendo a vantagem de utilizar o parasita preservado fixado em lâmina, mas com uma sensibilidade mais baixa em comparação com o Sabin (ILSON; JONES;McAULEY, 2003). Apesar de ser uma técnica utilizada rotineiramente pode apresentar resultados falso-positivos na detecção de anticorpos da classe IgM pela interferência de fatores reumatóides, eventualmente presentes no soro (FERREIRA e ÁVILA, 2001).

A detecção destes anticorpos podem ser realizadas por quimioluminescência, imunofluorescência e ensaios imunoenzimáticos (EIA ou ELISA) (KASPER et al, 2009). O ELISA apresenta elevada sensibilidade e especificidade, bem como rapidez, simplicidade técnica, versatilidade e objetividade de leitura. Detecta quantidades extremamente pequenas de anticorpos, podendo ter elevada precisão, se os reagentes e os parâmetros do ensaio forem bem padronizados (FERREIRA e ÁVILA, 2001).

O imunoensaio enzimático (EIA) é o teste de diagnóstico de toxoplasmose mais comum em laboratório. ELISA e o imunoensaio enzima-fluorescente (ELFA), que detecta a presença de anticorpos IgG, IgA, IgE, IgM e anticorpos específicos para o parasita no soro humano, são o segundo EIAs mais comuns. Estes testes estão disponíveis em Kits comerciais e plataformas automatizadas. Mais recentemente, EIAs foram disponibilizados para analisadores automáticos que usam uma variedade de métodos de detecção, incluindo quimiluminescência. A tecnologia quimiluminescente foi usado para determiná-la quantitativamente a especificidade anticorpos *T. gondii* anti-IgG e IgM. O imunoensaio automatizado baseado em quimioluminescência e antígeno ligado a micropartículas magnéticas é outra abordagem EIA (SICKINGER et al, 2008). Neste último caso, o antígeno que é adsorvido sobre as superfícies das micropartículas com alta densidade, permite que os anticorpos específicos unam com ambos os locais de ligação (CURDT et al,

2009). EIAs são úteis como testes de triagem por serem rápido e de baixo custo, e foram melhorados ao longo dos anos para evitar resultados falso-positivos devido à detecção não específica de fatores que interferem, como fator reumatóide e anticorpos antinucleares. O grande defeito destes ensaios é por serem pouco padronizados devido a variações na qualidade do antígeno e consequentes podem trazer resultados variáveis. A substituição de antígenos taquizoítas com antígenos recombinantes pode melhorar a reprodutibilidade do teste e reduzir reações cruzadas, melhorando, assim, a especificidade do teste. Além disso, a utilização de antígenos recombinantes reduz o custo de trabalho necessário para a produção de testes de diagnósticos. Recentemente, um número de EIAs recombinantes foi disponibilizado comercialmente com eficiência promissora (PFREPPER et al, 2005).

O teste de aglutinação direta não precisa de nenhum equipamento ou conjugados especial e detectam os anticorpos IgG anti-*Toxoplasma* que reagem com os antígenos de membrana. Possui uma alta sensibilidade e especificidade (96 e 98%, respectivamente) e possui boa correlação com o Sabin, sendo útil como teste de triagem (SAADATNIA; GOLKAR 2012).

O teste de aglutinação diferencial ou teste HS/AC, compara títulos obtidos com taquizoítos fixados em formalina (antígeno HS) com aqueles taquizoítos fixados com acetona ou metanol (antígeno AC). A preparação de antígeno contém antígenos AC específicos que são preferencialmente reconhecidos por anticorpos IgG formados contra taquizoitos de *Toxoplasma* no início da infecção. Os soros de pacientes com infecção aguda tendem a aglutinar ambos o HS e AC. No entanto, em casos que infecção foi adquirida no passado são observados tanto títulos mais elevados no teste de aglutinação HS e títulos mais baixos ou negativos na aglutinação de AC (MONTROYA et al, 2007).

O teste de aglutinação em látex (LAT) é fácil de executar e sensível, mas existem problemas com a sua especificidade. O ensaio envolve o revestimento de partículas de látex inativo com o antígeno do *Toxoplasma*. As partículas aglutinam-se na presença de anticorpos *Toxoplasma* presentes no soro de pacientes infectados ou animais. A resposta de anticorpo na infecção aguda pode não ser detectada por várias semanas com estes testes, refletindo uma predominância de antígenos citoplasmática presentes nos ensaios (SAADATNIA; GOLKAR 2012).

O ensaio de aglutinação imunossorvente (ISAGA) é altamente específico para a detecção de anticorpos anti-*T. gondii* IgM, IgA, ou IgE. O ISAGA faz uso da totalidade do taquizoíto e é considerado um dos mais sensíveis testes sorológicos para Toxoplasmose comercialmente disponível. No entanto, requer um alto grau de especialização e não é automatizado. O ISAGA também é aplicado para a detecção de anticorpos específicos IgE e IgA (PINON et al, 2001).

Outro exame imunológico é o *Western blot* onde antígenos do parasita são separados em gel sob ação de uma carga elétrica, depois, estes antígenos separados são transferidos a uma membrana de nitrocelulose novamente com ação de carga elétrica formando colunas proteicas de nitrocelulose e com isto o soro do paciente é aplicado nas colunas e se existir anticorpos ligarão aos antígenos formando o complexo antígeno-anticorpo e que é revelado após a adição de um substrato da peroxidase que se precipita na celulose mostrando um borrão se o resultado for positivo. Esta técnica possui alta sensibilidade e especificidade (GRANATO; PAULINI JUNIOR, 2014), mas o custo e a mão de obra pode ser algumas das limitações deste teste.

Estes testes ao serem comparadas entre si e com o padrão-ouro para detecção de IgM revelam sensibilidade entre 96 a 100% e especificidade de 75 a 95%, com uma média de 92,4% (KASPER et al, 2009; GRANATO; PAULINI JUNIOR, 2014). IgM positiva e IgG negativa e que não ocorra uma soroconversão de IgG pode indicar um falso-positivo, porém quando a IgG é positiva junto com a IgM existe uma necessidade de testes adicionais para ter o resultado verdadeiramente positivo. A detecção de IgA é semelhante ao IgM, onde podem permanecer detectável por até quatro meses (FLORI et al 2009; GRANATO; PAULINI JUNIOR, 2014).

Ao realizar o diagnóstico direto visa detectar o próprio *T. gondii* ou componentes de sua estrutura (proteínas ou ácido nucléico) no plasma ou nos líquidos biológicos. Várias técnicas encontram-se descritas na literatura entre elas o isolamento do *Toxoplasma*, porém não é uma técnica utilizada na prática clínica, a qual requer rapidez para um melhor prognóstico do paciente já que esta técnica envolve a inoculação do material biológico em culturas de células de rim de macaco verde africano (*in vitro*) ou a inoculação em camundongos usados para infectar

culturas de células (*in vitro*) é o método de referência devido a sua alta sensibilidade e especificidade, sendo a sua desvantagem a demora do resultado obtido e que requer instalação laboratorial adequada e técnicos capacitados, acarretando um alto custo para testes individuais, e por ser um procedimento que envolva multiplicação e identificação do agente requer tempo o que inviabiliza o uso clínico (GARWEG, 2005; GRANATO; PAULINI JÚNIOR, 2014).

Em geral, o diagnóstico de toxoplasmose claramente deixa espaço para melhoria dos métodos biológicos, como as técnicas moleculares as quais oferecem grande esperança em vista de a sua elevada sensibilidade e especificidade. (BASTIEN, 2002). Assim, outro recurso direto que pode ser empregado e utilizado na prática clínica são as técnicas de biologia molecular com variantes de amplificação do DNA do *Toxoplasma*, como a reação em cadeia de polimerase (PCR) (ABDUL-GHANI; 2011).

O sistema de PCR envolve vários ciclos de três etapas: desnaturação, anelamento e extensão. A dupla fita do DNA alvo é desnaturada através do aumento da temperatura para 92/95°C, onde irá quebrar as pontes de hidrogênio que mantêm as fitas unidas. Esta etapa expõe a fita molde de DNA à qual se anelará a outra fita de DNA que contenha seqüência complementar a ela (iniciador). Esta técnica não exige que o DNA esteja puro, podendo ser detectado em misturas de DNAs ou com outras substâncias. No entanto, uma sensibilidade mais alta é adquirida se o DNA estiver purificado. No anelamento, a temperatura é rapidamente reduzida para 35/60°C, dependendo essencialmente do tamanho e seqüência dos iniciadores utilizados, permitindo a hibridização DNA-DNA de cada iniciador com as seqüências complementares que rodeiam a região alvo. Na extensão a temperatura é novamente elevada, mas agora em 72°C para que a enzima DNA polimerase realize a extensão no sentido 5'→3' a uma velocidade de cerca de 24 nucleotídeos por segundo (SCHEINERT et al., 2005; MELO, 2006). Após 20 ciclos mais de um milhão de vezes a quantidade inicial de DNA foi amplificada e ao término o fragmento é visualizado em gel de agarose ou poliacrilamida após coloração (SWITAJ et al, 2005).

Outro sistema baseado em PCR é a multiplex onde são amplificados dois ou mais segmentos diferentes do DNA em uma única reação, utilizando-se para isso

mais de um conjunto de pares de primers. Assim, permitindo amplificar mais de um segmento do genoma do parasito, garantindo 100% de especificidade diminuindo os falsos-positivos. Por permitir a amplificação simultânea de múltiplos alvos, a PCR multiplex vem sendo bastante utilizada no diagnóstico da toxoplasmose e outros microorganismos, assim, os sistemas de PCR convencional e multiplex são úteis para identificar *T. gondii* em diversas amostras biológicas (DABIL et al, 2001).

Outro método que pode ser introduzido no diagnóstico da toxoplasmose é a PCR quantitativa (qPCR) que pode ser útil pra obter dados adicionais que serve de auxilio para a escolha do tratamento específico, visto que a carga parasitária pode ser quantificada e relacionada com os sintomas, além de ser útil para a avaliação do tratamento e na reativação da toxoplasmose (COSTA et al, 2000) pode ser utilizada para várias aplicações por estimar a quantidade relativa de produtos de PCR e assim, descreve a presença do agente etiológico. Pode ser utilizado para quantificar tanto RNA como DNA, aonde o primeiro vem sendo amplamente pesquisado. A variabilidade da quantidade de alvos iniciais e a presença de vários inibidores podem, entretanto, afetar adversamente a cinética e eficiência da PCR.

A qPCR em tempo real (qPCR) (HEID et al., 1996), usando uma 5'-nuclease fluorogênica ou ensaio "TaqMan" (HOLLAND et al., 1991) vem sendo desenvolvidas para medir precisamente as quantidades iniciais de seqüências alvo. Nela são combinados os tempos de amplificação e detecção numa mesma fase e pode ser utilizada para detectar a concentração de parasitas nos fluídos corporais (REMYINGTON; THULLIEZ; MONTOYA, 2004) tem a vantagem única de começar em um sistema de tubo fechado, o qual pode significativamente reduzir contaminação ambiental. Usando esta técnica, pode-se facilmente monitorar e quantificar precisamente o acúmulo de produtos de PCR durante a fase log da amplificação. É importante por ser rápida, sensível e quantifica os *T. gondii* em amostras clínicas, porém ainda é considerada de alto custo e não podendo ser utilizado rotineiramente e ainda maiores estudos sobre estas técnicas em pacientes com toxoplasmose cerebral devem ser realizados (KOMPALIC-CRISTO et al, 2004).

Com o intuito de cada vez mais aumentar a sensibilidade de detecção do DNA alvo, as técnicas de PCRs sofreram algumas adaptações, como por exemplo, a Nested-PCR convencional, onde utiliza-se dupla amplificação na mesma reação e

têm sido utilizadas para detecção de diversos patógenos. Neste sistema de PCR o ensaio se realiza em duas etapas consecutivas (duas PCRs simples). Na primeira etapa, uma sequência maior de DNA alvo é amplificada com um par de primers externos. Uma alíquota, do produto é então submetida à segunda etapa, para amplificação de uma sequência interna do DNA alvo, usando-se um par de primers interno. Assim, ao final desta última etapa tem-se a sequência-alvo amplificada (MELO et al, 2006). A Nested-PCR é considerada a técnica de PCR que garante uma maior especificidade, sensibilidade e confiabilidade, pois se um locus for amplificado erroneamente na primeira reação pouco provável que ele será amplificado novamente na segunda reação. E devido a sua alta sensibilidade ela se torna imprescindível para a detecção de alvos com amostras que apresente escassez de DNA (por exemplo, em amostras clínicas, de solo, de água e alimentos) (DUPIN et al. 2002, MELO et al, 2006).

Porém mesmo existindo diversos sistemas de PCR a sua sensibilidade vão depender do número de cópias do gene amplificado, sequências repetidas no genoma de *T. gondii* que pode servir como alvo na PCR. A sensibilidade e especificidade dos métodos baseados em PCR dependem também de técnica adequada para o isolamento do material genético a partir das amostras, das características da sequência do DNA escolhido para a amplificação, e dos parâmetros da própria reação de amplificação.

O diagnóstico dos pacientes imunodeprimidos constitui uma categoria diferente. O diagnóstico é apoiado principalmente pela clínica, ensaios e tomografia computadorizada ou ressonância magnética, que muitas vezes não conseguem distinguir entre outras doenças cerebrais em pacientes com aids (BASTIEN, 2002).

Os sintomas da TC podem ser confundidos por outras infecções oportunistas que comumente infectam estes pacientes. Portanto o diagnóstico não pode ser baseado somente em observações clínicas (MONTROYA e LIESENFELD, 2004). O diagnóstico diferencial de TC incluem linfomas primários do SNC, encefalite por citomegalovírus, abscessos e outras doenças granulomatosas como a tuberculose, sífilis, infecção por *Cryptococcus*, histoplasmose, cisticercose e doença de Chagas (MONTROYA; LIESENFELD, 2008; VERMA; BERGER, 2012).

Com a introdução da TARV houve uma redução nas infecções oportunistas e consequentemente diminuíram os casos de infecções no sistema nervoso em pacientes com aids. No entanto quando acometido, o diagnóstico laboratorial nesses indivíduos, onde a morbidade e mortalidade são importantes, deve ser realizado por métodos sensíveis, pouco invasivos e rápidos, com isso a PCR torna-se importante, pois detecta a presença de *T. gondii* (COLOMBO, 2005). Testes imunológicos podem ser utilizados para precisão do diagnóstico, porém, biópsia dos gânglios e exame histopatológico demonstra a presença do parasita isolado e até em replicação, porém não são realizados procedimentos invasivos nestes indivíduos com TC para não piorar o prognóstico.

Clinicamente a TC apresenta-se com múltiplos sinais e sintomas e uma delas é a meningoencefalite, assim observam-se sinais de irritação meníngea, confusão mental, convulsões focais ou generalizadas e coma. Assim, o exame do LCR é fundamental e pode verificar pleocitose de predomínio linfomononuclear, com discreta a moderada elevação da proteinorraquia, glicose normal ou hipoglicorraquia, com elevação da produção local de anticorpos contra *T. gondii* (CYPEL, 2014; OLIVEIRA et al, 2016).

O diagnóstico definitivo da encefalite por *T. gondii* é realizado por demonstração direta do taquizoíto no tecido cerebral com fragmentos obtidos em biópsia e necrópsia, porém, devido à dificuldade para executar tais exames, na maioria das vezes na prática clínica, o diagnóstico é presuntivo analisando os achados clínicos, radiológicos, sorológicos e até moleculares. A confirmação é feita mediante a resposta ao tratamento específico para o parasita após 14 dias de tratamento (WALKER; ZUNT, 2005; HOFFMANN, 2006; KAPLAN et al, 2009).

O diagnóstico presuntivo é realizado segundo os critérios estabelecidos pelo “Centers for Disease Control” (CDC, 1993) baseia-se na presença de: (I) sinais neurológicos focais, alterações do nível ou do conteúdo da consciência, evidência de imagem tomográfica de lesão expansiva, com ou sem realce da substância de contraste, (II) presença de anticorpos IgG anti-*T. gondii* e (III) resposta ao tratamento específico anti-*T. gondii*. Na prática de clínica médica o tratamento é usualmente iniciado quando é determinado o diagnóstico presuntivo baseado em achados clínicos e radiológicos (OLIVEIRA et al, 2016).

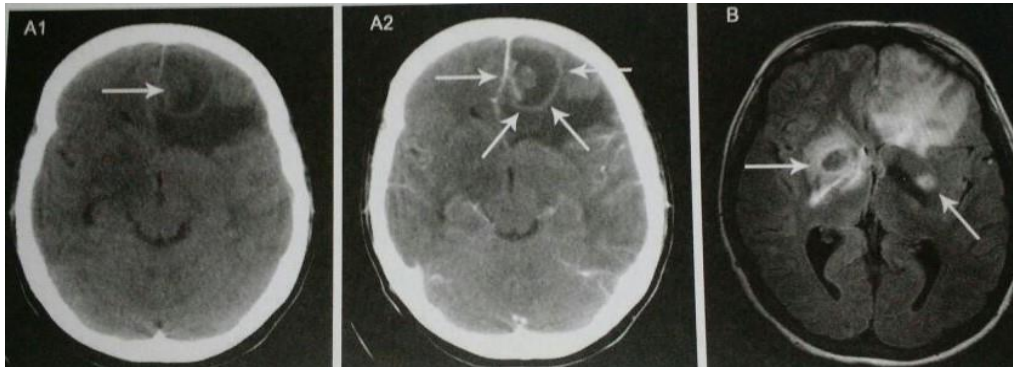
Entre os testes biológicos, a sorologia é frequentemente ambígua e não útil – devido ao alto valor preditivo dos níveis de IgG anti- *T. gondii* (BASTIEN, 2002). Em infecção aguda a avaliação sorológica se dá pela pesquisa do anticorpo IgM, pois caracteriza infecção aguda e em indivíduos sem sorologia prévia pode realizar o teste de avididade de IgG para estimar o tempo de infecção. Se a suspeita for de reativação da doença pesquisa-se também o IgG, porém em até 5% dos pacientes com TC estes anticorpos podem não ser detectáveis mas esta sorologia negativa não pode excluir o diagnóstico ou retardar a administração terapêutica (PEREIRA-CHIOCCOLA; VIDAL; SU, 2009; KAPLAN et al, 2009). Outros testes imunológicos podem detectar os valores séricos de antígenos de *T. gondii* no LCR e sugerindo a reativação da doença, porém com sensibilidade e especificidade variável e pouco utilizado na prática clínica (AVELINO-SILVA; KALLÀS, 2014).

O sistema mais utilizado devido a sua elevada sensibilidade e especificidade é o da sequência dos primers B22 e B23 que amplificam uma região do gene B1, porém no LCR a sensibilidade pode variar de 11,5 a 100%. Já na PCR sanguínea a PCR possui uma sensibilidade maior (de 16 a 86%), mas deve existir uma suspeita clínica (COLOMBO et al, 2005; PEREIRA-CHIOCCOLA; VIDAL; SU et al, 2009).

Os exames radiológicos mostram alterações significativas, na maioria das vezes sugerindo TC. São realizados os seguintes exames de imagens: tomografia computadorizada sem contraste e/ou com contraste e ressonância magnética (RNM). Ambas podem ser utilizadas na investigação de quadros sugestivos de TC, mas a RNM possui uma maior sensibilidade para identificação de lesões pequenas. As lesões típicas de TC são heterogêneas, com margens bem delimitadas, hipoatenuantes, associadas a edema perilesional e hiperintensas sugerindo TC. Na tomografia são observadas lesões múltiplas cerebrais nos limites corticomedulares e nos gânglios da base. O contraste determina o realce anelar nesses locais determinando uma resposta inflamatória e necrose. Lesões atípicas e sem realce por contraste pode ser observada em 20% dos casos. A ressonância magnética é realizada quando a tomografia gera dúvidas de diagnóstico por ser um exame radiológico de maior custo, porém ela fornece informações mais precisa, permitindo visualizar lesões que podem passar despercebidas pela tomografia, tornando evidentes as imagens anelares das lesões neurológicas da toxoplasmose

(MONTROYA, 2002; PEREIRA-CHIOCCOLA; VIDAL; SU, 2009; KAPLAN et al, 2009; CYPEL, 2014, OLIVEIRA et al, 2016) (Figura 7, 8 e 9).

