

Rafael Tonini Mesquita

Diagnóstico molecular da toxoplasmose cerebral: comparação de diferentes marcadores utilizados na PCR para detecção de *Toxoplasma gondii* em pacientes com aids.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador: Profa. Dra. Vera Lucia Pereira-Chioccola

São Paulo
2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Mesquita, Rafael Tonini

Diagnóstico molecular da toxoplasmose cerebral: comparação de diferentes marcadores utilizados na PCR para detecção de *Toxoplasma gondii* em pacientes com aids / Rafael Tonini Mesquita - São Paulo, 2010.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientadora: Vera Lucia Pereira-Chioccola

1. Toxoplasma 2. Toxoplasmose cerebral/diagnóstico 3. Reação em cadeia da polimerase

SES/CCD/CD-224/10

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus;

Aos meus pais, Armando e Bernardete, e minha irmã Juliana, pelo amor, paciência e incentivo;

À Ângela Piccoli Ziegler pelo amor, apoio, incentivo e por fazer parte da minha vida;

À Prof^a. Dr^a. Vera Lucia Pereira-Chioccola pela confiança, incentivo, orientação e dedicação;

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela oportunidade em aprimorar meus conhecimentos;

Ao Prof. Dr. Roberto Mitsuyoshi Hiramoto pela amizade, por compartilhar conhecimentos, pelo apoio, e, incentivo;

Ao Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo pelo fornecimento da cepa RH de *T. gondii*;

A Seção de Toxoplasmose do Instituto Adolfo Lutz pelo apoio na realização das RIFI;

Ao Laboratório de Biologia Molecular da Virologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, especialmente a Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Domingues da Silva Fink pelo apoio e por nos permitir o uso do *ABI 7300 Real-time PCR System*;

Ao Laboratório de Biologia Molecular do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, especialmente ao Prof. Dr. Hélio Hehl Caiaffa Filho por permitir a utilização do *ABI 7300 Real-time PCR System*;

Aos pesquisadores, Elisabeth Visone Westphalen, Sansão Westphalen, Massami Kawarabayashi e Prof. Dr. Antonio Marcos de Aparecida Levy pela amizade, apoio, por compartilharem conhecimento e pelo incentivo;

Aos meus amigos do laboratório de biologia molecular, Cida Perez, Margarete, Thaís Alves, Isabelle Martins, Cristina Meira, Jeferson Rodrigues e Fábio Colombo pela amizade, por compartilharem conhecimento, companheirismo e momentos de descontração;

À Prof^a. Dr^a. Rosângela Rodrigues (IAL-SP), Prof^a. Dr^a. Thelma Suely Okay (IMT-USP), Prof. Dr. José Ernesto Vidal Bermudez (HC-USP), integrantes da banca de qualificação, e, Prof^a. Dr^a. Maria Helena Matté (FSP-USP) integrante da banca de defesa, pelas sugestões oferecidas para o enriquecimento deste trabalho;

Aos funcionários e aprimorandos do Serviço de Parasitologia e de Micologia do Instituto Adolfo Lutz pela amizade e companheirismo.

RESUMO

Introdução: A toxoplasmose cerebral é uma das lesões focais cerebrais de maior importância em pacientes com aids. Este estudo teve como objetivo aprimorar o diagnóstico molecular da toxoplasmose cerebral.

Métodos: Esta dissertação foi dividida em 2 partes: Uma retrospectiva, para PCR convencional (cnPCR), onde avaliou-se 2 marcadores moleculares de *T. gondii* (TG1-TG2 tendo como alvo um fragmento do gene B1 e TOX4-TOX5, um fragmento da região repetitiva de 529 pb); A outra, prospectiva, onde padronizou-se e validou-se 2 protocolos de PCR em tempo real qualitativa (qrtPCR) utilizando-se os marcadores B1TgF-B1TgR e RETgF-RETgR tendo como alvo, também, o gene B1 e o fragmento de 529 pb. Em ambas as etapas do estudo, o método controle foi a cnPCR utilizando-se o marcador B22-B23.