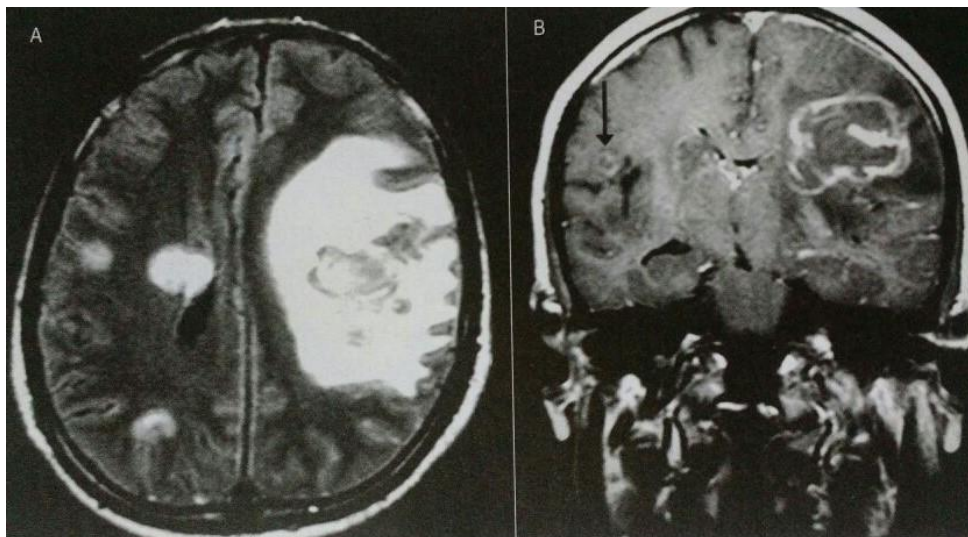
Figura 6: Tomografia computadorizada (A1 e A2) e ressonância magnética (B) em pacientes com aids e encefalite por *T. gondii*.



Legenda: A1- Fase pré-contraste da tomografia computadorizada. A2- Fase pós-contraste da tomografia computadorizada. Em ambas, nota-se a lesão frontal hipoatenuada (seta), com realce anelar após a injeção de contraste intravenoso (setas), além de edema hipoatenuante perlesional e efeito de massa, com desvio da linha média. Na ressonância magnética nota-se edema e presença de outras lesões, inclusive acometendo o hemisfério contralateral (setas).

Fonte: Avelino-Silva e Kallás. 2014.

Figura 7: Tomografia de TCI: lesões anelares após o uso de contraste.



Legenda: A- Múltiplas lesões de realce anelar distribuídas em córtex e junção córtex-substância branca de ambos os hemisférios cerebrais e em núcleos da base à direita com de edema circunjacente. B- pequena contrastação nodular excêntrica à lesão (seta).

Fonte: Cypel, 2014

Figura 8: Tomografia de TC em pacientes com aids com múltiplas lesões com realce anelar e sinal de 'alvo excêntrico'.



Fonte: Cypel, 2014

Já que nem os sinais e sintomas e nem as características radiológicas são específicos da encefalite por *T. gondii*, deve-se ser levados em consideração à realização de um diagnóstico diferencial, considerando a condição imune e a situação epidemiológica do hospedeiro. Existe uma contestação de diagnóstico diferencial, onde nos países desenvolvidos o linfoma do SNC é o principal diagnóstico diferencial encontrado desta patogenia e nos países em desenvolvimento devem admitir como diagnóstico diferencial as formas de neurotuberculose, doença de chagas, criptococose e aspergilose (PEREIRA-CHIOCCOLA; VIDAL; SU, 2009). Porém, em pacientes com aids e TC, os linfócitos T CD4⁺ ficam abaixo de 100/mm³, enquanto que no linfoma e neurotuberculose os linfócitos TCD4⁺ são encontrados abaixo de 50/mm³ (KAPLAN et al, 2009). Outros diagnósticos que devem ser levados em consideração como abscessos bacterianos, tumores primários e metastáticos e doenças vasculares (PEREIRA-CHIOCCOLA; VIDAL; SU, 2009).

Na maioria das vezes o quadro clínico-neurológico dos pacientes com TC apresenta uma dificuldade no diagnóstico diferencial já que as manifestações neurológicas são compatíveis com outros achados clínicos neurológicos, como cefaleia e vômitos e mesmo os exames de imagens podem muitas vezes confundir

com neoplasias intracranianas já que as lesões também apresentam aspecto de massa, com isto, é fundamental técnicas adicionais nos exames de imagens que distingam alterações do tipo inflamatório ou neoplásico (CYPEL, 2014).

2.10 GENOMA DO *T. GONDII*

Para caracterização genotípica do *T. gondii* é necessário o estudo do seu genoma, a qual é nuclear e organelar altamente conservado comparado com outros protozoários apicomplexos. O DNA do seu núcleo possui 65 Mb, o mitocondrial 6kb e o do apicoplasto 35 kb (SIBLEY; AJIOKA, 2008). Ele possui 14 cromossomos definidos por algarismo romanos e que variam em seu tamanho, sendo muito mais rico em íntrons. Porém os genes para os antígenos de superfície, micronemas, rôptrias e grânulos densos (suas organelas citoplasmáticas) possuem menos íntrons do que os genes constitutivos. Experimentos realizados *in vivo*, *in vitro* e *ex vivo* confirmaram a presença de um fenótipo variável de *T. gondii* relacionados ao parasita e hospedeiro (FERREIRA; VITOR, 2014).

Para o estudo gênico dos microorganismos várias metodologias já foram utilizadas como a variação antigênica por *Western blot*, os polimorfismo genéticos por proteínas de choque térmico (HSPs), amplificação aleatória do DNA polimórfico – reação em cadeia de polimerase (Rapid-PCR) e análise de microssatélites. Porém, hoje a principal técnica utilizada para identificação genotípica em cepas de *T. gondii* é o polimorfismo por tamanho de fragmentos de restrição – reação em cadeia de polimerase (RFLP-PCR), a qual detecta variações mínimas em um gene onde uma única substituição de bases pode criar ou extinguir um sítio capaz de ser digerido por enzimas de restrição, revelando perfis de DNA com pesos moleculares diferentes (AJZEMBERG, et al, 2010; FERREIRA; NETO, 2014). Vários estudos utilizando diversos marcadores já foram utilizados para caracterização de *T. gondii* por RFLP-PCR (HOWE et al., 1997; FAZAELI et al., 2000; FUENTES et al., 2001; KHAN et al., 2005b; PENA et al. 2006; FERREIRA et al. 2006; SU et al., 2006; DUBEY et al., 2007).

Alta sensibilidade será alcançada se as sequência-alvos escolhidas forem repetitiva e específica da espécie (KOMPALIC-CRISTO et al, 2005). Na literatura há

dezenas de sequências-alvos do gene de *T. gondii* já descritas como o B1, AF146527 (fragmento de 529 pb), P30 (BURG et al, 1989; HOMAN et al, 2000; JONES et al, 2000; MONTOYA, 2002; REMINGTON et al, 2006; OKAY et al, 2009; MENOTTI et al, 2010) entre outros. Estes alvos são utilizados principalmente em ensaios de PCR em tempo real. Porém, várias outras sequências de cópia única têm sido utilizados como alvos de PCR em laboratórios de pesquisa incluindo os genes SAGs (SAG1, SAG2, SAG3, SAG4) e GRAs (GRA4, GRA6), e outros (KHAN et al, 2005a; FERRERIA, et al, 2006, 2008, 2011, BASTOS SILVA, et al, 2016).

O primeiro marcador gênico a ser testado e o mais utilizado é o B1 (localizado no cromossomo IX), dos quais existem 35 cópias no genoma em um tamanho de 2,2kb, com uma sensibilidade altíssima por conseguir detectar apenas um único parasito junto a 100 mil células humanas, mostrando assim também ser muito específico, além de possuir esta região conservada em todas as cepas testadas. A função deste gene ainda não é conhecida, mas a sua elevada especificidade e sensibilidade já estão bem estabelecidas (BOOTHROYD et al, 1987; BURG et al, 1988; 1989, GRIGG; BOOTHROYD, 2001; BUCHBINDER et al., 2003; CHABBERT et al., 2004; KHAN et al., 2005a COLOMBO et al, 2005; FERREIRA et al, 2008; OKAY et al, 2009; FERREIRA et al, 2011; MENOTTI et al., 2010; BASTOS DA SILVA et al, 2016). Estudos avaliando a sensibilidade e especificidade do gene B1 no líquido amniótico foram de 100%, contrastando com a inoculação de sangue fetal em camundongos e culturas, assim, a PCR revolucionou o diagnóstico pré-natal de toxoplasmose congênita já que limita o uso de métodos invasivos no feto (MONTOYA; LIESINFELD, 2004).

Porém outros estudos relataram melhor desempenho da PCR usando gene AF146527 (fragmento de 529 pb), o qual é repetido de 200 a 300 vezes (HOMAN et al, 2000; MONTOYA, 2002; MENOTTI et al, 2010; STERKERS, et al; 2010). Uma comparação dos métodos usando o B1 e sequências de 529 pb em PCR em tempo real revelou uma melhoria de dez vezes na sensibilidade quando a sequência de 529 pb foi utilizado. Sob condições específicas, o limite de detecção para DNA genômico de *T. gondii* foi de 200 fg para o gene B1, em comparação com 20 fg para a sequência de 529 pb. O mesmo estudo também investigou a especificidade obtida

através da detecção da sequência de 529 pb em amostras clínicas (KOMPALIC-CRISTO et al, 2005).

Outro alvo muito utilizado em PCR é o gene P30 que é um antígeno de superfície do parasita, mas que é representado por cópia única e por isso menos sensível, mas mesmo assim diferentes pares de primers foram propostos para esse gene (BUCHBINDER; BLATZ; RODLOFF, 2002; BUCHBINDER et al., 2003).

Outros genes também utilizados como marcadores são os SAGs (SAG1, SAG2, SAG3) que são proteínas ligantes que facilitam a adesão do parasita à célula hospedeira. SAG1 (localizado no cromossomo VIII), que codifica a proteína P30 (principal antígeno de superfície do protozoário e encontrado nos taquizoítos) e se encontra representado como uma cópia única (Khan et al., 2005a) e participam ativamente da invasão celular, porém as cepas com deficiência nessa proteína apresentam outros mecanismos de adesão independente da SAG-1. Gene SAG2 (localizado no cromossomo VIII), que codifica a proteína p22 expressada tanto por taquizoítos quanto por bradizoítos (HOWE et al., 1997; LEKUTIS et al., 2000; KHAN et al., 2005a) e gene SAG3 (localizado no cromossomo XII) que codifica proteínas expressas somente em taquizoítos, sendo a principal a p43 (GRIGG et al., 2001b; KHAN et al., 2005a).

MIC são proteínas envolvidas na motilidade por deslizamento e que já existem várias proteínas de micronemas descritos na literatura; ROPs são proteínas com atividades enzimáticas encontradas nas róprias. Elas são liberadas durante a invasão e ajuda na formação do vacúolo parasitóforo e os GRAs (GRA4, GRA6) são proteínas dos grânulos densos encontradas nos vacúolos parasitóforos e assim, ajuda na formação de uma rede intravacuolar que permite a interação do parasita com a célula hospedeira entre outros (FERREIRA; VITOR, 2014), como o gene GRA6 (localizado no cromossomo X) que codifica uma proteína onde estudos sugerem que possa estar envolvida no recrutamento de nutrientes, permitindo a multiplicação do parasita e sua sobrevivência dentro da célula (KHAN et al., 2005a; KHAN et al., 2005b). E ainda outros estudos já foram realizados utilizando o gene BTUB localizado no cromossomo IX (KHAN et al., 2005a; KHAN et al., 2005b).

Para se avaliar a sensibilidade e especificidade da PCR é necessário além da sequência-alvo no DNA do parasita como já descrito, o desenho dos pares de

primers para amplificação. Porém, a sensibilidade só será alcançada se existir parasitemia, assim, nos casos de TC e pulmonar, a PCR só será útil se apenas houver disseminação ou passagem do parasito para o sangue e líquido, assim como ocorre na fase aguda da infecção (KOMPALIC-CRISTO et al, 2005).

Então, variações na sensibilidade da PCR convencional podem ocorrer em função também da baixa parasitemia principalmente no LCR, onde a sensibilidade varia de 11.5 a 100%, mas a especificidade normalmente é alta (96-100%)(PRIYA et al., 2002). No sangue a sensibilidade pode variar de 25 a 77% (JOSEPH et al., 2002). A terapia específica anti-*Toxoplasma* também pode interferir na sensibilidade do método, portanto as amostras devem ser colhidas preferencialmente até a primeira semana de tratamento (VIDAL et al., 2004). Outros fatores que podem afetar a sensibilidade são as condições de transporte e armazenamentos das amostras e formas de extração de DNA (VIDAL et al., 2004; MONTOYA e LIESENFELD, 2004).

Embora na literatura existam diversos protocolos que diferem tanto na concentração de reagentes, quanto de ciclagens e até do processo de revelação do produto amplificado, os resultados obtidos devem ser comparados com muito cuidado.

A variedade de metodologias utilizadas nos protocolos de PCRs existentes é explicada, em parte, pelo fato de que grandes empresas têm demonstrado interesse em produzir kits de teste para serem disponíveis comercialmente, devido ao fato de que grande parte dos laboratórios trabalhar com os protocolos 'in house' (KOMPALIC-CRISTO et al, 2005).

Um estudo realizado em 2009 com 25 laboratórios da França que realizavam PCR para identificação de *T. gondii* verificaram 35 protocolos diferentes quanto a uma ou mais características e que nove desses laboratórios usavam dois a três protocolos distintos. Com isto podemos rematar que é preciso mais metodologias aplicadas sejam validadas para ser empregados em materiais biológicos distintos para validação do teste.

A ausência de um método padrão aceito significa que a sensibilidade e especificidade de testes moleculares não podem ser comparadas, em geral com os

métodos convencionais (como, testes sorológicos e culturas de células e animais). Apenas comparações entre os protocolos particulares são possível.

2.11 ESTUDOS DAS CEPAS

A caracterização genotípica de *T. gondii* tem sido feito por métodos moleculares, como RFLP-PCR, em diversas amostras como em humanos, aves, cães, porcos e gatos (VALLOCHI et al., 2005; GALLEGO et al., 2006; BELFORT-NETO et al., 2007). Análises isoenzimáticas e genéticas mostraram que as cepas de *T. gondii* estão agrupadas em três linhagens clonais designadas tipo I, II e III (HOWE et al., 1997; TIBAYRENC e AYALA, 2002).

Estas diferentes linhagens de *T. gondii* apresentam também diferentes graus de virulência (HOWE e SIBLEY, 1995), onde entre murinos a virulência da cepa já está bem estudada e são divididos em cepas virulentas, não virulentas e de virulência intermediária dependendo da sua morbidade e mortalidade nos camundongos infectados pelos taquizoítos. Foi verificado que as cepas RH e suas semelhantes possuem uma dose letal de 100% (DL_{100}) mesmo com um único parasita viável e possuem uma taxa de crescimento superior em relação às outras e uma capacidade de ultrapassar barreiras também maiores, causando uma maior disseminação no hospedeiro, enquanto que a ME49 possui $DL_{100} > 10^3$ taquizoítos e encontrados mais nas infecções crônicas, por isso chamada de não virulentas. As cepas de virulência intermediárias possuem fenótipos variados e $DL_{100} > 10$ taquizoítos (AJIOKA et al., 2001; FERREIRA; VITOR, 2014).

Quando estudadas em relação à resposta inflamatória em camundongos, foi visto que as cepas avirulentas são mais dominadas pela imunidade do hospedeiro e as virulentas induzem um controle imune inadequado ou têm a capacidade destrutiva dos tecidos induzidas pelas proteínas inflamatórias (MORDUE et al; 2001). Saeij e colaboradores (2006) mapearam geneticamente a proteína ROP18 e verificaram maior expressão dessa proteína em cepas virulentas e após transferir este alelo de uma cepa virulenta para uma não virulenta percebeu-se o aumento significativamente da taxa de mortalidade nos camundongos.

Cepas recombinantes podem ser encontradas se um felídeo se contaminar ao mesmo tempo por duas cepas e isso aconteceria se ele se alimentasse de uma presa que albergasse uma infecção mista ou se ingerisse duas presas (em intervalo de tempo pequeno) cada uma com uma cepa diferente e o cruzamento entre elas ocorresse. Já que foi visto que infecções de genótipos mistos foram identificadas tanto na natureza quanto *in vitro* e que também existam cepas híbridas em populações naturais, propõe-se que a recombinação conduziria a diversidade de cepas deste parasita (FERREIRA;VITOR, 2014). As cepas recombinantes e genótipos atípicos ou polimórficos já foram observados principalmente na América do Sul (GRIGG et al., 2001b; KHAN et al.; SU et al.; FERREIRA et al., 2006; DUBEY et al., 2007, Khan et al, 2011).

A utilização de múltiplos marcadores na RFLP-PCR consegue distinguir as três linhagens clonais na maioria dos isolados de *T. gondii* de origem humana e animal de diferentes partes do mundo (HOWE; SIBLEY, 1995; AJZENBERG et al., 2002; SU et al., 2006). Um estudo realizado por Howe e Sibley (1995) analisou 106 amostras de *Toxoplasma* obtidas de várias espécies de animais e humanas com o objetivo de identificar a estrutura populacional deste parasito avaliou a correlação do genótipo do *T. gondii* com a toxoplasmose nos humanos e animais. Eles utilizaram seis marcadores gênicos (SAG-1, SAG-2, ROP1, 850, L328 e 62) e verificaram que ele possuía uma estrutura altamente clonal constituída por três linhagens caracterizada como tipo I a virulenta e tipo II e III como avirulenta e houve uma predominância de tipo II associadas à toxoplasmose humana e tipo III em animais.

Já em 1997 eles desenvolveram um sistema de tipagem de RFLP-PCR do marcador genômico SAG-2 que permitia a identificação dos três genótipos, após este estudo novas pesquisas foram desenvolvidas principalmente na América do Norte e Europa, mas também na Ásia e África realizados em cepas isoladas de animais domésticos (ovelhas e porcos) e humanos para identificação genotípica de *T. gondii* e sua associação com a toxoplasmose humana e mostraram que a maioria das cepas nestas regiões é do tipo II (AJZENBERG et al., 2002; LINDSTRON et al; PEYRON et al; ZAKIMI et al., 2006). Porém, esta correspondência entre a virulência e o padrão molecular da amostra não necessariamente deve ser observada em todos os hospedeiros (GRIGG e SUZUKI, 2003).

Estudos recentes mostraram que a distribuição das cepas na América do Sul é notadamente diferente, sendo mais virulentas atípicas ou tipo I ou III (FERREIRA et al., 2008, 2011; BASTOS SILVA et al, 2016). A comparação de genótipos de cepas de *T.gondii* associados com infecção humana mostrou uma frequência de cepas tipo I em pacientes com toxoplasmose/aids e toxoplasmose ocular (VALLOCHI et al., 2005; KHAN et al 2006; GALLEG0 et al., 2006). Inversamente, outros estudos, analisando amostras na América do Norte e Europa mostraram que as cepas do tipo II foram mais prevalentes na toxoplasmose/aids e em infecções congênitas (AJZENBERG et al. 2002; BOOTHOROYD e GRIGG, 2002; NOWAKOWSKA et al., 2006). A maioria dos estudos de análise genotípica realizada no Brasil em cepas isoladas de animais apresenta predominância de cepas do tipo I e III (DUBEY et al., 2002; DUBEY et al., 2003; DA SILVA et al.; SANTOS et al., 2005; PENA et al., 2006).

A utilização de apenas um ou dois locos para genotipar *T. gondii* pode apresentar algumas limitações, uma vez que impossibilita a identificação de genótipos recombinantes (atípicos), com isto, faz-se necessário a utilização de múltiplos locos para identificação genotípica de *T. gondii*. No Brasil, Ferreira e colaboradores em 2006 caracterizaram as cepas do *Toxoplasma* por RFLP-PCR utilizando oito marcadores gênicos (SAG-1, SAG-2, SAG-3, B1, cB21-4, cS10-A6, GRA6 e L363) observaram que todas eram recombinantes, o que ainda não foi registrado em outro local do mundo. Tais fatos foram confirmados posteriormente por Ferreira e colaboradores em 2008 e 2011 em São Paulo e por Erechim no Rio Grande do Sul.