Resultados: Na primeira etapa foram analisadas 102 amostras de DNA extraídas de sangue provenientes de pacientes com aids e com diagnóstico clínico já estabelecido. Destes, 66 possuíam toxoplasmose cerebral e 36, outras infecções oportunistas. Comparando os resultados dos 2 marcadores estudados com o B22-B23, obtiveram-se sensibilidades de 95.5%, 93.9% e 89.3%; especificidades de 97.2%, 88.9% e 91.7% para B22-B23, TG1-TG2 e TOX4-TOX5 respectivamente. A associação de pelo menos 2 marcadores aumentou a sensibilidade e especificidade. Os índices de concordância entre 2 marcadores variou de 83.3% a 93.1%. Apesar de todos os marcadores apresentarem boa sensibilidade na detecção de *T. gondii*, B22-B23 ainda foi o melhor. A associação de 2 marcadores aumentou a sensibilidade, porém demandou mais tempo e custo. Na segunda parte foram analisadas 149 amostras de DNA extraídas de sangue e líquido cefalorraquidiano provenientes de pacientes com aids, e achados clínicos e radiológicos conhecidos. O diagnóstico laboratorial incluiu cnPCR (B22-B23), imunofluorescência indireta e duas qrtPCR (B1Tg e RETg) com o sistema *TaqMan probe FAM dye-labeled*. A sensibilidade foi de 98%, 86% e 98%; a

especificidade de 97%, 97% e 88.8% para os marcadores B22-B23 (cnPCR) e B1Tg e RETg respectivamente.

Conclusões: O marcador RETg foi o mais sensível na qrtPCR pois amplifica um fragmento que é repetido 200-300 vezes no genoma de *T. gondii* ao passo que o gene B1 apresenta-se em menor número de cópias, 35 vezes. Contudo sua especificidade foi menor que B1Tg. Ainda que a qrtPCR permita um rápido diagnóstico laboratorial, alguns casos ainda apresentam discrepância entre os resultados da cnPCR. Assim, sugere-se que ambas as metodologias sejam mantidas na rotina do diagnóstico molecular da toxoplasmose.

ABSTRACT

Introduction: Cerebral toxoplasmosis is one of the most important cerebral focal lesions in aids patients. This study aimed to improve the molecular diagnosis of cerebral toxoplasmosis.

Methods: The present study was divided into 2 parts: a retrospective one, for conventional PCR (cnPCR), which evaluated 2 molecular markers of *T. gondii* (TG1-TG2 targeting a fragment of the gene B1 and TOX4-TOX5, a fragment of the repetitive area of 529 pb). The other, a prospective part, which standardized and validated 2 protocols of PCR in qualitative real time (qrtPCR). For this purpose, the markers used were B1TgF-B1TgR and RETgF-RETgR targeting the gene B1 and the fragment of 529 pb. In both phases of the study, the method control was the cnPC, using the B22-B23 marker.

Results: In the first phase, 102 samples of DNA extracted from blood of patients with AIDS with a clinical diagnosis already established were analyzed. Of these, 66 had cerebral toxoplasmosis and 36, other opportunistic infections. Comparing the results of the 2 markers studied with B22-B23, sensibilities of 95.5%, 93.9% and 89.3% and specificities of 97.2%, 88.9% and 91.7% for B22-B23, TG1-TG2 and TOX4-TOX5, respectively, were obtained. The association of at least 2 markers increased the sensibility and specificity. The agreement indexes among 2 markers varied from 83.3% to 93.1%. The combination of 2 markers increased the sensitivity, but demanded more time and cost. In the second part, we analyzed 149 samples of DNA extracted from blood and CSF of patients with AIDS, and clinical and radiological findings known. Laboratory diagnosis included CNPR (B22-B23), indirect immunofluorescence and two qrtPCR (B1Tg and RETg) systems with the TaqMan probe FAM dye-labeled. Sensitivity was 98%, 86% and 98% and specificity, 97%, 97% and 88.8% for the primers B22-B23 (CNPR) and B1Tg and RETg, respectively.

Conclusions: The RETg marker was the most sensitive one in the qrtPCR because it amplifies a fragment that is repeated 200-300 times in the genome of *T. gondii* while the gene B1 comes in smaller number of copies, 35 times. However, its specificity was smaller than B1Tg. Although the qrtPCR allows a fast laboratorial diagnosis, some cases still present discrepancies concerning cnPCR results. Thus, it is suggested that both methodologies be kept in the routine of molecular diagnosis of toxoplasmosis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- aids** - “Acquired Immunodeficiency Syndrome” (Síndrome da imunodeficiência adquirida)
- °C** - Grau Celsius
- CDC** - “Centers for Disease Control and Prevention” (Centro para controle e prevenção de doenças)
- CD4+** - “Cluster of Differentiation 4” (Grupamento de diferenciação 4)
- cnPCR** - “Conventional PCR” (PCR convencional)
- DNA** - “Deoxyribonucleic Acid” (Ácido desoxirribonucléico)
- D.O.** - Densidade ótica
- EDTA** - Ácido etilenodiamino tetra - acético
- ELISA** - “Enzyme-linked immunosorbent assay” (Teste Imunoenzimático)
- et al.** - e outros
- g** - Aceleração da gravidade
- HAART** - “Highly active antiretroviral therapy” (Terapia anti-retroviral altamente eficaz)
- HCl** - Ácido clorídrico
- HIV** - “Human Immunodeficiency Virus” (Vírus da imunodeficiência humana)
- IgG** - Imunoglobulina da classe G
- IgM** - Imunoglobulina da classe M
- IIER** - Instituto de Infectologia Emílio Ribas
- LCR** - Líquido cefalorraquidiano
- LEMP** - Leucoencefalopatia multifocal progressiva
- ml** - Mililitro (10^{-3} l)
- mM** - Milimolar (10^{-6} M)
- nm** - Nanômetro (10^{-9} m)
- pb** - Pares de base
- PCR** - “Polymerase Chain Reaction” (Reação em cadeia da polimerase)
- PCR RFLP** - “Restriction fragment length polymorphisms” (Polimorfismo de comprimento de fragmentos de DNA gerados por enzima de restrição)
- pH** - Concentração de hidrogênio iônico
- qrtPCR** - “Quantitative real-time PCR” (PCR quantitativa em tempo real)

RIFI - Reação de imunofluorescência indireta

SNC - Sistema nervoso central

T. gondii - *Toxoplasma gondii*

μl - Microlitro (10^{-6} l)

μm - Micrômetro (10^{-6} m)

UV - Luz Ultravioleta

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1: Resultados da metodologia da cnPCR em 102 amostras de DNA de pacientes com aids do IIER (2008-2009).....	52
Tabela 2: Índice de concordância entre os 3 marcadores para a detecção de <i>T. gondii</i>	53
Tabela 3: Diagnóstico molecular da toxoplasmose cerebral em 149 pacientes com aids, utilizando os marcadores B22-B23 (cnPCR), B1Tg e RETg (qrtPCR): sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo.....	57
Tabela 4: Informações clínicas e laboratoriais de pacientes com aids e toxoplasmose cerebral (pacientes 1 a 4) ou outras infecções oportunistas (pacientes 5 a 8) com amostras de sangue e LCR colhidas no mesmo momento.....	59
Figura 1: Ciclo de transmissão de <i>Toxoplasma gondii</i>	14
Figura 2: Fragmentos do genoma de <i>T. gondii</i> , de onde foram sintetizados os marcadores e as sondas <i>TaqMan FAM dye-labeled</i> : (A)-Seqüência parcial do gene B1 com 2214 pb (GenBank AF 179871), onde o marcador B1TG esta localizado entre os nucleotídeos 664 e 747; (B)-Região repetitiva de 529 pb (GenBank AF146527), onde o iniciador RETG está localizado entre os nucleotídeos 270 e 334.....	42
Figura 3: Produtos de PCR amplificados em três diferentes regiões alvo do gene B1 de <i>Toxoplasma gondii</i> , com os iniciadores B22-B23 (A); TG1-TG2,	