Pena e colaboradores em 2007 analisaram a variabilidade genética de 125 isolados de *T. gondii* de galinhas, cães e gatos (do Pará, Rio Grande do Sul, Paraná e São Paulo) utilizando dez marcadores por RFLP-PCR (SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1 e Apico), eles identificaram 48 genótipos, além de genótipos clonais e uma diversidade genética maior aqui do que quando comparados com países da América do Norte e Europa. Os genótipos clonais foram designados como BrI, BrII, BrIII e BrIV e correlacionando-os com a mortalidade em camundongos foi visto que os isolados BrI são altamente virulentos, BrIII não são virulentos, BrII e BrIV são de virulência intermediária (PENA et al, 2008).

Em 2009, Dubey e Su evidenciaram a presença de cepas clonais na América do Norte e Europa e a variabilidade genética intraespecífica no Brasil e determinaram ainda que aqui no Brasil existe uma ausência de cepas tipo II e que tipos I são raros e que a maioria dos isolados daqui não é clonal e que possui uma recombinação e transmissão por oocistos.

Ao estudar as análises filogenéticas moleculares e fenotípicas do *T. gondii*, Khan e colaboradores (2007) concluíram que a população do parasita na América do Norte e do Sul divergia de um ancestral comum, o cromossomo 1a, com isto foi tornando a população encontrada na América do Sul cada vez mais clonal.

O sequenciamento do genoma tem possibilitado a avaliação dos fatores genéticos associados à virulência e análise populacional e tais sequências genômicas ME49, GT1, VEG e RH do *Toxoplasma* e outras de sequências transcritas de várias cepas podem ser encontradas no *Toxoplasma* Genome Resource Database – ToxoDB (<<http://ToxoDB.org>>) para futuras pesquisas (FERREIRA; VITOR, 2014).

Com base nesses dados, o conhecimento da estrutura populacional de *T. gondii* é importante para a clínica médica uma vez que possa correlacionar a severidade da doença com o genótipo do parasita definindo o prognóstico do paciente levando as condutas terapêuticas mais adequadas. Até a presente data, alguns estudos analisaram a identificação genética de TC, porém com um número de amostras reduzido, portanto pouco se conhece sobre a prevalência dos diferentes tipos de cepa na infecção humana no Brasil, principalmente em Pernambuco.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL:

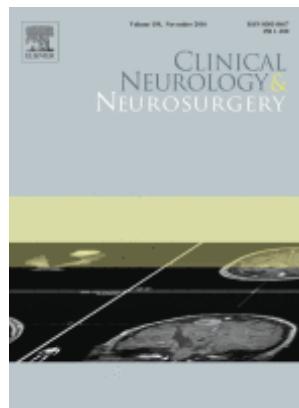
Aplicar os sistemas baseados em PCR para identificação de cepas em pacientes com toxoplasmose cerebral e aids.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Descrever as características clínicas, laboratoriais, imunológicas e terapêuticas dos PVHA/TC.
- Comparar o desempenho dos testes sorológicos, moleculares e o padrão ouro do estudo (exames de imagens) em PVHA/TC.
- Identificar as diferentes cepas do *T. gondii* diagnosticadas através da técnica de PCR-RFLP em TC/ PVHA com as lesões cerebrais;
- Sequenciar as cepas polimórficas/mistas encontradas em PVHA/TC.

4 CEREBRAL TOXOPLASMOSIS IN PATIENTS WITH ACQUIRED IMMUNE DEFICIENCY SYNDROME IN THE NEUROLOGICAL EMERGENCY DEPARTMENT OF A TERTIARY HOSPITAL

O capítulo I consiste do artigo publicado no periódico Clinica Neurology and Neurosurgery.



Fator de impacto: 1.198

Received date: 8-7-2015 Revised date: 9-8-2016 Accepted date: 14-8-2016

CEREBRAL TOXOPLASMOSIS IN AIDS PATIENTS IN NEUROLOGICAL EMERGENCY DEPARTMENT OF A TERTIARY HOSPITAL

RUNNING HEADLINE:

Cerebral Toxoplasmosis in AIDS Patients

AUTHORS:

Gabriela Brito de Oliveira^{1,2}, Maria Almerice Lopes da Silva¹, Leandro Batista Wanderley¹, Carolina da Cunha Correia³, Eduardo Caetano Brandão Ferreira¹, Zulma Maria de Medeiros¹, José Luiz Lima Filho², Fábio Lopes de Melo¹, Paulo Sérgio Ramos de Araújo¹, Alfredo Henrique Cecílio Marins Santos¹.

¹Laboratório de Doenças Transmissíveis, Departamento de Parasitologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Recife, PE, Brasil, 50670-420. Phone: (81)21012695. E-mails: gabibrito@hotmail.com, almerice@cpqam.fiocruz.br, leandrowanderley@gmail.com, brandaoec@gmail.com, medeiros@cpqam.fiocruz.br, fabio@cpqam.fiocruz.br, psergiora@gmail.com, alfredohcms@hotmail.com.

²Laboratório de Imunopatologia Keizo Amasi, Av. Prof. Moraes Rego, 1235 – Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50670-901 | Fone PABX: (81) 2126.8000. Email: joseluiz60@gmail.com.

³Department of Neurology, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Pernambuco Rua Arnóbio Marques, 310 – Santo Amaro, Recife/PE CEP: 50100-130. E-mail: carolina.dra@gmail.com.

ABSTRACT:

Introduction: Cerebral toxoplasmosis is the most common cause of space occupying brain lesion in patients with HIV/AIDS in Brazil. In the post-HAART era, it is responsible for high rates of morbidity and mortality worldwide. Materials and

Methods: This study consists of a case series of 56 patients diagnosed with cerebral toxoplasmosis whose clinical features, brain imaging and cerebrospinal fluid aspects were analyzed. **Results:** Cerebral toxoplasmosis led to the diagnosis of infection by the human immunodeficiency virus (HIV) in 27 (48.2%) of the patients, while 29 (51.2%) others already knew to be HIV seropositive. However, at the time of diagnosis of cerebral toxoplasmosis, only 9 (16.6%) reported being under antiretroviral therapy and 5 (8.9%) were receiving primary prophylaxis for toxoplasmosis. Headache, strength deficit and fever were the most frequent signs and symptoms throughout the study. Fifty-three patients showed changes consistent with toxoplasmosis in CT or MRI. Thirty-four (60.7%) CSF samples were positive in the indirect haemagglutination test and for the reaction of *Toxoplasma gondii* IgG ELISA, while 31 (55.4%) were positive in the direct haemagglutination test. Fifty (89.3%) patients underwent first-line treatment for toxoplasmosis. **Conclusion:** Cerebral toxoplasmosis is still a very relevant neurological disease in individuals with AIDS admitted to neurology emergency departments. Early diagnosis and initiation of empiric treatment and antiretroviral therapy are important for good prognosis.

KEY WORDS: Cerebral toxoplasmosis, HIV, Acquired Immunodeficiency Syndrome

4.1. INTRODUCTION:

Cerebral toxoplasmosis is one of the most common causes of central nervous system (CNS) infection and a frequent cause of space occupying brain lesion in patients with acquired immune deficiency syndrome (AIDS) in Brazil; it is typically the result of reactivation of chronic *Toxoplasma gondii* infection due to changes in cellular immunity.(1, 2) Cerebral toxoplasmosis is currently the third most prevalent AIDS-defining illness in Brazil, after tuberculosis and *Pneumocystis jirovecii* pneumonia.(2) An estimated 30% to 50% of HIV seropositive individuals infected with *T. gondii* develop cerebral toxoplasmosis, which also has a high mortality.(3,4).

Introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART) resulted in significant worldwide reduction in morbidity and mortality of individuals living with human immunodeficiency virus (HIV)/AIDS.(5) The incidence of opportunistic CNS infections has also declined compared to levels in the pre-HAART era.(6). However, cerebral toxoplasmosis persists in some geographic regions, such as Brazil, with delayed diagnosis of protozoan infections and difficulty in accessing specialized treatments.(7).

The definitive diagnosis of cerebral toxoplasmosis requires histological or cytological examination of affected tissues or fluids (i.e., brain biopsy). Therefore, most physicians treat it presumptively based on a focal neurological clinical syndrome history compatible with intracranial lesions, reduced level of consciousness accompanied by brain images showing mass effect (ring enhancement on magnetic resonance imaging [MRI] or computed tomography [CT] with or without injection of contrast media), and serological findings.(8)

In this study, we report a series of patients with AIDS and cerebral toxoplasmosis treated in a neurology emergency room. Most of the cases of cerebral toxoplasmosis occurred in individuals who knew they were seropositive for HIV.

4.2. MATERIALS AND METHODS:

This study was conducted in the neurology emergency department at the Hospital da Restauração Governador Paulo Guerra, the largest tertiary healthcare center in the state of Pernambuco, with more than 704 beds, and a reference hospital for emergency cases.

A prospective cross-sectional study was conducted between December 2013 and January 2015. The sample included individuals positive for HIV who were admitted to the neurological emergency department with cerebral toxoplasmosis.

The data used for analysis were medical records from the inpatient unit of the emergency department, which included biological, demographic, clinical,

radiological, and laboratory data. Neuroimaging (CT and MRI) results were examined for brain lesions, topography, perilesional edema, and midline deviation.

Cerebrospinal fluid (CSF) was examined to determine white blood cell count; levels of proteins, chloride, and glucose; and immune response to *T. gondii* (enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) measuring immunoglobulin G and M [IgG, IgM] levels, and hemagglutination tests); *Treponema* spp (Venereal Disease Research Lab [VDRL]) and HIV (ELISA) were also measured, along with testing for *Cryptococcus neoformans* (India ink and Crypto-la test).

Variables were presented as relative values; continuous variables were expressed as minimum, maximum, and arithmetic mean values.

4.3. ETHICS:

The institutional review boards of the Ethics Committees of the Hospital da Restauração Governador Paulo Guerra and the Fundação Oswaldo Cruz approved this study. All patients gave informed written consent.

4.4. RESULTS:

A total of 56 patients were enrolled during the 14-months study period, including 29 (51.8%) men. Their mean age was 39.1 years (23–61 years), and the majority, 46 (82.1%), lived in the Recife metropolitan region. Twenty-seven (48.2%) patients were diagnosed with AIDS at the time of admission to the emergency room, while 20 (35.7%) reported having known their HIV infection status for more than 2 years, and 9 (16.1%) for a period shorter than that.

Among the major signs and symptoms reported in the emergency room, most had headache (58.9%) and strength deficit (57.1%) in addition to fever (33.9%), one or more seizures (37.5%), and were confused (26.8%). Decreased level of consciousness occurred in 15 (26.8%) individuals, with Glasgow coma scale scores ranging from 10 to 14 points. Among patients with strength deficit, the upper limbs were the most commonly affected site, predominantly left limbs (Table 1).

CSF analysis revealed average white blood cell counts of 16.1 cells/mm³ (0–159 cells/mm³), total protein levels of 122.0 mg/dL (33.0–1,436.0 mg/dL), chloride levels of 693.9 mg/dL (631.0–750.0 mg/dL), and glucose levels of 56.8 mg/dL (29.0–84.0 mg/dL). Positive toxoplasmosis immunological reactions were observed in 60.7% (indirect haemagglutination test and ELISA IgG) and 55.4% (direct hemagglutination test) of patients. Twenty-eight (50%) patients had their CSF examined for the presence of immunological markers of HIV (CD4 cell and total lymphocyte counts), in addition to the serological confirmation, which applied to the 56 patients in the study, and all of these turned out positive. Markers for syphilis (VDRL) and *C. neoformans* (Crypto-LA® Test) were also searched and revealed positive in 2 (3.6%) and 1 (1.8%) cases, respectively. (Table 2).

Fifty-three (94.6%) patients underwent CT scans without contrast; of these, 22 (41.5%) and 31 (58.5%) had single and multiple lesions, respectively. Twenty-one (39.3%) patients underwent MRI, with single and multiple lesions visible in 5 (23.8%) and 16 (76.2%) of the cases, respectively. Perilesional edema and midline deviation were identified in 22 (39.3%) and 6 (10.7%) patients, respectively.

A combination of sulfadiazine and pyrimethamine was administered to 50 (89.3%) of patients in this study. Two (4%) patients switched to clindamycin due to the development of hypersensitivity. The corticosteroid dexamethasone or hydrocortisone was administered to 16 (28.6%) and 5 (8.9%) of patients, respectively, and 14 (17.9%) patients received anticonvulsants. Among cases in this study, only 9 (16.1%) reported receiving antiretroviral therapy at the time of emergency room admission.

4.5. DISCUSSION:

In the years that followed the introduction of HAART, a considerable decrease in the incidence of opportunistic infections and CNS disorders was observed worldwide. (9-11) It was not different for cerebral toxoplasmosis. The proportion of deaths associated with the disease reduced from 3.5% of all HIV related death in 1992 to 1.9% in 1998, a reduction greater than in HIV-related deaths overall. (12)

Despite this improvement in therapy, cerebral toxoplasmosis is still considered a major threat to the health of HIV-infected patients, especially in developing countries, the case of Brazil, where this study took place. In these places, the disease is responsible for a substantial proportion of mortality and morbidity (2, 13)

The sample population had a mean age of 39.1 years with more than half of the individuals being males, similar to the distribution of AIDS cases in Brazil; in this country, there are 1.7 cases in men for every woman. Because the study hospital is a reference institution for treatment of neurological emergencies in the state of Pernambuco, it is likely that most individuals with AIDS and cerebral toxoplasmosis in this region are seen at this hospital.(14)

Cerebral toxoplasmosis is typically observed in the later stages of HIV infection as a result of the reactivation of latent infection by the *T. gondii*.(1) The fact that in our study a considerable percentage of patients had their HIV infection diagnosed following presentation with cerebral toxoplasmosis could mean that their diagnosis was probably delayed, resulting in further progression of HIV infection, with higher viral load and fall in CD4 cell count. A possible explanation to this finding would be the existence of a deficiency in the local health care systems when it comes to testing populations and promoting the early diagnosis of the HIV. A better availability of resources might have influenced positively the presentation of cerebral toxoplasmosis.

All patients were diagnosed with cerebral toxoplasmosis, and they underwent therapeutic treatment based on presumptive criteria. Administration of treatment is based on presumptive diagnosis partly due to the difficulty in performing invasive procedures such as stereotactic biopsy that could delay the start of anti-toxoplasma treatment, thus worsening patient prognosis.(15,16).

Almost half of the patients had cerebral toxoplasmosis as the first manifestation of AIDS, as they had no knowledge of their HIV infection status at the time of admission to the emergency room. Of those who knew their positive infection status (29 individuals), only 9 (30%) were on HAART at that time. This reflects poor treatment adherence, which delays immune restoration and may prevent reduction of HIV viral load to non-detectable levels.(17).

A recent large cohort study showed that failure in the antiretroviral therapy and immunosuppression markers (occurrence of a first AIDS-defining event or decrease in CD4 cell count to $\leq 100 \times 10^6$ cells/L) were strong predictors of cerebral toxoplasmosis.(18) This could apply to the 9 cases in this study in which patients were reportedly receiving HAART at the time and still developed the CNS disease. On the other hand, another study (19) reported that for each 50-cell decrease in CD4-cell count, there is a 30% increase in the risk of cerebral toxoplasmosis occurrence, independent of antiretroviral exposure.

The presence of a space occupying brain lesion in an HIV-infected person is usually indicated by at least one of the following: headache, seizures, reduced level of consciousness, altered cognitive function, or focal neurologic signs and symptoms.(20)

Headache, fever, and motor deficits were the most frequently encountered clinical manifestations, similar to other studies.(7,8,21) Twenty-four patients had seizures that might have been related to disease progression or more severe cases.(2,15)

Cranial MRI is the most sensitive diagnostic study for the demonstration of an intracranial mass lesion. Nevertheless, the routine use of a contrast with MRI in patients with AIDS is not without controversy, since the limited availability of the MRI scanners as well as other considerations may get in the way of its performance. CT of the head with contrast is then a very sensitive technique for detecting these lesions. However, it has well recognized limitations.(20).

The most common MRI or CT findings were multiple lesions (66.0%), perilesional edema (39.3%), and midline deviation (10.7%). These findings are frequent in cerebral toxoplasmosis, where neuroimaging usually shows multiple ring-enhancing nodular lesions, edema, and mass effects. In a large study, only 27% and 14% of lesions were single as detected on CT and MRI, respectively. Most lesions occur in the basal ganglia and frontal and parietal lobes.(22-24) A frequent association with perilesional edema is also reported in other studies, and there is consensus on the subject.(15,25,25).

Differential diagnosis of focal neurological disease in patients with AIDS

includes mostly primary CNS lymphoma and progressive multifocal leucoencephalopathy (PML). Lymphoma cannot be distinguished on the basis of imaging studies. PML lesions, on the other hand, typically involve white matter rather than gray matter, are non-contrast enhancing, and produce no mass effect differing from the lesion causes by *T. gondii*. Other causes of focal disease in these patients are mycobacterial infection, fungal infection (e.g. cryptococcosis), Chagas disease, and pyogenic brain abscess, specially in IV drug abusers.(15)

A combination treatment of pyrimethamine and sulfadiazine, considered a first-line regimen, was used in the vast majority of cases. Two patients switched to clindamycin due to hypersensitivity. Corticosteroid therapy was used in 21 patients, typically for mass effect associated with focal lesions caused by *T. gondii*. Anticonvulsants were administered to 14 patients and was also associated with cases of mass effect.(1,2,15,27-29)

The presence of *T. gondii*-specific antibodies in the CSF of more than 50% of individuals in this study is consistent with previous study findings. This observation is likely due to antibodies passing from the blood to the CSF during the breakdown of the blood-brain barrier.(1,30,31) In cases where these antibodies are not found, diagnosis of cerebral toxoplasmosis should still be considered by empiric means, as most clinicians do before all else, by initiating anti-*T. gondii* therapy and observing the patient's radiological and clinical response.(15)

Despite the current availability of antiretroviral therapy and prophylaxis against opportunistic infections, cerebral toxoplasmosis is still a very relevant neurological disease in individuals with HIV/AIDS. Early diagnosis to exclude other conditions with similar presentation is essential even if treatment is typically presumptive. Early initiation of empiric treatment and antiretroviral therapy is equally important for good prognosis.

4.6. ACKNOWLEDGEMENTS:

We thank all of the researchers from the Department of Parasitology of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FrioCruz Pernambuco) for their support to

this project. This work was funded by a grant from National Council for Scientific and Technological Development (CNPq). We declare no conflict of interest.

The authors are responsible for the work described in this paper. All authors contributed equally to this work. All authors provided final approval of the version to be published.

SPONSORSHIP:

This work was supported by a grant from National Council for Scientific and Technological Development Brazil (CNPq).

4.7. REFERENCES:

1. Luft, BJ, Hafner R, Korzun A, et al. Toxoplasmic encephalitis in patients with the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *N Engl J Med* 1993;329:995-1000.
2. Vidal Jose E., Oliveira Augusto C. Penalva de. AIDS-related cerebral toxoplasmosis in São Paulo State, Brazil: marked improvements in the highly active antiretroviral therapy-era but the challenges continue. *Braz J Infect Dis* [Internet]. 2013 June [cited 2015 May 17] ; 17(3): 379380.
3. Skiest DJ. Focal Neurological Disease In Patients With Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Clin Infect Dis* 2002;34:103-115.
4. Schoeder PC, Post MJD, Oschatz E, Stadler A, Bruce-Gregorios J, Thumher MM. Analysis Of The Utility Of Diffusion- Weighted MRI And Apparent Diffusion Coefficient Values In Distinguishing Central Nervous System Toxoplasmosis From Lymphoma. *Neuroradiol* 2006;48:715-720.
5. Palella FJ Jr, Delaney KM, Moorman AC, et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection *N Engl J Med*. 1998 Mar 26;338(13):853-60

6. Saktor N. The Epidemiology of human immunodeficiency virus-associated neurological disease in the era of highly active antiretroviral therapy. *J Neurovirool.* 2002 Dec;8 Suppl 2:115-21
7. Vidal JE, FA Colombo, AC de Oliveira, R Focaccia, and VL Pereira-Chiocola. 2004. PCR assay using cerebrospinal fluid for diagnosis of cerebral toxoplasmosis in Brazilian AIDS patients.
8. Luft BJ, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis. *Clin Infect Dis* 1992, 15:211-222.
9. Sacktor N, Lyles RH, Skolasky R, et al. HIV-associated neurologic disease incidence changes: Multicenter AIDS Cohort Study, 1990–1998. *Neurology* 2001; 56:257–60.
10. Ammassari A, Cingolani A, Pezzotti P, et al. AIDS-related focal brain lesions in the era of highly active antiretroviral therapy. *Neurology* 2000; 55:1194–200.
11. d'Arminio Monforte A, Duca PG, Vago L, Grassi MP, Moroni M. Decreasing incidence of CNS AIDS-defining events associated with antiretroviral therapy. *Neurology* 2000; 54:1856–9.
12. Jones JL, Sehgal M, Maguire JH. Toxoplasmosis-associated deaths among human immunodeficiency virus-infected persons in the United States, 1992–1998. *Clin Infect Dis* 2002; 34:1161.
13. Sacktor, N. 2002. The epidemiology of human immunodeficiency virus-associated neurological disease in the era of highly active antiretroviral therapy. *J. Neurovirool.*:115–121.
14. Brasil. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. Boletim Epidemiológico - AIDS e DST - Versão Final - Ano III - nº 01 - 27^a semanas epidemiológicas - julho a dezembro de 2013 Available at: <http://www.aids.gov.br/publicacao/2014/boletimepidemiologico-2014> [Acessado em 17 de maio de 2014]
15. Panel on Opportunistic Infections in HIV-Infected Adults and Adolescents. Guidelines for the prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents: recommendations from the Centers for Disease Control and

Prevention, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. Available at http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/adult_o.pdf. Accessed 04/24/2015; C1-13.

16. Gonçalves-Ferreira Aj, Herculano Carvalho M, Pimentel J. Stereotactic biopsies of focal brainstem lesions. *Surg Neurol*. 2003; v.60, p.311-320.

17. Manfredi R, Chiodo CF. Lack of change in the distribution of AIDS-defining opportunistic diseases and the related degree of immunodeficiency during the periods before and after the introduction of highly active antiretroviral therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2001 Jun;20(6):410-3.

18. Antinori A, Larussa D, Cingolani A. Prevalence, Associated Factors, and Prognostic Determinants of AIDS-Related Toxoplasmic Encephalitis in the Era of Advanced Highly Active Antiretroviral Therapy. *Clin Infect Dis*. 2004 Dec 1;39(11):1681-91. Epub 2004 Nov 5.

19. Abgrall S, Rabaud C, Costagliola D. Incidence and risk factors for toxoplasmic encephalitis in human immunodeficiency virus-infected patients before and during the highly active antiretroviral therapy era. *Clin Infect Dis* 2001; 33:1747–55

20. Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology; <http://www.neurology.org/content/50/1/21.full.pdf+html> evaluation and management of intracranial mass lesions in AIDS January 1998, 50:1 21-26; doi:10.1212/WNL.50.1.21: 1526-632X

21. C. Kellinghaus. Frequency of seizures and epilepsy in neurological HIV-infected patients; *Seizure*. 2008 Jan;17(1):27-33

22. Navia BA, Petito CK, Gold JW, Cho ES, Jordan BD, Price RW. Cerebral toxoplasmosis complicating the acquired immune deficiency syndrome: clinical and neuropathological findings in 27 patients. *Ann Neurol* 1986;19:224–238

23. Porter SB, Sande MA. Toxoplasmosis of the central nervous system in the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1992;327:1643–1648

24. Post MJ, Chan JC, Hensley GT, Hoffman TA, Moskowitz LB, Lippmann S. Toxoplasma encephalitis in Haitian adults with acquired immunodeficiency syndrome: a clinical-pathologic-CT correlation. *AJR Am J Roentgenol* 1983;140:861–868
25. Luft BJ, Brooks RG, Conley FK, McCabe RE, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immune deficiency syndrome. *JAMA*. Aug 17,1984;252(7):913-917. Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6748191>.
26. Kupfer MC, Zee CS, Colletti PM, Boswell WD, Rhodes R. MRI evaluation of AIDS-related encephalopathy: toxoplasmosis vs. lymphoma. *Magnetic resonance imaging*. 1990;8(1):51-57. Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2325518>.
27. Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology Evaluation and management of intracranial mass lesions in AIDS. *Neurology* 1998 50:21–26.
28. Barragan A, Sibley LD. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. *Trends Microbiol* 2003; 11:426-430.
29. British HIV Association and British Infection Association Guidelines for the Treatment of Opportunistic Infection in HIV-seropositive Individuals 2011 *HIV Med*. 2011 Sep;12 Suppl 2:1-140. doi: 10.1111/j.14681293.2011.00944_1.x.
30. Borges AS, Figueiredo JF (2004) Evaluation of intrathecal synthesis of specific IgG antibodies against *Toxoplasma gondii* in the diagnosis assessment of presumptive toxoplasma encephalitis in AIDS patients. *Rev Soc Bras Med Trop* 6:480–484.
31. Meira, Cristina S. et al. Immunodiagnosis in cerebrospinal fluid of cerebral toxoplasmosis and HIV-infected patients using *Toxoplasma gondii* excreted/secreted antigens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2011 Vol 71, Issue 3, 279 – 285.

4.8 TABLES:

<i>Table 1</i> - Signs and Symptoms in 56 Individuals with Cerebral Toxoplasmosis and AIDS	
Signs and symptoms	n (%)
Headache	39 (55.7)
Deficit force	38 (54.3)
Fever	25 (35.7)
Seizures	24 (34.3)
Altered level of consciousness	21 (30.0)
Dysphonia	16 (22.8)
Nausea	15 (21.4)
Vomiting	12 (17.1)
Visual Turbidity	4 (6.0)

Table 2 - Cytological, Biochemical and Immunological Characteristics of the Cerebro-Spinal Fluid of 56 Patients with Cerebral Toxoplasmosis and AIDS

<i>Cytology</i>		
Parameter	Average Value	Variation
White blood cell count (cells)	16.1	0 – 159
<i>Biochemistry</i>		
Parameter	Average Value	Variation
Total Protein (mg/dL)	122.0	33 – 1436
Chlorides (mg/dL)	693.9	631 – 750
Glucose (mg/dL)	56.8	29 - 84
<i>Immunology</i>		
Pathogen	Reaction	Number of Reagent Samples (%)
<i>Toxoplasma gondii</i>	Indirect haemagglutination	34 (60.7)
	Elisa IgG	34 (60.7)
	Direct Hemagglutination	31 (55.4)
HIV	Elisa	28 (50)
Siphilis	VDRL	2 (3.6)
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Crypto-La Test	1 (1.8)

5 APLICAÇÃO DOS SISTEMAS BASEADOS EM PCR PARA IDENTIFICAÇÃO DE CEPAS EM PACIENTES COM TOXOPLASMOSE CEREBRAL.

O capítulo II consiste do artigo que será submetido a revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

Fator de impacto: 1.789



Aplicação dos Sistemas Baseados em PCR para Identificação de Cepas em Pacientes com Toxoplasmose Cerebral.

Gabriela Brito de Oliveira Novaes^{1,2}, Alfredo Henrique Cecílio Marins Santos¹, Leandro Batista Wanderley¹, Walter Lins Barbosa Júnior¹, Elis Dionísio da Silva¹, Maria Almerice Lopes da Silva¹, Paulo Sérgio Ramos de Araújo¹, José Luiz Lima Filho², Fábio Lopes de Melo¹.

¹Laboratório de Doenças Transmissíveis, Departamento de Parasitologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Recife, PE, Brasil, 50670-420. Phone: (81)21012695. E-mails: gabrielabritonovaes@gmail.com, alfredohcms@hotmail.com, leandrowanderley@gmail.com, dionisio.elis@gmail.com, walterb716@gmail.com, almerice@cpqam.fiocruz.br, psergiora@gmail.com, fabio@cpqam.fiocruz.br.

²Laboratório de Imunopatologia Keizo Amasi, Av. Prof. Moraes Rego, 1235 – Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50670-901 | Fone PABX: (81) 2126.8000. Email: joseluiz60@gmail.com.

5.1 INTRODUÇÃO

Toxoplasmose é uma zoonose causada por um protozoário unicelular, o *Toxoplasma gondii* que acomete cerca de um terço da população mundial (1) manifestando-se como infecção sem sintomas em indivíduos imunocompetentes, mas podendo acarretar complicações graves e morte em imunocomprometidos, como em transplantados e pessoas vivendo com HIV/aids (PVHA)(1,2,3,4,5 e 6).

Em 1993, baseado nas diretrizes do CDC, o diagnóstico de TC passou a ser definido a partir da obtenção de imagens de tomografia computadorizada e ressonância magnética os quais em algumas ocasiões não é capaz de distinguir lesões de TC com outras lesões expansivas do sistema nervoso central (SNC) (9). Atualmente na prática clínica exames de imagem do SNC são empregados para se fazer o diagnóstico presuntivo de TC, no entanto, métodos de diagnóstico mais sensíveis, rápidos e específicos precisam ser empregados (7).

A utilização da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para identificação do DNA de *T. gondii* em amostras biológicas já está bem descrito na literatura (6,10)

mostrando resultados cada vez mais satisfatórios para a identificação da doença. Estudos utilizando marcadores multi-locus para identificação genotípica como na Multiplex-PCR mostram uma alta variabilidade da espécie. Outra variante da PCR utilizada na identificação, a Nested-PCR (nPCR) seguida da utilização de enzimas de restrição também pode ser utilizada como ferramenta de genotipagem (3, 11, 12). No entanto, em pacientes imunocomprometidos estes sistemas têm sido ainda poucos estudados.

O presente estudo teve como objetivo aplicar os sistemas de Multiplex-Nested-PCR (MN-PCR) para diagnóstico de TC a fim de aumentar a sensibilidade da PCR para o diagnóstico molecular, ao mesmo tempo em que detecta de maneira específica, sequências exclusivas do genoma do parasito sem a necessidade de seu isolamento em cultura, representando maior rapidez para a geração de resultados, menor gasto com mão-de-obra técnica e maior aceitação pelo paciente. Além de possibilitar à identificação através da RFLP-PCR cepas circulantes em pacientes com TC, podendo relacionar a gravidade das lesões cerebrais com os isolados.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Local/ Pacientes

Foi realizado um estudo transversal durante os meses de abril de 2012 a março de 2015, o qual teve como critérios de inclusão PVHA maiores de 18 anos, com diagnóstico de TC segundo critérios do CDC (1993).

Foram coletados 2mL do fluido cérebro-espinhal (FSC) de 117 pacientes admitidos em um Hospital de Referência no Recife. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde, número do CAAE: 04896013.3.000.5208 e realizado no Laboratório de Doenças Transmissíveis do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães-FIOCRUZ (CPqAM-FIOCRUZ)/ Departamento de Parasitologia, com a colaboração do Serviço de Diagnóstico Neurológico de Pernambuco – SDN.

Extração de DNA de *Toxoplasma gondii*

O DNA da cepa de *T. gondii* foi extraído do FSC utilizando o kit de extração e purificação DNA para tecido GenomicPrep (GE Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante.

PCR convencional

A PCR convencional foi utilizada para diagnóstico prévio dos pacientes. Foram utilizado 10 pmols dos primers B22 (5'AACGGGCGAGTAGCACCTGAGGAGA3') e B23 (5'TGGGTCTACGTCGATGGCATGACAAC3') que amplificam 115pb da região do gene B1 de *T.gondii* (19) como descrito por Colombo e colaboradores (2005). As amplificações foram realizadas com o Kit GoTaq® Green Master Mix, 2X (PROMEGA) em um volume final de 25 µL, adicionado 10 µl do DNA.

Multiplex-Nested-PCR (MN-PCR)

Para a otimização da multiplex como PCR externa da Nested-PCR foi primeiramente otimizado cada par de primer separadamente. Os primers utilizados nesta etapa e sua sensibilidade estão resumidos na tabela 1. Cada primer entrou na reação a uma concentração de 25pmols em um volume final de 25 µL, utilizando 5 µL dos amplicons da externa. A ciclagem foi realizada como descrita por Ferreira e colaboradores (2008). Os casos positivos seguiram para a realização da RFLP-PCR.

Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição – RFLP-PCR

Foram utilizados 10 µL dos produtos amplificados pela MN-PCR para digestão por enzimas de restrições com sítios de cortes específicos para identificação dos três genótipos de *Toxoplasma*. As enzimas de restrições utilizadas para cada marcador e suas especificações também estão descritas na tabela 1. Os padrões das cepas obtidos por RFLP-PCR foram comparados aos padrões descritos por Khan et al (2005).

Sequenciamento

Produtos da MN-PCR que tiveram seus resultados duvidosos foram purificados utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA) e seu DNA quantificado pelo Nanodrop e levados para sequenciamento.

As reações de sequenciamento de DNA foram realizadas no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do CPqAM-FIOCRUZ, com o Kit comercial ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing v 3.1 Ready Reaction (Applied Biosystems®), de acordo com as recomendações do fabricante, e processados no equipamento ABI 3500xL Genetic Analyser (Applied Biosystems).

Para a reação, foram utilizados os seguintes componentes : 1 µL de primer 19/2 (3,2 pmol/µL), 0,5 µL de Bigdye® Terminator v3.1, 1 µL de Tampão de sequenciamento 5x (Tris-HCl, pH 9.0 200 mM, MgCl₂ 5 mM), 1 µL do produto de PCR purificado (20 ng/µL) e água MilliQ 10 µl q.s.p. O programa de amplificação seguiu a seguinte ciclagem: 1 ciclo a 94 °C por 2 min, seguidos de 40 ciclos de 94 °C por 15 s, 50 °C por 10 s e 60 °C por 4 min. Para cada amostra foram realizadas 2 reações, sendo uma para o primer forward e outra para o reverso. Após amplificação, foi realizada a purificação/precipitação de DNA: ao volume total da reação de sequenciamento (10 µL) foi adicionado 2,5 µL de EDTA (125mM, pH 8,0) e 25 µL de etanol 100%. Após mistura em vórtex, a reação foi centrifugada a 3700 rpm por 45 minutos. O precipitado da reação foi lavado com 70 µL de etanol 70%, seguido de centrifugação a 3700 rpm por 10 minutos. Após descartar o sobrenadante, o precipitado foi solubilizado em 10 µL de Formamida Hi-Di (Applied Biosystems) e aplicado no sequenciador automático.

Eletroforese em gel de agarose

Todos os produtos provenientes de PCR e RFLP foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2% e visualizados em transluminador UV.

Tabela 1: Otimização de iniciadores e enzimas de restrições utilizadas na MN-PCR e RFLP-PCR para amplificação e digestão de *T. gondii*.

Locus (localização cromossômica)	Iniciadores Externos (sequência 5'-3') Sensibilidade Alcançada	Iniciadores Internos (Sequência 3'-5') Sensibilidade Alcançada	Pares de Bases	Enzima de Restrição (Temperatura e Tempo)	Autor (Referência)
5'SAG2 (VIII)	SAG2.F4 (GCTACCTCGAACAGGAACAC) SAG2.R4 (GCATCAACAGTCTTCGTTGC) 1pg	SAG2.F (GAAATGTTTCAGGTTGCTGC) SAGE.R2 (GCAAGAGCGAACTTGAACAC) 1fg	242pb	<i>MboI</i> 37°C - 1h30'	Howe et al (1997)
3'SAG2 (VIII)	SAG2.F3 (TCTGTTCTCCGAAGTGACTCC) SAG2.R3 (TCAAAGCGTGCTTATCGC) 10fg	SAG.F2. (ATTCTCATGCCTCCGCTTC) SAG2.R. (AACGTTTCACGAAGGCACAC) 0,1fg	222pb	<i>HhaI</i> 37°C - 1h30'	Howe et al (1997)
SAG3 (XII)	SAG3.P43S1 (CAACTCTCACAATCCACCC) SAG3.P43AS1 (GCGCGTTGTTAGACAAGACA) 0,1fg	SAG3.P43AS2 (CACAAGGAGACCGAGAAGGA) SAG3.P43S2 (TCTTGTCGGGTGTTCACTCA) 0,1fg	225pb	<i>NciI</i> 37°C - 1h30'	Grigg et al (2001)
GRA6 (XI)	GRA6.F1x (ATTTGTGTTTCCGAGCAGGT) GRA6.R1 (GCACCTTCGCTTGTTGTT) 1pg	GRA6.F1 (TTTCCGAGCAGGTGACCT) GRA6.R1x (TCGCCGAAGAGTTGACATAG) 1fg	351pb	<i>Tru9I</i> 65°C - 1h30'	Fazaeli et al (2000) Khan et al (2005)

5.5. RESULTADOS

A sensibilidade da PCR convencional foi de 1pg e a dos sistemas para realização da MN-PCR está descrito na tabela 1. E os resultados frente aos pacientes do estudo estão descritos na tabela 2.

	PCR Convencional	MN-PCR
Positivo	93(79,49%)	48(41,03%)
Negativo	24(20,51%)	69(58,97%)
Total	117 (100%)	117(100%)

Tabela 2: Número de pacientes positivos na PCR convencional e na MN-PCR.

Dos 48 pacientes positivos na MN-PCR 31 pacientes foram sugestivos para TC e todos eles foram submetidos a exames de imagens (padrão-ouro do nosso estudo), os quais 80,6% (25/31) mostraram alguma lesão neurológica e apenas 19,4% (6/31) não apresentaram nenhuma imagem sugestiva de TC, mas entraram no estudo com o intuito de comparar as cepas circulantes nos pacientes com TC (tabela 3).

Utilizando a PCR convencional como triagem nos 31 indivíduos estudados, a positividade foi vista em 71% (22/31) e ao compararmos com os pacientes reagentes no diagnóstico imunológico foram 68,18% (15/22).

Os exames de imagens revelaram que 84% (21/25) dos indivíduos possuíam múltiplas lesões, 16% (4/25) lesão única e não foi verificado nenhum tipo de alteração cerebral em 24% (6/25) dos pacientes.

Em relação à genotipagem, a figura 1 mostra as definições das cepas quando digeridas pelas enzimas de restrições específicas. A tabela 3 mostra um resumo das cepas circulantes em cada um dos 31 pacientes em diferentes marcadores e o genótipo encontrado em cada indivíduo.

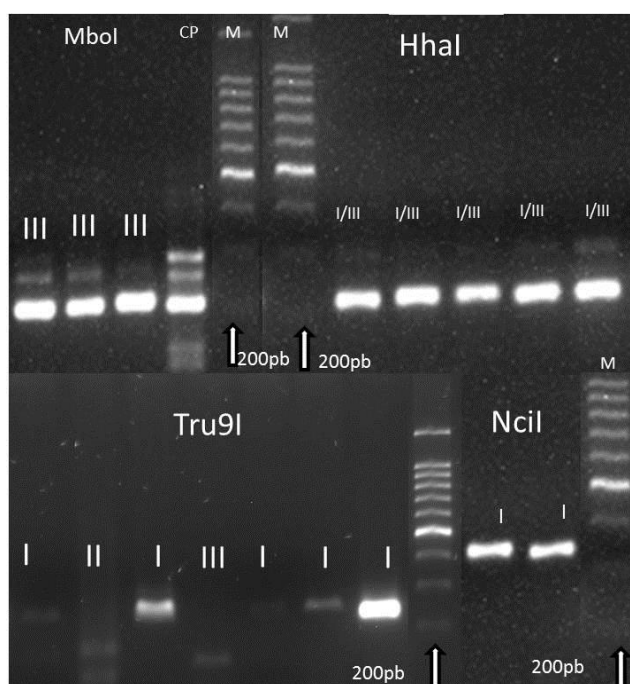


Figura 1: Gel de agarose de RFLP-PCR de amostras que deram positivos na MN-PCR utilizando as enzimas específicas para cada marcador: Mbol, HhaI, Tru9I e NciI e comparadas com os padrões descritos por Khan et al, (2005). CP: Controle Positivo; M: Marcador de 200pb.