(B); e TOX4-TOX5 (C). Controle da reação (β 1- β 2) (D) que amplificam um fragmento β -globulina humano. Coluna 1, padrão de massa molecular - 100 pb; Coluna 2, controle negativo (água); Coluna 3, amostra clínica proveniente de um paciente negativo para toxoplasmose; Coluna 4, amostra clínica proveniente de um paciente com toxoplasmose cerebral.....50

Figura 4: Resultado da qrtPCR utilizando o marcador B1Tg: amostra “Bc” (cor verde), controle negativo (usando água como amostra) não gera sinal de fluorescência (Ct *Undetected*); amostra “RH” (cor laranja), controle positivo (com DNA extraído da cepa RH de *T. gondii*) e gera pico de fluorescência no 20º ciclo da qrtPCR (Ct 20,06) sendo a maior carga parasitária da reação; amostra “497” (cor preta), amostra clínica de paciente com toxoplasmose cerebral, pico no ciclo 30º (Ct 30,14); amostra “495” (cor azul), amostra clínica de paciente sem toxoplasmose, pico inespecífico no final da reação (Ct 37,23).....55

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	9
1.1. Epidemiologia da toxoplasmose.....	9
1.2. Histórico	10
1.3. Agente etiológico.....	10
1.4. Ciclo biológico	12
1.5. Toxoplasmose humana	13
1.5.1. Toxoplasmose adquirida em imunocompetentes	15
1.5.2. Toxoplasmose ocular	15
1.5.3. Toxoplasmose congênita	16
1.5.4. Toxoplasmose em imunodeprimidos.....	18
1.5.4.1. Epidemiologia da toxoplasmose cerebral.....	20
1.6. Diagnóstico laboratorial da toxoplasmose.....	21
1.6.1. Diagnóstico parasitológico	21
1.6.2. Diagnóstico imunológico	22
1.6.3. Diagnóstico molecular	23
1.6.3.1. PCR convencional (cnPCR)	23
1.6.3.2. PCR quantitativa em tempo real (qrtPCR)	27
2. OBJETIVOS	33
2.1. Objetivo geral	33
2.2. Objetivos específicos	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1. Amostras clínicas	34
3.1.1. Diagnóstico clínico da toxoplasmose cerebral	35
3.1.2. Quantidade e obtenção	35
3.2. Multiplicação e manutenção de <i>T. gondii</i>	37
3.3. Extração de DNA	38
3.3.1. Em sangue	38
3.3.2. Em LCR.....	39
3.3.3. Em taquizoítos de <i>T.gondii</i>	40
3.4. Seleção das regiões alvo de <i>T.gondii</i> e dos marcadores.....	40
3.4.1. Marcadores para cnPCR.....	41

3.4.2. Marcadores para qrtPCR	41
3.5. Reação em cadeia de polimerase	43
3.5.1. cnPCR	43
3.5.2. qrtPCR	44
3.6. Eletroforese em gel de agarose	45
3.7. RIFI	45
3.7.1. Preparo de antígeno	45
3.7.2. Ensaio	46
3.8. Análise de dados	47
3.8.1. Na cnPCR	47
3.8.2. Na qrtPCR	48
3.8.3. Aprovação de comitês de ética e científico	48
4. RESULTADOS	49
4.1. Eficácia dos marcadores TG1-TG2 e TOX4-TOX5 para cnPCR no diagnostico da toxoplasmose cerebral	49
4.1.1. Sensibilidade e especificidade dos marcadores	51
4.2. Validação da qrtPCR no diagnostico da toxoplasmose	54
4.2.1. Sensibilidade e especificidade dos marcadores B1Tg e RETg	56
4.2.2. Situações laboratoriais observadas toxoplasmose cerebral	58
5. DISCUSSÃO	60
6. CONCLUSÕES	67
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
8. ANEXOS	88
8.1. Parecer da Comissão de Ética do Instituto Adolfo Lutz	88
8.2. Parecer da Comissão de Ética da Faculdade de Medicina de São Jose do Rio Preto	89
8.3. Aprovação no Concelho Técnico Cientifico do Instituto Adolfo Lutz	90