O genótipo encontrado em maior proporção circulando nos 31 pacientes foi o tipo I com 16,1%(5/31), o genótipo III com 3,2%(1/31) assim como o genótipo II, a qual é incomum na América do Sul. Em 9,7% (3/31) e 6,4%(2/31) das amostras apresentaram alelos do tipo I e III determinado apenas pelo marcador 3'SAG2 e os alelos I e II determinados somente pelo marcador 5'SAG2, respectivamente. Cepas polimórficas (atípicos) foram encontradas em 9,7%(3/31) dos pacientes, tendo os alelos I, II e III determinadas por mais de um marcador molecular (5'SAG2, 3'SAG2, SAG3 e GRA6). Em relação às cepas mistas, foi encontrado no nosso estudo

através da RFLP-PCR que em 19,4% (6/31) pacientes possuíram pelo menos duas cepas circulantes. Em 41,9%(13/31) não conseguimos obter um perfil na RFLP-PCR provavelmente devido a poucos amplicons na MN-PCR (tabela 3).

Porém, ao caracterizar apenas os genótipos dos pacientes com TC (25), obtivemos o seguinte resultado: cepas I em 12% (3/25), cepas II, III e polimórficas em 4% (1/25), amostras apresentando os dois alelos 8% (2/25), mistas em 16% (4/25) e não identificado em 48% (12/25).

O sequenciamento foi realizado no paciente (TC162, tabela 3) que apresentou cepas mistas identificadas pelos marcadores 5'SAG2 e GRA6 identificando como cepa III e I respectivamente.

Quando comparamos a gravidade da doença (relacionadas aos exames de imagens) com a cepa circulante nos indivíduos com TC observamos que naqueles pacientes que apresentaram lesões múltiplas (21 pacientes), 14,3% (3/21) possuíam a cepa circulante mais grave, a tipo I, a cepa incomum tipo II foi observado em 4,8% (1/21) e a mesma proporção foi encontrada para o tipo III e polimórficos; também em 4,8% (1/21) apresentaram os alelos I e II e 9,5% (2/21) apresentaram o alelo I e III. Cepas mistas foram encontradas em 14,3%(3/21) das amostras. Indivíduos com múltiplas lesões, mas sem perfil definido pela RFLP-PCR foi encontrado em 47,6%(10/21) das amostras.

Apenas quatro Indivíduos foram encontrados com lesões únicas e destes, dois deram resultados inconclusivos na RFLP-PCR, um apresentou os alelos I e II e um possuiu cepas mistas (tipo I e III).

Em relação aos indivíduos sem TC, mas com genótipos mistos, polimórficos e com o tipo I foram encontrados em 33,3% (2/6), os quais podem vir a causar a TC por se tratarem de pacientes soropositivos.

Tabela 3: Tabela simplificada dos 31 pacientes com TC e sem TC baseados nos seus exames imunológicos, PCR convencional, MN-PCR, RFLP-PCR e, Genótipo encontrado e exames de imagens. TC: Toxoplasmose Cerebral; NTC: Toxoplasmose Cerebral Negativo; -: Não Realizado/Não digerido; Nd: Não definido/Inconclusivo; ML: Múltiplas lesões; LU: Lesão Única; E: Edema; SLA: Sem Lesão Aguda.

AMOSTRA	IMUNOLÓGICOS	PCR	MN-PCR	5'SAG2	3'SAG2	SAG3	GRA6	GENÓTIPO	LESÕES CEREBRAIS
TC 009	Reagente	Positivo	Positivo	-	I/III	-	-	I/III	ML + E
TC 010	Reagente	Positivo	Positivo	-	I/III	-	-	I/III	ML
TC 011	Reagente	Positivo	Positivo	-	-	-	-	Nd	ML
TC 012	Não Reagente	Positivo	Positivo	-	-	-	-	Nd	ML
TC 014	Não Reagente	Positivo	Positivo	I/II	I/III	-	I	I	ML + E
TC 017	Reagente	Positivo	Positivo	-	-	-	-	Nd	ML
TC 018	Reagente	Positivo	Positivo	-	II/Polimórfico	-	II	II	ML
TC 019	Não Reagente	Positivo	Positivo	-	-	-	-	Nd	LU
TC 021	Não Reagente	Positivo	Positivo	-	-	-	-	Nd	ML
TC 024	Reagente	Positivo	Positivo	Polimórfico (I/II)	II/Polimórfico	III/Polimórfico	I	Mista/Polimórfico	ML
TC 030	Reagente	Negativo	Positivo	-	-	-	-	Nd	ML
TC 034	Reagente	Negativo	Positivo	-	-	-	-	Nd	ML + E
TC 068	-	Positivo	Positivo	-	-	-	III	III	ML + E
TC 075	-	Negativo	Positivo	-	-	-	-	Nd	ML
TC 076	Reagente	Negativo	Positivo	-	-	-	-	Nd	ML + E
TC 089	Reagente	Negativo	Positivo	-	I/III	I	-	I	ML
TC 091	Reagente	Negativo	Positivo	-	-	-	I	I	ML
TC 092	Fraco Reagente	Negativo	Positivo	I/II	-	-	-	I/II	LU
TC 096	Reagente	Positivo	Positivo	III	I/III	I	I	Mista	ML + E
TC 145	Reagente	Positivo	Positivo	I/II	-	-	-	I/II	ML + E
TC 150	Fraco Reagente	Positivo	Positivo	III	I/III	I	I	Mista	LU + E
TC 159	Fraco Reagente	Positivo	Positivo	-	-	-	-	Nd	LU + E
TC 162	Reagente	Positivo	Positivo	III	I/III	-	I	Mista	ML + E
TC 163	Reagente	Positivo	Positivo	-	-	-	-	Nd	ML
TC 164	Reagente	Positivo	Positivo	-	-	-	-	Nd	ML
NTC 031	Não Reagente	Negativo	Positivo	-	II/Polimórfico	III/Polimórfico	I	Mista/Polimórfico	E
NTC 033	-	Negativo	Positivo	III	II/Polimórfico	II	I	Mista/Polimórfico	E
NTC 107	Reagente	Positivo	Positivo	-	I/III	-	I	I	Não
NTC 122	Reagente	Positivo	Positivo	-	-	-	-	Nd	Não
NTC 132	Reagente	Positivo	Positivo	-	I/III	-	I	I	Não
NTC 144	Reagente	Positivo	Positivo	-	I/III	-	-	I/III	SLA

5.5 DISCUSSÃO:

Toxoplasmose é assintomática na maioria dos indivíduos, mas nos PVHA pode reativar o cisto latente causando a TC, uma doença oportunista neurológica grave. A encefalite por *T. gondii* é considerada uma doença definidora de Aids, e de grande importância devido ao alto índice morbidade e mortalidade causado por esta doença nestes pacientes (1, 4 e 16).

Métodos de diagnósticos moleculares que amplifica regiões do genoma do parasito têm sido amplamente utilizados nos últimos anos como mais uma ferramenta promissora de diagnóstico para os imunocomprometidos devido a sua

elevada sensibilidade, especificidade e rapidez, reduzindo a necessidade de diagnóstico invasivo em indivíduos com TC.

Em 2013, Alfonso e colaboradores avaliaram a sensibilidade de três sistemas de PCR que amplificam três regiões diferentes do gene B1. Utilizando um total de 147 pacientes (sendo 59 com TC e aids e 88 controle) eles verificaram que os primers B22-B23, obteve a melhor performance. Os autores compararam também o alcance máximo dos três conjuntos de primers e verificaram que B22/B23 pode detectar até 0,1pg de DNA genômico de *T. gondii*. Resultado semelhante foi encontrado em nosso trabalho com 93 pacientes (1pg).

O marcador SAG2 foi utilizado no nosso trabalho com a combinação de dois polimorfismos o 5' e o 3', pois permite distinguir as três linhagens com uma única combinação de alelos. O gene SAG3 e GRA6 foram utilizados por conseguir distinguir os três tipos de cepas (22).

As sensibilidades dos primers que amplificam estes marcadores da MN-PCR foi de 0,1fg do DNA genômico, resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos (12, 20, 21,22). Ao comparar com a literatura, observamos que a combinação dos polimorfismos 5' e 3' do gene SAG2 mostrou ser o marcador mais sensível pois, quando utilizados em conjunto, conseguiu distinguir mais de 70% do genótipo além, de ter identificado um maior número de genótipos polimórficos, dados que corrobora com Ferreira et al em 2008 (12) no qual em seu estudo os dois marcadores distinguiram mais de 80% das amostras. O gene SAG3 apesar de conseguir detectar o DNA genômico purificado do parasito em quantidades mínimas (0,1fg), foi o que apresentou a menor sensibilidade para caracterização genotípica distinguindo apenas 20% das amostras, diferindo dos outros estudos onde ele mostrou ser mais sensível (12,20). O marcador GRA6 obteve uma sensibilidade de quase 40% e foi o único marcador que não identificou polimorfismo, discordando de Ferreira et al. em 2008 (12) e Dardé et al em 2004 (31), onde este marcador foi o menos sensível para detectar genótipos de *T. gondii* e demonstrou caracterizar também cepas polimórficas.

Segundo a tabela 3, dos vinte e cinco pacientes com TC do estudo, foi observado que 28% (7/25) foram negativos na PCR convencional, porém, ao realizar a MN-PCR todos eles foram positivos. Com isto podemos assegurar que o emprego

de vários marcadores ao mesmo tempo, pode aumentar ainda mais a sensibilidade e eficiência no diagnóstico da toxoplasmose e identificação de cepas mistas e polimórficas, pois aumenta a sensibilidade de detecção do teste e fornece a característica genotípica mesmo em pequenas amostras biológicas corroborando com estudos anteriores (11, 12, 13, 14, 20, 23, 24 e 25). Esta pequena quantidade de sugestivos de TC no estudo é semelhante à encontrada em outros estudos que também trabalharam com uma amostragem reduzida (23,24, 41, 42).

No entanto, observamos que dos 117 pacientes (tabela 2) que realizaram o diagnóstico da biologia molecular, 69 indivíduos (58,97%) foram negativos na MN-PCR e destes, 47,82% (33/69) tinham lesões cerebrais sugestivas de TC, mas provavelmente não tinham o alvo dos marcadores utilizados no nosso trabalho. Estes resultados demonstraram que mesmo utilizando quatros marcadores não foram suficientes para amplificação do DNA do *Toxoplasma* nestes pacientes quando comparados aos resultados obtidos pela PCR convencional realizada pelo B22/B23 do gene B1.

A baixa sensibilidade destes marcadores pode estar relacionada a três fatores: a quantidade de cópias encontradas no genoma, onde no gene B1 utilizada na PCR convencional o genoma possui 35 cópias e nos marcadores da MN-PCR (SAG2, SAG3 e GRA6) é encontrado apenas uma cópia por genoma (13, 23, 26 e 27); Ou a pouca quantidade de DNA do parasita nas amostras clínicas (12, 28, 29 e 31); E inibidores de PCR que pode resultar em uma MN-PCR negativo (21, 28, 31 e 46). Porém, é importante frisar que aqueles que tiveram imagens sugestivas de TC (25) todos foram positivos na MN-PCR apresentando a positividade em pelo menos um marcador.

Alguns trabalhos utilizaram vários marcadores genômicos e conseguiram detectar recombinações entre as três cepas provavelmente devido a grande contaminação e circulação do *T. gondii* no Brasil (13,14,23,24,25), mas apesar de utilizar apenas quatro marcadores no nosso trabalho, foi possível verificar a alta diversidade das linhagens no grupo estudado, onde 16% dos nossos pacientes tinham mais de uma cepa circulante.

Essa recombinação genética é amplamente encontrada na América do Sul e no Brasil, como comprovados nos estudos de genotipagens de cepas isoladas de

animais domésticos, os quais mostraram o predomínio das cepas tipo I, III e polimórficas (12, 13, 14, 24, 25, 29, 30, 31, 33, 35) e que possivelmente é devido a alta transmissão oral que prevalece no nosso país que também encontramos estas cepas predominando nos nossos pacientes. Podemos ressaltar que os altos índices de recombinações genéticas encontradas nas amostras clínicas brasileiras são devidos principalmente aos marcadores utilizados, os quais foram desenhados para genotipar cepas clonais de isolados da América do Norte e Europa (28, 31, 36, 43, 44).

No nosso estudo, as cepas mistas e polimórficas encontradas nos pacientes com TC corroboram com outras pesquisas brasileiras que mostram a alta diversidade genética de *T. gondii* na nossa população (30) e provavelmente está devidamente relacionada a mudanças nos genes deste parasita nos hospedeiros intermediários (humano e animais domésticos).

Sendo assim, para uma melhor análise destes dados, foi realizado o sequenciamento em um paciente (TC162, tabela 3) com característica de RFLP-PCR definida com cepa mista. O sequenciamento demonstrou a circulação de duas cepas no mesmo indivíduo.

Uma sugestão para a cepa considerada incomum (tipo II) encontrada no nosso estudo, já que ela é amplamente encontrada nos países da América do Norte e Europa (28, 31, 32, 36, 37, 38, 39, 40), é que pode estar relacionada ao ancestral comum que as cepas polimórficas possuem (34) ou mesmo ao aumento da circulação desta população no nosso país.

Ao avaliarmos a gravidade da doença (múltiplas lesões cerebrais e cepa circulante) o que ainda não tinha sido realizada no Brasil, foi verificado que a cepa tipo I, a qual é descrita na literatura como a mais severa e encontrada principalmente nos pacientes imunocomprometidos, foi encontrada nos indivíduos com TC em 14,3% (3/21) junto com o genótipo misto, tais dados corroboram com o Khan et al (2005b) que também utilizando um número pequeno de amostras verificaram a predominância desta cepa nestes pacientes. Tais dados reforça o alerta aos pacientes que não possuem TC encontrados no nosso trabalho, mas que possuem a cepa mais virulenta, podendo evoluir para TC se sua imunidade for comprometida.

Em relação aos resultados inconclusivos da RFLP-PCR (41,9%,13/31), esses dados nos mostram a limitação desta técnica ao ser realizada através de amostras provenientes do FSC, o qual possui pouca quantidade de DNA.

5.6 CONCLUSÃO

Podemos concluir que a cepa mais comum da América do Norte e Europa já encontra em circulação na nossa população e que mesmo utilizando apenas quatro marcadores conseguimos encontrar uma alta diversidade gênica no grupo estudado apesar da limitação da RFLP-PCR, porém outros marcadores seriam complementares para detectar o genótipo dos pacientes principalmente os polimórficos.

Concluimos também que para uma melhor caracterização genotípica é preciso desenhar marcadores específicos para a população brasileira, já que todos estes marcadores foram desenhados para a população norte-americana e europeia.

5.7 REFERÊNCIAS

1. Saadatnia L, Golkar M. A review on human toxoplasmosis. *Scand J Infect Dis*. 2012 Nov;44(11):805-14.
2. Luft BJ, Chua A. Central Nervous System toxoplasmosis in HIV: pathogenesis, diagnosis, and therapy. *Curr Infect Dis Rep*. 2000; 2: 358-362.
3. Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet* 2004.363:1965– 1976.
4. Vidal [JE](#), [Hernandez AV](#), [de Oliveira AC](#), [Dauar RF](#), [Barbosa SP Jr](#), [Focaccia R](#). Cerebral toxoplasmosis in HIV-positive patients in Brazil: clinical features and predictors of treatment response in the HAART era. [AIDS Patient Care STDS](#). 2005 Oct;19(10):626-34.
5. Weiss LM, Kim K. *Toxoplasma gondii: the model apicomplexan: perspectives and methods*. Illustrated ed. Academic Press; 2007. pp. 367–8

6. De Oliveira GB, [da Silva MA](#), [Wanderley LB](#) et al. Cerebral toxoplasmosis in patients with acquired immune deficiency syndrome in the neurological emergency department of a tertiary hospital. *Clin Neurol Neurosurg*. 2016 Aug 16;150:23-26.
7. Alfonso Y, Fraga J, Jiménez N, et al. Detection of *Toxoplasma gondii* in cerebrospinal fluid from AIDS patients by nested PCR and rapid identification of type I allele at B1 gene by RFLP analysis. *Exp Parasitol*. 2009 Jul;122(3):203-7.
8. Centers for Disease Control and Prevention. Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *JAMA*. 1993; 10: 729-730.
9. Bastien P. Molecular diagnosis of toxoplasmosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2002 Apr;96 Suppl 1:S205-15.
10. Dabil H, Boley ML, Schmitz TM, Van Gelder RN. Validation of a diagnostic multiplex polymerase chain reaction assay for infectious posterior uveitis. *Arch Ophthalmol* . 2001;119: 1315– 22.
11. Remington JS, Thulliez P, Montoya JG. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol* . 2004.. 42:941–945.
12. Ferreira IM¹, Vidal JE, Costa-Silva TA, et al. *Toxoplasma gondii*: genotyping of strains from Brazilian AIDS patients with cerebral toxoplasmosis by multilocus PCR-RFLP markers. *Exp Parasitol*. 2008 Feb;118(2):221-7.
13. Su C, Zhang X, Dubey JP. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. *Int. J. Parasitol*. 2006; 36, 841-848.
14. Dubey JP, Sundar N, Gennari SM, et al. Biologic and genetic comparison of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from the northern Pará state and the southern state Rio Grande do Sul, Brazil revealed highly diverse and distinct parasite populations. *Vet. Parasitol*. 2007; 143: 182-188.

15. Colombo FA, Vidal JE, Penalva de Oliveira AC, et al. Diagnosis of cerebral toxoplasmosis in AIDS patients in Brazil: importance of molecular and immunological methods using peripheral blood samples. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43: 5044-5047.
16. Pereira-Chiocola VL, Vidal JE, Su C. Toxoplasma gondii infection and cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients. *Future Microbiol.* 2009 Dec;4(10):1363-79.
17. Vidal & Su, 2009
18. Alfonso Y, Fraga J, Cox R, Jiménez N, et al. Conventional polymerase chain reaction for the diagnosis of neurotoxoplasmosis: comparison of three sets of primers for the B1 gene using CSF samples. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013 Feb;75(2):150-4.
19. Burg JL, Grover CM, Pouletty P, Boothroyd JC. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, Toxoplasma gondii, by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1989 Aug;27(8):1787-92.
20. Khan AS, Taylor C, Su AJ, et al. Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of Toxoplasma gondii. *Nucleic Acids Res.* 2005a. 33: 2980–2992
21. Howe DK, Honoré S, Derouin F, Sibley LD. Determination of genotypes of Toxoplasma gondii strains isolated from patients with toxoplasmosis. *J. Clin. Microb.* 1997; 35: 1411-1414.
22. Fazaeli A, Carter PE, Darde ML, Pennington TH. Molecular typing of Toxoplasma gondii strains by GRA6 gene sequence analysis. *Int J Parasitol.* 2000; 30:637-42
23. Khan A, Su C, German M, Storch GA., Clifford DB., Sibley LD. Genotyping of Toxoplasma gondii strains from immunocompromised patients reveals high prevalence of type I strains. *J. Clin. Microbiol.* 2005b; 43, 5881–5887.
24. Ferreira AM, Vitor RWA, Gazzinelli RT, Melo MN. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian Toxoplasma gondii strains by multilocus PCR –RFLP. *Inf. Gen. Evolut.* 2006; 6: 22–31

25. Belfort-Neto R, Nussenblatt V, Rizzo L, et al. High prevalence of unusual genotypes of *Toxoplasma gondii* infection in pork meat samples from Erechim, Southern Brazil. *An. Acad. Bras. Cienc.* 2007; 79: 111-114.
26. Van de Ven E. Identification of *Toxoplasma gondii* infections by B1 gene amplification . *J Clin Microbiol.*1991; 29: 2110-2114.
27. Lamoril J, Molina JM, de Gouvello A, et al. Detection by PCR of *Toxoplasma gondii* in blood in the diagnosis of cerebral toxoplasmosis in patients with AIDS. *J Clin Pathol.* 1996; 49: 89-92.
28. Fuentes I, Rubio JM, Ramirez C, Alvar J. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 1566-1570.
29. Gallego C, Saavedra-Matiz C, Gómez-Marín JE. Direct genotyping of animal and human isolates of *Toxoplasma gondii* from Colombia (South America). *Acta Tropica* 2006; 97: 161-167.
30. Dubey JP, Lago EG, Gennari SM, Su C, Jones JL. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology.* 2012 Sep;139(11):1375-424.
31. Dardé ML. Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. *Ann Ist Super Sanità.* 2004; 40: 57-63.
32. Zakimi S, Kyan H, Oshiro M, et al. Genetic characterization of GRA6 genes from *Toxoplasma gondii* from pigs in Okinawa, Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science.* 2006; 68: 1105-1107.
33. Dubey JP, Navarro IT, Sreekumar C, et al. *Toxoplasma gondii* infections in cats from Paraná, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. *J. Parasitol.* 2004; 90: 721-726.
34. Khan A, Fux B, Su C, et al. Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. *PNAS.* 2007; 104: 14872–14877.

35. Dubey JP, Graham DH, Blackston CR, et al. Biological and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from São Paulo, Brazil: unexpected findings. *Int J Parasitol.* 2002; 32: 99-105.
36. Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis.* 1995; 172: 1561-1566.
37. Dardé ML. Biodiversity in *Toxoplasma gondii*. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1996; 19: 27-41.
38. Owen MR, Trees AJ. Genotyping of *Toxoplasma gondii* associated with abortion in sheep. *J Parasitol.* 1999; 85: 382-384
 Dubey JP, Navarro IT, Graham DH, Dahl E, Freire RL, Prudêncio LB, et al. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens from Paraná, Brazil. *Veterinary Parasitology.* 2003; 117: 229-234.
39. Dubey JP, Navarro IT, Graham DH, Dahl E, Freire RL, Prudêncio LB, et al. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens from Paraná, Brazil. *Veterinary Parasitology.* 2003; 117: 229-234.
40. Dubey JP, Navarro IT, Sreekumar C, Dahl E, Freire RL, Kawabata HH, et al. *Toxoplasma gondii* infections in cats from Paraná, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. *J. Parasitol.* 2004; 90: 721-726.
41. Vallochi A, Muccioli C, Martins M, Silveira C, Belfort Jr R, Rizzo L. The genotype of strains causing ocular toxoplasmosis in humans in Brazil. *Am. J. Ophthalmol.* 2005; 139: 350-351.
42. Khan A, Jordan C, Muccioli C, Vallochi AL, Rizzo LV, Belfort Jr, Ricardo WA, Silveira C, Sibley LD. Genetic divergenci of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. *Emerg. Infect Dis.* 2006; 12: 942-949.
43. Howe e Sibley, 1997

44. Ajzenberg, D, Banuls AL, Su C, Dume`tre A, Demar M, Carme B, et al. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 2004; 34: 1185-1196.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Podemos afirmar neste trabalho, que TC é doença definidora de aids, pois quase metade do grupo pesquisado só descobriram ser soropositivos após os sintomas clínicos desta doença e daqueles que já sabiam poucos utilizavam a terapia antiretroviral, apesar da atual disponibilidade do tratamento, sabendo que igualmente importante para um bom prognóstico dos pacientes com TC é o início precoce do tratamento baseado em seu diagnóstico presuntivo e o uso da terapia antiretroviral.

E em relação a genotipagem do *T. gondii*, apesar da limitação da RFLP-PCR foi possível identificar uma alta diversidade gênica apesar da utilização de apenas quatro marcadores, a qual pôde-se através do sequenciamento, comprovar a circulação de duas cepas no mesmo indivíduo, caracterizado como cepa mista e encontrada em grande proporção no estudo, além dos genótipos polimórficos e da circulação da cepa considerada incomum no Brasil.

Naqueles indivíduos que possuíam uma maior gravidade nas lesões foi visto que o genótipo mais prevalente foi o tipo I, a qual é considerado o mais virulento encontrado nestes pacientes da América do Sul. E uma maior atenção deve ser dada aos pacientes que não possuem lesões cerebrais mas são soropositivos e possuem o genótipo mais virulento.

Para maiores estudos sobre a identificação das cepas de *T. gondii* é imprescindível o desenho de marcadores específicos para as cepas que circulam na nossa população a fim de descobrir maiores informações sobre as cepas polimórficas.

REFERÊNCIAS

ABATH, F. G. et al. Single-tube nested PCR using immobilized internal primers. **BioTechniques, Natick**, v. 33, n. 6, p. 1210-1214, 2002.

ABDUL-GHANI R. Polymerase chain reaction in the diagnosis of congenital toxoplasmosis: more than two decades of development and evaluation. **Parasitol Res**, v.108, p.505–12, 2011.

AFONSO E, THULLIEZ P, GILOT-FROMONT E. Local meteorological conditions, dynamics of seroconversion to *Toxoplasma gondii* in cats (*Felis catus*) and oocyst burden in a rural environment. **Epidemiol. Infect.** V.138, p. 1105–1113, 2010.

AJIOKA JW, FITZPATRICK JM, REITTER, CP. *Toxoplasma gondii* genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy. **Expert Rev Mol Med**. v. 3, p.1-19, 2001.

AJZENBERG D, COGNÉ N, PARIS L, BESSIERES MH, et al. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis and correlation with clinical findings. **J.Infect. Dis.** v.186, p.684-689, 2002.

AJZENBERG, D., BANULS, A.L., SU, C., DUMETRE, A., DEMAR, M., CARME, B., DARDE, M.L.O., Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**. v.34, p. 1185–1196, 2004.

AJZENBERG D, COLLINET F, MERCIER A, VIGNOLES P, DARDE ML. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates with 15 microsatellite markers in a single multiplex PCR assay. **J. Clin. Microbiol.** 48:4641–4645. 2010.

ALONSO R, MARTINEZ E, LAYNEZ P, MIGUELEZ M, PIÑERO JE, VALLADARES B. Detección mediante reacción en cadena de la polimerasa anidada de *Toxoplasma gondii* en pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. **Med Clin**. v.118, p. 294-296, 2002.

AMATO NETO, V et al. **Parasitologia: uma abordagem clínica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

AMENDOEIRA MRR; DA COSTA T, SPALDING SM. *Toxoplasma gondii* Nicolle e Manceaux, 1909 (Apicomplexa: Sarcocystidae) e a Toxoplasmose. **Revista Souza Marques**. v.1, p. 15-35, 1999.

ANDRADE GM, et al. Congenital toxoplasmosis from a chronically infected woman with reactivation of retinochoroiditis during pregnancy. **J. Pediatr.** v.86, p.85–88, 2010.

ANTINORI A, LARUSSA D, CINGOLANI A, et al. Prevalence, associated factors, and prognostic determinants of AIDS-related toxoplasmic encephalitis in the era of advanced highly active antiretroviral therapy. **Clin Infect Dis** 39:1681–91. 2004;

ATTIAS M., VOMMARO, R. C., SOUZA, W. Organização estrutural de *Toxoplasma gondii*. In: **Toxoplasmose e *Toxoplasma gondii***. ed. Fiocruz, 2014.

AVELINO-SILVA, V. KALLAS E.G. In: Souza, w.; BELFORT JR, R. **Toxoplasmose e *Toxoplasma gondii***. . ed. Fiocruz, 2014.

BAHIA-OLIVEIRA LM, JONES JL, AZEVEDO-SILVA J, et al. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro State, Brazil. **Emerg Infect Dis**. v. 9, p.55-62, 2003.

BARBOSA H. S., MUNO, R.M. MOURA, M. A. O ciclo Evolutivo. In: Souza, w.; BELFORT JR, R. **Toxoplasmose e *Toxoplasma gondii***. . ed. Fiocruz, 2014.

BARRAGAN A, SIBLEY LD. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. **Trends in Microbiology**, Limerick.v. 11, p. 426-430, 2003.

BARBOSA, H. S. et al. Absence of vacuolar membrane involving *Toxoplasma gondii* during its intranuclear localization. **The Journal of Parasitology**, v.91, p.182-184, 2005.

BASTIEN P..Molecular diagnosis of toxoplasmosis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v.96,p.S205–S215, 2002.

BASTIEN P, PROCOP GW, REISCHL U. Quantitative real-time PCR is not more sensitive than “conventional” PCR. **J Clin Microbiol**. v.46, p.1897-900, 2008.

BELFORT-NETO R, NUSSENBLATT V, RIZZO L, et al. High prevalence of unusual genotypes of *Toxoplasma gondii* infection in pork meat samples from Erechim, Southern Brazil. **An. Acad. Bras. Cienc.**; v.79, p. 111-114, 2007.

BOBIC, B. et al. Undercooked meat consumption remains the major risk factor for *Toxoplasma* infection in Serbia. **Parassitologia**, v.49, p.227-230, 2007.

BÓIA, M.N. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among Indian people living in Itauaré, São Gabriel da cachoeira, Amazonas, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.50, p.170-20, 2008.

BOJAR I, SZYMANSKA J. Environmental exposure of pregnant women to infection with *Toxoplasma gondii*—state of the art. **Ann Agric Environ Med**; v.17, p.209–14, 2010.

BOOTHROYD, J.C., GRIGG, M.E., Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease?. **Current Opinion in Microbiology**. v.4, p.438–442, 2002.

- BOYER KM, et al.. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in mothers of infants with congenital toxoplasmosis: implications for pre natal management and screening. **Am.J.Obstet.Gynecol.**v.192, p.564–571, 2005.
- BOYER K, et al. Unrecognized ingestion of *Toxoplasma gondii* oocysts leads to congenital toxoplasmosis and causes epidemics in North America. **Clin. Infect. Dis.** v.53, p.1081–1089, 2011.
- BUCHBINDER S, BLATZ R, RODLOFF AC. Comparison of real-time PCR detection methods for B1 and P30 genes of *Toxoplasma gondii*. **Diagn Microbiol Infect Dis.** v.45, p. 269-71, 2003.
- BURG JL, GROVER CM, POULETTY P, et al. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.** v.27, p.1787–1792,1989.
- BURNIER JR, C., FERNANDES B.F. Anatomia Patológica na Toxoplasmose: Aspectos sistêmicos, neurológicos e oculares. In: Souza, w.; BELFORT JR, R. **Toxoplasmose e *Toxoplasma gondii***. . ed. Fiocruz, 2014.
- CABRAL, A. S. G. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in women of reproductive age in the city of Brasilia, capital of Brazil. In: **International congresso of infectious Diseases**, v.13, 2008.
- CAMARA VD, TAVARES W, RIBEIRO M, et al. Neurological manifestations of toxoplasmosis in AIDS [in Portuguese]. **J Bras Doenc, as Sex Transm**;v.15, p.46–50, 2003.
- CAMARGO ME. Toxoplasmosis In: Ferreira AW. Ávila SLM (eds) **Diagnóstico Laboratorial das principais doenças auto-imunes**. Editora Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro. p.165-174, 1996.
- CARME B, et al. Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. **J. Clin. Microbiol.** v.40, p. 4037– 4044, 2002.
- CANTOS GA, PRANDO MD, SIQUEIRA MV, TEIXEIRA RM. Toxoplasmose: ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e diagnóstico. **Rev. Assoc. Med. Bras.** v. 46, p.335-341, 2006.
- CARRUTHERS, V.B; SUZUKI, Y. Effects of *Toxoplasma gondii* infection on the brain. **Schizophrenia Bulletin**, v.33, p.745-751, 2007.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. **JAMA.** v.10, p 729-730, 1993.

CHABBERT E, LACHAUD L, CROBU L, et al. Comparison of two widely used PCR primer systems for detection of toxoplasma in amniotic fluid, blood, and tissues. **J Clin Microbiol.** v.42, p.1719-1722, 2004.

CHATTERTON JM, EVANS R, ASHBURN D, JOSS AW, HO-YEN DO. Toxoplasma gondii in vitro culture for experimentation. **J Microbiol Methods.** v.51, p.331– 5, 2002.

COELHO RAI.; KOBAYASHI M; CARVALHO LB. Prevalence of IgG antibodies specific to Toxoplasma gondii among blood donors in Recife, Northeast Brazil. **Rev Inst Med Trop.** São Paulo. v. 45, p. 229- 231, 2003.

COLOMBO FA, et al.. Diagnosis of cerebral toxoplasmosis in AIDS patients in Brazil: importance of molecular and immunological methods using peripheral blood samples. **J. Clin. Microbiol.** v.43, p.5044–5047, 2005.

CONTRERAS MD, SANDOVAL ML, SALINAS P, et al. Utilidad diagnóstica de ELISA IgG, IgM, IgA y ELISA avidéz de IgG em toxoplasmosis reciente y crónica. **BolChil. Parasitol.** v.55, p.1-10, 2000.

CRISTINA N, LIAUD MF, SANTORO F, et al. A family of repeated DNA sequences in Toxoplasma gondii: cloning, sequence analysis, and use in strain characterization. **Exp. Parasitol.** v.73, p.73–81, 1991.

CURDT I, PRAAST G, SICKINGER E, et al. Development of fully automated determination of marker-specific immunoglobulin G (IgG) avidity based on the avidity competition assay format: application for Abbott Architect cytomegalovirus and Toxo IgG Avidity assays. **J Clin Microbiol;** v.47, p.603– 13, 2009.

CYPEL, S. Toxoplasmose na criança e Neurotoxoplasmose in: Souza, w.; BELFORT JR, R. **Toxoplasmose e Toxoplasma gondii.** Ed. Fiocruz, 2014

DA SILVA AV, PEZERICO SB, DE LIMA VY, et al. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains isolated from dogs with neurological signs. v.127, p.23-27, 2005.

DABIL H, BOLEY ML, SCHMITZ TM, et al. Validation of a diagnostic multiplex polymerase chain reaction assay for infectious posterior uveitis. **Arch Ophthalmol;** v.119, p.1315– 22, 2001.

DARDE´, M.L., Genetic analysis of the diversity in Toxoplasma gondii. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanita`.** v.40, p.57–63, 2004.

DELAIR E, et al. Respective roles of acquired and congenital infections in presumed ocular toxoplasmosis. **Am. J. Ophthalmol.** v,146, p.851– 855, 2008.

DELAIR E, et al. Clinical manifestations of ocular toxoplasmosis. **Ocul. Immunol. Inflamm.** 19:91–102. 2011

DEROUIN F, et al. Toxoplasmosis in bone marrow-transplant recipients: report of seven cases and review. **Clin. Infect. Dis.** v.15, p.267–270, 1992.

DEMAR M, et al.. Fatal outbreak of human toxoplasmosis along the Maroni River: epidemiological, clinical, and parasitological aspects. **Clin. Infect. Dis.** v.45, p.e88–e95, 2007.

DEROUIN F, et al.. Predictive value of *Toxoplasma gondii* antibody titres on the occurrence of toxoplasma encephalitis in HIV-infected patients. **AIDS** v.10, p.1521–1527, 1996.

DUBEY JP.. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. **Vet. Parasitol.** v.74, p.75–77, 1998.

DUBEY J. P. Tachyzoites-induced life cycle of *Toxoplasma gondii* in cats. **The Journal of Parasitology**, v.88, p. 713-717, 2002.

DUBEY, J.P., GRAHAM, D.H., BLACKSTON, C.R., et al. Biological and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from São Paulo, Brazil: unexpected findings. **International Journal for Parasitology** v.32, p.99–105, 2002.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis: a waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**, v.126, p.57-72, 2004.

DUBEY, J.P., NAVARRO, I.T., SREEKUMAR, C., et al. *Toxoplasma gondii* infections in cats from Paraná, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. **The Journal of Parasitology**. v.90, p.721–726, 2004.

DUBEY JP, et al. Prevalence of viable *Toxoplasma gondii* in beef, chicken, and pork from retail meat stores in the United States: risk assessment to consumers. **J. Parasitol.** v.91, p.1082–1093, 2005.

DUBEY, J.P., SUNDAR, N., GENNARI, S.M., et al. Biologic and genetic comparison of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from the northern Para state and the southern state Rio Grande do Sul, Brazil revealed highly diverse and distinct parasite populations. **Veterinary Parasitology**.v.143, p.182–188, 2007.

DUBEY JP, JONES JL. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **Int. J. Parasitol.** v.38, p.1257–1278, 2008.

DUBEY J. P. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**. v.39, p.877-882, 2009.

DUBEY J.P.: ***Toxoplasmosis of animals and humans***. 2nd edition. Boca Raton, Florida. CRC.Press; v.1, p.313, 2010.

DUBEY JP, et al. High prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from goats, from a retail meat store, destined for human consumption in the USA. **Int. J. Parasitol.** v.41, p.827–833, 2011.

DUBEY JP, LAGO EG, GENNARI SM, et al. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology.** v.139(11), p.1375-424, 2012.

DUNN D, et al. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. **Lancet.** v.353, p.1829–1833, 1999.

DUPIN, N. et al. HIV and antiretroviral drug distribution in plasma and fat tissue of HIV- infected patients with lipodystrophy. *AIDS*, London, v. 16, n. 18, p. 2419-2424, 2002.

ELBEZ-RUBINSTEIN A, et al. Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: case report, strain characterization, experimental model of reinfection, and review. **J. Infect. Dis.** v.199, p.280–285, 2009.

FAZAEI A, CARTER PE, DARDE ML, et al. Molecular typing of *Toxoplasma gondii* strains by GRA6 gene sequence analysis. **Int J Parasitol.** v.30, p.637-42, 2000.

FERREIRA. A. M, VITOR, R. W. A. Aspectos Taxonômicos e Evolutivos. In: Souza, w.; BELFORT JR, R. **Toxoplasmose e *Toxoplasma gondii***. . ed. Fiocruz, 2014.

FERREIRA AW, ÁVILA SLM. Sorologia: Importância e Parâmetros. In: **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-imunes**. Rio de janeiro: Guanabara Koogan:. p. 1-8, 2001.

FERREIRA, A.M., VITOR, R.W.A., GAZZINELLI, R.T., et al. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR–RFLP. **Infection, Genetics and Evolution.** v.6, p. 22–31, 2006.

FERREIRA I.M.R.; VIDAL J.E.; COSTA-SILVA T.A.; et al. *Toxoplasma gondii*: Genotyping of strains from Brazilian AIDS patients with cerebral toxoplasmosis by multilocus PCR–RFLP markers. **Experimental Parasitology.** v.118, p.221–227, 2008.

FERGUSON DJ.. Use of molecular and ultrastructural markers to evalua test age conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host. **Int. J. Parasitol.** v.34, p.347–360, 2004.

FERGUSON, D. J. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, p. 133-148, 2009.

FEKKARA,etal.. Direct genotyping of *Toxoplasma gondii* in ocular fluid samples from 20 patients with ocular toxoplasmosis: predominance of type II in France. **J. Clin. Microbiol.** v.49, p.1513–1517, 2011.

FLORI P. et al. Serologie de la toxoplasmose la femme enceint: caracteristiques et pieges. **P. Annales de Biologie Clinique**, v.67 (2), p.125-133, 2009.

FRENKEL, J.K. *Toxoplasma* inand around us. **BioScience**, v.23, p.343-352, 1973.

FUENTES I, RUBIO JM, RAMIREZ C, et al. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. **J Clin Microbiol.**; v.39, p.1566-1570, 2001.

GALLEGO C, SAAVEDRA-MATIZ C, GÓMEZ-MARÍN JE. Direct genotyping of animal and human isolates of *Toxoplasma gondii* from Colombia (South America). **Acta Tropica**. v.97, p.161-167. 2006.

GARWEG, J. G., Determinants of immunodiagnosis success in human ocular toxoplasmosis. **Parasite immunology**, v.27, p.61-68, 2005.

GILBERT RE, et al.. Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v.2, p.e277, 2008.

GRAS L, GILBERT RE, WALLON M, et al. Duration of the IgM response in women acquiring *Toxoplasma gondii* during pregnancy: implications for clinical practice and cross-sectional incidence studies. **Epidemiol Infect**; v.132, p.541– 8, 2004.

GRANATO, C. F.G, PAULINI JUNIOR, I. Diagnóstico Laboratorial da Toxoplasmose. In: Souza, w.; BELFORT JR, R. **Toxoplasmose e *Toxoplasma gondii***. . ed. Fiocruz, 2014.

GRIGG ME, BONNEFOY S, HEHL AB, SUZUKI Y, BOOTHROYD JC. Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. **Science**. v.294, p.161-165, 2001a;

GRIGG ME, GANATRA J, BOOTHROYD JC, MARGOLIS TP. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. **J. Infect. Dis.** v.184, p. 633–639, 2001b.

GRIGG ME, SUZUKI Y. Sexual recombination and clonal evolution of virulence in *Toxoplasma*. **Microbes Infect**; v.5, p. 685-90, 2003.

GOLKAR M, AZADMANESH K, KHALILI G, et al . Serodiagnosis of recently acquired *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women using enzyme-linked immunosorbent assays with a recombinant dense granule GRA6 protein. **Diagn Microbiol Infect Dis**; v.61, p.31– 9, 2008.

GOMEZ-MARIN JE, et al. First Colombian multicentric newborn screening for congenital toxoplasmosis. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v.5, p.e1195, 2011.

GONÇALVES-FERREIRA AJ, HERCULANO CARVALHO M, PIMENTEL J. Stereotact biopsies of focal brainstem lesions. **Surg Neurol.** v.60, p.311-320, 2003.

HILL, D., DUBEY, J.P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology and Infection.** v.8, p. 634–640, 2008.

HERWALDT BL. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. **Clin. Microbiol. Rev.** v.14, p.659–688, 2001.

HEUKELBACH J, et al. Waterborne toxoplasmosis, northeastern Brazil. **Emerg. Infect. Dis.** v.13, p.287–289, 2007.

HEID, C. A. et al. Real time quantitative PCR. Genome Research, Cold Spring Harbor, v. 6, n. 10, p. 986–994, 1996.

HOFFMANN C. Opportunistic infections. In: Hoffmann C, Rockstroh JK, Kamps BS, editors. **HIV Medicine.** 14th ed. Paris: Flying publisher, p. 406-411, 2006.

HOLLAND, P. M. et al. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 88, n. 16, p. 7276–7280, 1991.

HOMAN WL, VERCAMMEN M, DE BRAEKELEER J, et al. 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**; v.30, p.69– 75, 2000.

HOMANA W.L., VERCAMMENB M., DE BRAEKELEER C J., et al. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCRp. **International Journal for Parasitology.** v.30, p.69-75, 2000.

HOWE, D.K., HONORE´, S., DEROUIN, F., et al. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology.** v.35, p.1411–1414, 1995.

HOWE, D. K., AND L. D. SIBLEY.. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **J. Infect. Dis.** v.172, p.1561–1566, 1995.

JACOBS, L.; REMINGTON, J. S.; MELTON, M.L., The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. **The journal of parasitology**, v.46, p.11-21, 1960.

JAMES GS, SINTCHENKO VG, DICKESON DJ, et al.. Comparison of cell culture, mouse inoculation, and PCR for detection of *Toxoplasma gondii*: effects of storage conditions on sensitivity. **J Clin Microbiol.** v.34, p.1572-157, 1996.

JONES CD, OKHRAVI N, ADAMSON P, et al. Comparison of PCR detection methods for B1, P30, and 18S rDNA genes of *T. gondii* in aqueous humor. **Invest Ophthalmol Vis Sci**; v.41, p.634– 44, 2000.

JONES, J. L. et al. *Toxoplasma gondii* infection in rural Guatemalan Children. **The American Journal of Tropical and Hygiene**, v.72, p.295-300, 2005.

JONES JL, KRUSZON-MORAN D, SANDERS-LEWIS K, et al. *Toxoplasma gondii* infection in the United States,1999-2004,decline from the prior decade. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** V.77, p.405–410, 2007.

JONES JL, DUBEY JP. Waterborne toxoplasmosis—recent developments. **Exp. Parasitol.** v.124, p.10–25, 2010.

JONES J. L, DUBEY, J. P. Epidemiologia da toxoplasmose. In: Souza, w.; BELFORT JR, R. **Toxoplasmose e *Toxoplasma gondii***. ed. Fiocruz, 2014.

JOSEPH P, CALDERON MM, GILMAN RH, et al. Optimization and evaluation of a PCR assay for detecting toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. **J Clin Microbiol.**; v.40, p.4499-4503, 2002.

KASPER D.C.. et al, Evaluation of a ViroS ECIQ immunodiagnostic system for detection of anti-toxoplasma immunoglobulin G and immunoglobulin M antibodies for confirmatory testing for acute *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women. **Journal of Clinical Microbiology**, v.47(1), p.164-167, 2009.

KAWARABAYASHI M, AURELIANO DP, RAYMUNDO ML, et al. Frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em mulheres atendidas nas unidades da rede de saúde pública da região metropolitana de São Paulo (2001-2005). **Rev. Inst. Adolfo Lutz.** V.,66, p.63-67, 2007.

KHAN AS, TAYLOR C, SU AJ, et al. Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. **Nucleic Acids Res.**v.33, p.2980–2992, 2005a.

KHAN, A., SU, C., GERMAN, M., STORCH, G.A., et al. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from immunocompromised patients reveals high prevalence of type I strains. **Journal of Clinical Microbiology.** v.43, p.5881–5887, 2005b.

KHAN A, et al.. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis,Brazil. **Emerg.Infect.Dis.** v.12, p.942– 949, 2006.

- KHAN A, et al. Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** v.104, p.14872–14877, 2007.
- KHAN A, et al. Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. **Int. J. Parasitol.** v.41, p.645–655, 2011.
- KRAVETZ, J. D., FEDERMAN, D. G. Toxoplasmosis in pregnancy. **Association of Professors of Medicine.** V.118, p.212-216, 2005.
- KODJIKIAN L, et al.. Vertical transmission of toxoplasmosis from a chronically infected immunocompetent woman. **Pediatr. Infect. Dis. J.** v.23, p.272–274, 2004.
- LAMBERTON, O.H.L., DONNELLY, C.A., WEBSTER, J.P. Specificity of the *Toxoplasma gondii*- altered behavior to definitive versus non-definitive host predation risk. **Parasitology**, v.135, p.1.143-1.150, 2008.
- LEHMANN T, MARCET PL, GRAHAM DH, et al. From the Cover: Globalization and the population structure of the *Toxoplasma gondii*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 103, p. 11423-11428, 2006.
- LEKUTIS C, FERGUSON DJ, BOOTHROYD JC. *Toxoplasma gondii*: identification of a developmentally regulated family of genes related to SAG2. **Exp Parasitol.** v.96, p.89-96, 2000.
- LEVINE, N. D. The Protozoa Phylum Apicomplexa. Boca Raton: **CRC Press**, 1988.
- LINDSAY DS, DUBEY JP. *Toxoplasma gondii*: the changing paradigm of congenital toxoplasmosis. **Parasitology.** v.138, p.1829–1831, 2011.
- LINDSTROM I, KADDU-MULINDWA DH, KIRONDE F, et al. Prevalence of latent and reactivated *Toxoplasma gondii* parasites in HIV-patients from Uganda. **Acta Tropica**; v.100, p. 218-222, 2006.
- LITERÁK I; RYCHLÍK I, SVOBODOVÁ V, et al. Restriction fragment length polymorphism and virulence of Czech *Toxoplasma gondii* strains. **Int J Parasitol**, v.28, p.1367-1374, 1998.
- LLOP, P. et al. Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. **Applied And Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 5, p. 2071-2078, 2000.
- LUFT BJ, REMINGTON JS. Toxoplasmic encephalitis. **Clin. Infect. Dis.** v.15, p. 211-222, 1992.
- LUFT, B.J., CHUA, A. Central nervous system toxoplasmosis in HIV: pathogenesis, diagnosis, and therapy. **Current Infectious Disease, Reports** 2 p. 358–362, 2000.

MARTINS C, Toxoplasmose na gravidez. **Rev Port Clin Geral**. V.18, p.333-40, 2002.

MARTINA MN, et al.. *Toxoplasma gondii* primary infection in renal transplant recipients. Two case reports and literature review. **Transpl. Int.** v.24, p.e6–e12, 2011.

MERCIER C, ADJOGBLE KD, DAUBENER W, et al. Dense granules:are they key organelles to help under stand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? **Int. J. Parasitol.** v.35, p.829–849, 2005.

MERCIER A, et al. Additional haplogroups of *Toxoplasma gondii* out of Africa: population structure and mouse-virulence of strains from Gabon. **PLoS Negl. Trop. Dis.** V.4, p.e876, 2010.

MENOTTI J, GARIN YJ, THULLIEZ P, et al. Evaluation of a new 5' -nuclease real-time PCR assay targeting the *Toxoplasma gondii* AF146527 genomic repeat. **Clin Microbiol Infect**;v.16, p.363– 8, 2010.

MONTOYA, J.G., LIESENFLED, O., Toxoplasmosis. **Lancet** . v.363, p.1965–1976, 2004.

MONTOYA JG. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. **J Infect Dis**;v.185(Suppl 1), p.S73–82, 2002.

MONTOYA JG , ROSSO F,. Diagnosis and management of toxoplasmosis . **Clin Perinatol**. V. 32, p. 705 – 726, 2005.

MONTOYA JG, BERRY A, ROSSO F, et al.. The differential agglutination test as a diagnostic aid in cases of toxoplasmic lymphadenitis. **J Clin Microbiol**; v.45, p.1463–8, 2007.

MONTOYA JG, LIESENFELD O. Toxoplasmosis. **Lancet**. V.363, p.1965-76, 2008.

MOHRAZ M, MEHRKHANI F, JAM S, et al. Seroprevalence of toxoplasmosis in HIV/AIDS patients in Iran. **Acta Med Iran**. v. 49, p.213–8, 2011.

MORDUE, D.G., MONROY, F., LA REGINA, M., et al., Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. **The Journal of Immunology** . v.167, p. 4574–4584, 2007.

NISSAPATORN V, LEE C, QUEK KF, et al. Toxoplasmosis in HIV/AIDS patients: A current situation. **Jpn J Infect Dis**. v.57, p.160-165, 2004.

NOWAKOWSKA, D., COLON, I., REMINGTON, J.S., et al. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multiplex PCR and peptide-based serological testing of

samples from infants in Poland diagnosed with congenital toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**. v.44, p.1382–1389, 2004.

OKAY TS, YAMAMOTO L, OLIVEIRA LC, et al. Significant performance variation among PCR systems in diagnosing congenital toxoplasmosis in Sao Paulo, Brazil: analysis of 467 amniotic fluid samples. **Clinics (Sao Paulo)**. v.64, p.171– 6, 2009.

OLIVEIRA GB, [DA SILVA MA](#), [WANDERLEY LB](#) et al. Cerebral toxoplasmosis in patients with acquired immune deficiency syndrome in the neurological emergency department of a tertiary hospital. **Clin Neurol Neurosurg**. v.150, p.23-26, 2016.

PALM C., TUMANI H., PIETZCKER T, et al. Diagnosis of cerebral toxoplasmosis by detection of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in cerebrospinal fluid. **J. Neurol**. v.255, p.939-41, 2008.

PAPPAS G, ROUSSOS N, FALAGAS ME. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. **Int J Parasitol**. v.39, p.1385– 94, 2009.

PATRAT-DELON S, et al.. Correlation of parasite load determined by quantitative PCR to clinical outcome in a heart transplant patient with disseminated toxoplasmosis. **J. Clin. Microbiol**. v.48, p.2541–2545, 2010.

PELLOUX H, DUPOUY-CAMET J, DEROUIN F, et al. multicentre prospective study for the polymerase chain reaction detection of *Toxoplasma gondii* DNA in blood samples from 186 AIDS patients with suspected toxoplasmic encephalitis. **Bio-Toxo Study Group**. AIDS. V.11, p.1888-1890, 1997.

PELLOUX H, GUY E, ANGELICI MC ET AL. A second european collaborative study on polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii* involving 15 teams. **FEMS Microbiol Lett**. V.165, p.231-7, 1998.

PENA HF, SOARES RM, AMAKU M, et al. *Toxoplasma gondii* infection in cats from Sao Paulo state, Brazil: seroprevalence, oocyst shedding, isolation in mice, and biologic and molecular characterization. **Rev.Vet. Sci**. v.81, p.58-67, 2006.

PENA HF, GENNARI SM, DUBEY JP, et al. Population structure and mouse virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **Int J Parasitol**.; 38:561-569. 2008

PEREIRA-CHIOCCOLA VL, VIDAL JE, et al. *Toxoplasma gondii* infection and cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients. **Future Microbiol**. v.4(10), p.1363-79, 2009.

PEYRON F, LOBRY JR., MUSSET K, et al. Serotyping of *Toxoplasma gondii* in chronically infected pregnant women: predominance of type II in Europe and types I and III in Colombia (South America). **Microbes Infect**.; v.8, p.2333-2340, 2006.

PEYRON F, LOBRY JR., MUSSET K, FERRANDIZ J, GOMEZ-MARIN JE., PETERSEN E, et al. Serotyping of *Toxoplasma gondii* in chronically infected pregnant women: predominance of type II in Europe and types I and III in Colombia (South America). **Microbes Infect.**; v.8, p.2333-2340, 2006.

PINON JM, DUMON H, CHEMLA C, et al. 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**;v.39, p.2267– 71, 2001.

PFREPPER KI, ENDERS G, GOHL M, , et al. Seroreactivity to and avidity for recombinant antigens in toxoplasmosis. **Clin Diagn Lab Immunol**;v.12, p.977– 82, 2005.

PORTEGIES P, SOLOD L, CINQUE P, et al. Guidelines for the diagnosis and management of neurological complications of HIV infection. **Eur J Neurol.** v.11, p. 297-304, 2004.

PRIYA J, CALDERÓN MM, GILMAN RH, et al. Optimization and evaluation of a PCR assay for detecting toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. **J. Clin. Microbiol.** v.40, p. 4499-4503. 2002.

REMLINGTON JS, MCLEOD R, THULLIEZ P, Desmonts G. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein J, eds. Infectious diseases of the fetus and newborn infant, 5th edn. Philadelphia: **WB Saunders**.p. 205-346, 2001.

REMLINGTON JS, THULLIEZ P, MONTOYA JG. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. **J Clin Microbiol**; v.42, p.941–5, 2004.

REMLINGTON JS, MCLEOD R, THULLIEZ P, et al. Infectious diseases of fetus and newborn infant, 6th ed. Philadelphia: Elsevier-Saunders Company,. p. 947– 1091, 2006.

REY, L. Schistosoma e esquistossomose: epidemiologia e controle. In: _____. **Parasitologia.** 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 35, p. 389-410, 2011.

ROBERT-GANGNEUX, F. AND DARDÉ, M.L., Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews.** p. 264–296, 2012.

ROBERTS F, et al. Histopathological features of ocular toxoplasmosis in the fetus and infant. **Arch. Ophthalmol.** V.119, p.51–58, 2001.

RORMAN E, ZAMIR CS, RILKIS I, et al. Congenital toxoplasmosis—prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. **Reprod Toxicol**; v.21, p.458– 72, 2006.

ROGERS NM, et al. Transmission of toxoplasmosis in two renal allograft recipients receiving an organ from the same donor. **Transpl. Infect. Dis.** v.10, p.71–74, 2008.

SAADATNIA ; GOLKAR A . review on human toxoplasmosis .

Scandinavian Journal of Infectious Diseases, v.44, p.805–814, 2012.

SABIN AB, FELDMAN HA. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (*Toxoplasma*). **Science**;v.108, p.660– 3, 1948.

SACKTOR N. The epidemiology of human immunodeficiency virus-associated neurological disease in the era of highly antiretroviral therapy. **J. Neurovirol.** V.8, p.115-121, 2002.

SANTOS CB, DE CARVALHO AC, RAGOZO AM, et al. First isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from finishing pigs from Sao Paulo State, Brazil.; v.131, p 207-211, 2005.

SCHOEDER PC, POST MJD, OSCHATZ E, et al. Analysis of the utility of diffusion-weighted MRI and apparent diffusion coefficient values in distinguishin central nervous system toxoplasmosis from lymphoma. **Neuroradiol** v.48, p.715-720, 2006.

SICKINGER E, GAY-ANDRIEU F, JONAS G, et al. Performance characteristics of the new ARCHITECT Toxo IgG and Toxo IgG Avidity assays. **Diagn Microbiol Infect Dis**; v.62, p.235– 44, 2008.

SCHEINERT, P.; BEHRENS, B.; KAHLE, D. Optimizing DNA Amplification Protocols using the Eppendorf® Mastercycler®. Eppendorf North America, Apr. 8. 2003. Disponível em:

<http://www.eppendorfna.com/applications/PCR_appl_protocolsMC.asp> acesso em: 3 Nov. 2005

SKIEST DJ. Focal Neurological disease in patients with acquired immunodeficiency syndrome. **Clin Infec Dis**; 34:103-115. 2002.

STERKERS Y, VARLET-MARIE E, CASSAING S, et al. Multicentric comparative analytical performance study for molecular detection of low amounts of *Toxoplasma gondii* from simulated specimens. **J Clin Microbiol** v.48, p.3216– 22, 2010.

SPEER, C. A.; DUBEY, J. P. Ultrastructural differentiation of *Toxoplasma gondii* schizonts (types B to E) and gamonts in the intestines of cats fed bradyzoites. **International Journal for Parasitology.** v.35, p.193-206, 2005.

SU, C., ZHANG, X., DUBEY, J.P., Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR–RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. **International Journal for Parasitology** v.36, p.841–848, 2006.

SIBLEY LD, BOOTHROYD JC. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. **Nature (London)**.; v.359, p82-85, 1992.

SIBLEY, L.D., MORDUE, D.G., SU, C., et al. Genetic approaches to studying virulence and pathogenesis in *Toxoplasma gondii*. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B Biological Sciences** v.357, p.81–88, 2002.

SIBLEY LD, AJIOKA JW.. Population structure of *Toxoplasma gondii*: clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps. **Annu. Rev. Microbiol.** v.62, p.329–351, 2008.

SROKA J, et al.. The occurrence of *Toxoplasma gondii* infection in people and animals from rural environment of Lublin region—estimate of potential role of water as a source of infection. **Ann. Agric. Environ. Med.** v.17, p.125–132, 2010.

SWITAJ1, A. MASTER2, M. SKRZYPCZAK2 et al. RECENT trends in molecular diagnostics for *Toxoplasma gondii* infections K.. **Clin Microbiol Infect** . v.11, p.170–176, 2005.

TAO, S. C. et al. One-tube nested RT-PCR enabled by using a plastic film and its application for the rapid detection of SARS-virus. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 26, n. 3, p. 179-183, 2004.

TENTER AM, HECKEROTH AR, WEISS LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**.; v.30, p.1217-1258, 2000.

TIBAYRENC, M., AYALA, F.J., The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. **Trends in Parasitology** v.18, p.405–410, 2002.

THULLIEZ P.. Efficacy of prenatal treatment for toxoplasmosis: a possibility that cannot be ruled out. **Int. J. Epidemiol.** V.30, p.1315–1316, 2001.

UNAIDS – Joint United Nations Programme on HIV/AIDS disponível:
URL:http://www.unAIDS.org/epi/2005/doc/EPIupdate2005_html_en/epi05_02_en.htm.

VALLOCHI, A., MUCCIOLI, C., MARTINS, M., et al. The genotype of strains causing ocular toxoplasmosis in humans in Brazil. **American Journal of Ophthalmology** v.139, p. 350–351, 2005.

VASCONCELOS-SANTOS DV, et al. Congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil: results of early ophthalmologic examination of a large cohort of neonates. **Ophthalmology** v.116, p.2199.e1–2205.e1, 2009.

VERMA A, BERGER JR. Infections of the nervous system: neurological manifestations of human immunodeficiency virus infection. In: Daroff RB, Fenichel GM, Jankovic J, Mazziotta JC, editors. **Bradley's neurology in clinical practice**. Ed.6: Philadelphia Pa: Elsevier Saunders. P. 1211-30, 2012.

VIDAL JE, FA COLOMBO, AC DE OLIVEIRA, et al. PCR assay using cerebrospinal fluid for diagnosis of cerebral toxoplasmosis in Brazilian AIDS patients. 2004.

VIDAL, J.E., HERNANDEZ, A.V., PENALVA DE OLIVEIRA, A.C et al.,. Cerebral toxoplasmosis in HIVpositive patients in Brazil: clinical features and predictors of treatment response in the HAARTera. **AIDS Patient Care and STDs** v.19, p. 840–848, 2005.

VIDAL JE, et al. Importance of high IgG anti-Toxoplasma gondii titers and PCR detection of *T. gondii* DNA in peripheral blood samples for the diagnosis of AIDS-related cerebral toxoplasmosis: a case-control study. **Braz J Infect Dis.** v.15, p.356-9, 2011.

VILLENA I, et al. Congenital toxoplasmosis in France in 2007: first results from a national surveillance system. **Euro Surveill.** V.15(25): pii, 2010.

WEINMAN, D; CHANDLER, A.H. Toxoplasmosis in swine and rodent. Reciprocal oral infection and potential human hazard. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.** V.87, p. 211-216,1954.

WEISS L. M.; KIM, K. The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Frontiers in Bioscience: a Journal ad Virtual Library*, v.5, p.391-405, 2000.

WILSON M, JONES JL, MCAULEY JB. *Toxoplasma*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover MC, editors. *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. ASM Press;. P. 1970– 80, 2003.

ZAKIMI S, KYAN H, OSHIRO M, et al.. Genetic characterization of GRA6 genes from *Toxoplasma gondii* from pigs in Okinawa, Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science.**; v.68, p. 1105-1107, 2006.

PERSPECTIVAS

Com o intuito de complementação do segundo artigo temos como perspectiva realizar o sequenciamento das amostras que foram consideradas inconclusivas na RFLP-PCR devido à limitação da técnica em detectar DNA em amostras de FSC para alcançarmos completamente o objetivo principal que é a caracterização genotípica de todos os pacientes estudados.

APÊNDICE A- CAPÍTULO III: OTIMIZAÇÃO DE UM NESTED-PCR EM ÚNICO TUBO PARA O DIAGNÓSTICO DE NEUROTOXOPLASMOSE.

A otimização da PCR de único tubo para o diagnóstico da neurotoxoplasmose já foi realizada, porém mais experimentos serão importantes para complementar este artigo para posterior publicação. Esta parte do trabalho foi apresentada oralmente no XXIII Congresso Brasileiro de Parasitologia em Setembro de 2013.

RESUMO: A neurotoxoplasmose (NT) é a infecção do sistema nervoso mais freqüente em pacientes com aids e sua descoberta precoce permite um melhor prognóstico ao paciente. PCR tem sido utilizado com resultados promissores pois limita o uso de métodos invasivos e de baixa sensibilidade e quando associada às técnicas de imagem diminui o uso de biópsias. A Nested-PCR convencional é um método muito sensível e específico para o diagnóstico da toxoplasmose porém uma das suas limitações são os problemas de contaminação quanto à passagem do produto da primeira para a segunda fase. Afim de se obter um método de PCR que seja tão eficiente mas sem o risco de contaminação foi proposto um método para otimizar a Nested-PCR em único tubo (STNPCR). Para STNPCR, os iniciadores internos foram imobilizadas na interface interna da tampa do microtubo por meio de adsorção e os iniciadores externos foram adicionados juntamente com os outros reagentes da reação. Este procedimento elimina a abertura do microtubo, que pode levar a resultados falso-positivos por meio de contaminação cruzada. Foi realizada uma curva de diluição de fator 10 variando de 1 ng até 10 pg de DNA de *Toxoplasma gondii* juntamente com o controle negativo. O limite de detecção do DNA do toxoplasma no sistema de STNPCR foi até 10 pg. Este estudo apresenta uma nova ferramenta para diagnóstico da toxoplasmose mais eficiente e com menos risco de contaminação o que favorece o prognóstico dos pacientes. Estudos mais abrangentes devem ser realizados com amostras de pacientes para a validação desta técnica.

Palavras- Chaves: Neurotoxoplasmose. Diagnóstico. STNPCR.

1 INTRODUÇÃO

Toxoplasmose cerebral é uma das mais comuns infecções neurológicas oportunistas em pacientes com AIDS causando significativa morbidade e mortalidade¹. A reativação da infecção latente ocorre quando os pacientes apresentam menos de 200 células CD4+/μL de sangue, tornando a doença grave, podendo afetar o cérebro e o sistema nervoso central causando encefalite^{1,2}. Estima-se que cerca de 30% a 50% dos pacientes com HIV positivos e infectados pelo *T. gondii* desenvolverão neurotoxoplasmose^{3,4}.

Em relação ao diagnóstico, a PCR tem sido utilizado com resultados promissores, pois limita o uso de métodos invasivos e de baixa sensibilidade e quando associada às técnicas de imagem diminui o uso de biópsias. Porém, variações na sensibilidade da PCR podem ocorrer em função da baixa parasitemia⁵. No LCR a sensibilidade varia de (11.5 a 100%), mas a especificidade normalmente é alta (96-100%)⁶. No sangue a sensibilidade varia de 25 a 77%⁷.

A Nested-PCR convencional é um método muito sensível e específico para o diagnóstico da toxoplasmose porém uma das suas limitações são os problemas de contaminação quanto à passagem do produto da primeira para a segunda fase. A fim de se obter um método de PCR que seja tão eficiente mas sem o risco de contaminação foi proposto um método para otimizar a Nested-PCR em único tubo (STNPCR). Este trabalho teve como objetivo desenvolver sistemas baseados em Nested-PCR único tubo (NST-PCR) para o diagnóstico de neurotoxoplasmose.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras

Foi utilizada a cepa RH (tipo I) para a otimização deste sistema de NST-PCR.

Extração de DNA de *Toxoplasma gondii*

O DNA da cepa de *T. gondii* foi extraído do fluído cérebro-espinhal (FSC) utilizando o kit de isolamento de DNA para tecido GenomicPrep (GE Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante.

Nested PCR em único tubo (“Single Tube Nested PCR - STNPCR”)

Os marcadores utilizados para esta otimização, assim como seus primers, estão relacionados na tabela 1. Os iniciadores internos foram imobilizados na superfície interna da tampa dos microtubos de reação, através da evaporação (em estufa a 37°C) em um volume de 10 µl, em azul de bromofenol 1 µg/mL, descrito por Abath e colaboradores (2002). Foi utilizado 25 pmoles de primers internos e externos em um volume final de 25µl. Este tipo de experimento foi realizado com 1ng e 10 pg de DNA de *Toxoplasma gondii*.

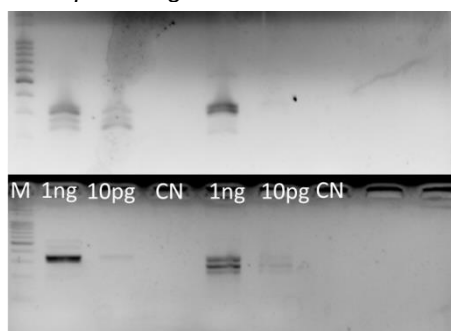
Tabela 1: Iniciadores externos e internos utilizados para NST-PCR.

Locus (localização cromossômica)	Iniciadores Externos (sequência 5'-3')	Iniciadores Internos (Sequência 3'-5')	Pares de Bases	Autor (Referência)
5'SAG2 (VIII)	SAG2.F4 (GCTACCTCGAACAGGAACAC) SAG2.R4 (GCATCAACAGTCTTCGTTGC)	SAG2.F (GAAATGTTTCAGGTTGCTGC) SAGE.R2 (GCAAGAGCGAACTTGAACAC)	242pb	Howe et al (1997)
3'SAG2 (VIII)	SAG2.F3 (TCTGTTCTCCGAAGTGAAGTCC) SAG2.R3 (TCAAAGCGTGCATTATCGC)	SAG.F2. (ATTCTCATGCCTCCGCTTC) SAG2.R. (AACGTTTCACGAAGGCACAC)	222pb	Howe et al (1997)
SAG3 (XII)	SAG3.P43S1 (CAACTCTCACAATTCCACCC) SAG3.P43AS1 (GCGCGTTGTTAGACAAGACA)	SAG3.P43AS2 (CACAAGGAGACCGAGAAGGA) SAG3.P43S2 (TCTGTCTCGGGTGTCACTCA)	225pb	Grigg et al (2001)
GRA6 (XI)	GRA6-F1x (ATTTGTGTTTCCGAGCAGGT) GRA6.R1 (GCACCTTCGCTTGTTGGTT)	GRA6.F1 (TTTCCGAGCAGGTGACCT) GRA6.R1x (TCGCCGAAGAGTTGACATAG)	351pb	Fazaeli et al (2000) Khan et al (2005)

3 RESULTADOS

A sensibilidade de todos os primers foi alcançada até 10pg como podemos ver na figura 1.

Figura 1: Curva de DNA de *Toxoplasma gondii* em STNPCR.



M: Marcador de 100pb. Gel superior: 1º ao 3º poço: primers F4.R4/F.R2. 4º ao 6º poço: primers F3.R3/F2.R. Gel inferior: 1º ao 3º poço: primers P43S1.P43AS1/P43AS2.P43S2; 4ª ao 6ª poço: primers: F1X.R1/F1.R1X. CN: Controle Negativo.

4 REFERÊNCIAS

- 1- LUFT, B.J., CHUA, A. Central nervous system toxoplasmosis in HIV: pathogenesis, diagnosis, and therapy. *Current Infectious Disease*, 2000. Reports 2 p. 358–362.
- 2 - MONTOYA, J.G., LIESENFELD, O.,. Toxoplasmosis. *Lancet* 2004. 363, 1965–1976.
- 3- SKIEST DJ. Focal Neurological disease in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Infec Dis* 2002; 34:103-115.
- 4- SCHOEDER PC, POST MJD, OSCHATZ E, STADLER A, BRUCE-GREGORIOS J, THUMHER MM. Analysis of the utility of diffusion- weighted MRI and apparent diffusion coefficient values in distinguishin central nervous system toxoplasmosis from lymphoma. *Neuroradiol* 2006, 48:715-720.
- 5- PELLOUX H, DUPOUY-CAMET J, DEROUIN F, ABOULKER JP, RAFFI F. A multicentre prospective study for the polymerase chain reaction detection of *Toxoplasma gondii* DNA in blood samples from 186 AIDS patients with suspected toxoplasmic encephalitis. *Bio-Toxo Study Group. AIDS*. 1997; 11: 1888-1890.
- 6- PRIYA J, CALDERÓN MM, GILMAN RH, QUISPE ML, COK J, TICONA E, *ET AL.* Optimization and evaluation of a PCR assay for detecting toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40: 4499-450.

ANEXO I: COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Validação do Sistema Baseado em PCR Nested-Multiplex e RFLP-PCR para o Diagnóstico e Genotipagem do *Toxoplasma gondii* em Amostras Biológicas nos Pacientes com Neurotoxoplasmose e Aids no Estado de Pernambuco.

Pesquisador: Gabriela Brito de Oliveira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 04896013.3.0000.5208

Instituição Proponente:

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
Fundação Oswaldo Cruz (Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães)

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 234.891

Data da Relatoria: 28/03/2013

Apresentação do Projeto:

O diagnóstico da toxoplasmose é ainda hoje baseado na sorologia, e as técnicas moleculares se encontram em etapas recentes de avaliação. É muito cedo para determinar uma técnica padrão-ouro diferente da sorologia, uma vez que os diferentes sistemas descritos na literatura se mostram efetivos, mas nem sempre reprodutíveis, ou com baixa especificidade.

O diagnóstico molecular tem se mostrado uma importante ferramenta no diagnóstico direto da toxoplasmose, pois permite a detecção do parasito em um intervalo de tempo relativamente curto e pode apresentar elevadas sensibilidade e especificidade. As técnicas moleculares utilizadas para a detecção do DNA do parasita baseiam-se, principalmente, na PCR e na hibridização por dot blot do DNA extraído da amostra do paciente, com uma sonda específica de *T. gondii*.

A PCR é um método amplamente utilizado para detectar *T. gondii* em diferentes fluidos corporais, tais como sangue, líquido amniótico, LCR, humor aquoso, fluido de lavado bronco-alveolar e urina.

O presente protocolo trata de pesquisa a ser desenvolvida como tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (PPGLIKA) - UFPE e tem como objetivo validar um novo teste de diagnóstico para neurotoxoplasmose em pacientes com HIV/AIDS internados nos principais Hospitais de

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



Pernambuco e caracterizar qual o tipo de cepa o paciente está infectado para um tratamento mais rápido e eficaz.

A coleta do sangue, urina e/ou líquido cefalorraquidiano (LCR) dos pacientes com neurotoxoplasmose e AIDS será realizada em quatro hospitais de referência para doenças neurológicas na cidade do Recife, a saber: Hospital da Restauração (HR), Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC), Hospital Correia Picanço (HCP) e Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC). A validação da Nested-PCR e PCR-Multiplex, assim como a genotipagem molecular por PCR-RFLP serão realizadas no Laboratório de Doenças Transmissíveis do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães - FIOCRUZ/PE. Os procedimentos para diagnóstico Molecular e genotipagem encontram-se detalhados no protocolo.

Objetivo da Pesquisa:

A pesquisa tem por objetivo primário validar os sistemas baseados em PCR Nested-Multiplex para o diagnóstico de neurotoxoplasmose em amostras biológicas e determinar através da técnica de PCR-RFLP o genótipo das cepas de *T. gondii* isolados de pacientes com neurotoxoplasmose e AIDS acompanhados nos serviços de referência da cidade do Recife no período de Março de 2013 a Dezembro de 2015.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos para os sujeitos da pesquisa estão relacionado ao exame de sangue que pode causar um desconforto provocado pela punção venosa (picada da agulha) e, algumas vezes, hematoma. Também é esperado que após a coleta do líquido cefalorraquidiano (LCR) possa haver um pequeno sangramento e dor no local da punção.

Como benefício, os resultados deste exame (PCR) serão entregue ao paciente e ao médico assistente que na dependência dos resultados positivos será feito um acompanhamento pelo médico e /ou tratado para Neurotoxoplasmose na Unidade hospitalar de origem.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa encontra-se bem estruturada

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória (carta de anuência do O hospital da Restauração (HR), Hospital Universitário Oswaldo Cruz, Hospital Correia Picanço e Hospital das Clínicas; termo de confidencialidade; TCLE; FR devidamente preenchida, currículo do pesquisador e demais membros da equipe e termo de confidencialidade) foram anexados à Plataforma Brasil.

Recomendações:

Não se aplicar.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 Fax: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Informa a pesquisadora que a pesquisa ainda não foi iniciada e que a mesma só terá seu início após a aprovação do projeto de pesquisa no comitê de ética e que o erro no cronograma ocorreu quando o projeto foi anexado na Plataforma Brasil.

Quanto ao exame de ressonância magnética o mesmo já é padrão utilizar nos hospitais onde será realizado o estudo.

Em relação aos custos referentes a aquisição dos kits e placas de sequenciamento o Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, dispõe de todo aparato tecnológico, bem como todos os reagentes necessários para o desenvolvimento do projeto, com a exceção do kits e placas de sequenciamento, no valor de R\$ 2.000,00 reais para 1000 reações, já foi solicitado através do Tesouro, pelo Dr. Fábio Melo cuja declaração encontra-se anexada à Plataforma Brasil.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer do protocolo em questão e o pesquisador está autorizado para iniciar a coleta de dados.

Projeto foi avaliado e sua APROVAÇÃO definitiva será dada, após a entrega do relatório final, através da PLATAFORMA BRASIL ou por meio de ofício impresso emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa/UFPE.

RECIFE, 02 de Abril de 2013

Assinador por:
GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 Fax: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br

ANEXO B – APRESENTAÇÃO DO ARTIGO EM CONGRESSO



XXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA
III Encontro de Parasitologia do Mercosul
22 a 26 de Outubro de 2013, Florianópolis, SC, Brasil

Florianópolis, 17 de Setembro de 2013.

Prezada Congressista,

É com enorme prazer que informamos que seu trabalho intitulado "OTIMIZAÇÃO DE UM NESTED-PCR EM ÚNICO TUBO PARA O DIAGNÓSTICO DE NEUROTOXOPLASMOSE" (2136) foi selecionado para apresentação oral no XXIII Congresso Brasileiro de Parasitologia – III Encontro de Parasitologia do Mercosul.

A Comissão Científica do congresso selecionou para apresentação oral 10 trabalhos de cada área (Protozoologia, Helmintologia, Vetores/Écotoxoparasitoses e Enteroparasitoses) com base na qualidade científica.

As apresentações orais de todas as áreas serão realizadas no dia **25/10/2013** das **14:00 às 16:00 horas**. Cada apresentação deverá ter a duração máxima **10 minutos**, e as salas disporão de equipamento audiovisual (computador, projetor multimídia) e sonoro. A apresentação deverá ser **realizada em Power Point** e o arquivo correspondente deverá ser entregue obrigatoriamente no mídia desk **24 horas antes** do início das apresentações.

Ressaltamos que o trabalho **deverá ser também apresentado na forma de pôster**.

Em cada sala de apresentação, dois membros da Comissão Organizadora e/ou da Comissão Científica do congresso selecionarão os três melhores trabalhos de apresentação oral, os quais receberão premiação a ser entregue na cerimônia de encerramento do congresso.

Certos de sua atenção, estaremos no aguardo de sua confirmação através do e-mail secretaria@qeeventos.com.br.

ANEXO C – ARTIGO I PUBLICADO EM REVISTA

Clinical Neurology and Neurosurgery 150 (2016) 23–26



Contents lists available at ScienceDirect

Clinical Neurology and Neurosurgery

journal homepage: www.elsevier.com/locate/clineneuro

Cerebral toxoplasmosis in patients with acquired immune deficiency syndrome in the neurological emergency department of a tertiary hospital



Gabriela Brito de Oliveira^a, Maria Almerice Lopes da Silva^a, Leandro Batista Wanderley^a, Carolina da Cunha Correia^b, Eduardo Caetano Brandão Ferreira^a, Zulma Maria de Medeiros^a, José Luiz Lima Filho^c, Fábio Lopes de Melo^a, Paulo Sérgio Ramos de Araújo^a, Alfredo Henrique Cecílio Marins Santos^{a,4}

^a Laboratório de Doenças Transmissíveis, Departamento de Parasitologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Recife, PE, 50670-420, Brazil

^b Department of Neurology, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Pernambuco, Rua Arnaldo Marques, 310 – Santo Amaro, Recife/PE CEP: 50100-130, Brazil

^c Laboratório de Imunopatologia Keto Assini, Av. Prof. Moraes Rego, 1235 – Cidade Universitária, Recife, PE, CEP: 50670-901, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 8 July 2015
Received in revised form 9 August 2016
Accepted 14 August 2016
Available online 16 August 2016

Keywords:
Cerebral toxoplasmosis
HIV
Acquired immunodeficiency syndrome

ABSTRACT

Introduction: Cerebral toxoplasmosis is the most common cause of space occupying brain lesion in patients with HIV/AIDS in Brazil. In the post-HAART era, it is responsible for high rates of morbidity and mortality worldwide.

Materials and methods: This study consists of a case series of 56 patients diagnosed with cerebral toxoplasmosis whose clinical features, brain imaging and cerebrospinal fluid aspects were analyzed.

Results: Cerebral toxoplasmosis led to the diagnosis of infection by the human immunodeficiency virus (HIV) in 27 (48.2%) of the patients, while 29 (51.8%) others already knew to be HIV seropositive. However, at the time of diagnosis of cerebral toxoplasmosis, only 9 (16.6%) reported being under antiretroviral therapy and 5 (8.9%) were receiving primary prophylaxis for toxoplasmosis. Headache, strength deficit and fever were the most frequent signs and symptoms throughout the study. Fifty-three patients showed changes consistent with toxoplasmosis in CT or MRI. Thirty-four (60.7%) CSF samples were positive in the indirect haemagglutination test and for the reaction of *Toxoplasma gondii* IgG ELISA, while 31 (55.4%) were positive in the direct haemagglutination test. Fifty (89.3%) patients underwent first-line treatment for toxoplasmosis.

Conclusion: Cerebral toxoplasmosis is still a very relevant neurological disease in individuals with AIDS admitted to neurology emergency departments. Early diagnosis and initiation of empiric treatment and antiretroviral therapy are important for good prognosis.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1.3. Introduction

Cerebral toxoplasmosis is one of the most common causes of central nervous system (CNS) infection and a frequent cause of space occupying brain lesion in patients with acquired immune deficiency syndrome (AIDS) in Brazil; it is typically the result of reactivation of chronic *Toxoplasma gondii* infection due to changes in cellular immunity [1,2]. Cerebral toxoplasmosis is currently the third-most prevalent AIDS-defining illness in Brazil, after tuberculosis and *Pneumocystis jirovecii* pneumonia [2]. An estimated 30% to 50% of HIV-seropositive individuals infected with *T. gondii* develop cerebral toxoplasmosis, which also has a high mortality [3,4].

* Corresponding author.
E-mail addresses: gabibrito@hotmail.com (G.B. de Oliveira), almerice@cpam.joicruz.br (M.A.L. da Silva), leandrowanderley@gmail.com (L.B. Wanderley), carolinadac@cpam.joicruz.br (C. da Cunha Correia), brandaoec@cpam.joicruz.br (E.C.B. Ferreira), medeiros@cpam.joicruz.br (Z.M. de Medeiros), joseluiz0@gmail.com (J.L.L. Filho), fabiolo@cpam.joicruz.br (F.L. de Melo), pserra@gmail.com (P.S.R. de Araújo), alfredohms@hotmail.com (A.H.C.M. Santos).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.clineuro.2016.08.014>
0303-8467/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.