1. INTRODUÇÃO

1.1. Epidemiologia da toxoplasmose

Toxoplasma gondii é um protozoário pertencente ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, subclasse Coccidia, ordem Eucoccidia (Levine *et al.*, 1980). Trata-se de um parasita intracelular obrigatório, causador de toxoplasmose, uma zoonose de ampla distribuição mundial. Esta dispersão apresenta diferenças em função de fatores geográficos, clima, hábitos culturais, alimentares e sociais (Dubey & Frenkel, 1972; Remington *et al.*, 2001).

Este parasita possui a capacidade de infectar diversas espécies de vertebrados como aves e morcegos, herbívoros, carnívoros, animais oceânicos (como as baleias) e o homem (Carruthers, 2002; Montoya & Liesenfeld, 2004). Somente nos felídeos observa-se a multiplicação parasitária por processo sexual, pois os mesmos são os únicos hospedeiros definitivos. Os demais animais, inclusive o homem, são considerados apenas como hospedeiros intermediários, onde ocorre somente a multiplicação parasitária assexuada (Bushrod, 2004).

Os felídeos são importantes na epidemiologia da toxoplasmose, uma vez que, ao ingerirem um único parasita viável tornam-se fonte de disseminação da infecção. São responsáveis pela contaminação do meio ambiente através da eliminação de milhares de oocistos que permanecem viáveis por longos períodos de tempo, e, acabam por ser ingeridos por herbívoros e outros animais que desenvolvem a infecção na forma de cistos em seus tecidos (Dubey, 1996; Hill *et al.*, 2005).

A toxoplasmose acomete aproximadamente cerca de dois bilhões de pessoas no mundo (Tenter *et al.*, 2000; Montoya & Liesenfeld, 2004; Pappas *et al.*, 2009). A maioria dos indivíduos infectados não apresenta sintomas. Estima-se que 80% a 90% de pessoas infectadas apresentam a forma assintomática, podendo resultar em infecção crônica com latência dos

parasitas dentro de cistos teciduais por toda a vida (Dubey, 1996; Tenter *et al.*, 2000; Hill & Dubey, 2002). A reativação destes cistos pode ocorrer em indivíduos que apresentam algum tipo de imunossupressão. Neste caso, a doença torna-se grave com manifestações, tais como a encefalite.

A infecção por *T. gondii* é a maior causa de morbidade e mortalidade em crianças infectadas congenitamente e pacientes imunocomprometidos incluindo pacientes com aids (Síndrome da imunodeficiência adquirida) (Luft & Remington, 1992; Dubey, 1996; Hill & Dubey, 2002). Outra manifestação importante é retinocoroidite, que pode ter origem congênita ou resultar da infecção aguda ou reativação (Tenter, 2000).

1.2. Histórico

T. gondii foi descoberto por Alfonso Splendore em Julho de 1908, parasitando um coelho de laboratório em São Paulo, Brasil. Na mesma época, no Instituto Pasteur da Tunísia, os pesquisadores Nicolle e Manceaux descreveram um microorganismo similar ao descrito por Splendore, em células mononucleares do baço e do fígado de um roedor norte-africano denominado *Ctenodactylus gondii*. Os casos humanos foram descobertos em 1923 por Janku na antiga Tchecoslováquia, e em 1927 por Magarinos Torres no Brasil. Ambos classificaram o parasita como *Encephalitozoon* (Rey, 2001).

1.3. Agente etiológico

Existem três estágios infectantes de *T. gondii*: os taquizoítos (livres), os bradizoítos (em cistos teciduais) e os esporozoítos (em oocistos) (Dubey, 1996). As três formas evolutivas apresentam as organelas citoplasmáticas que são características do filo Apicomplexa e constituem o complexo apical:

conóide, anel polar (em número de dois), microtúbulos subpeliculares, roptrias, micronemas e grânulos densos (Dubey *et al.*, 1998).

O termo “taquizoíto” foi utilizado por Frenkel (1973) e corresponde ao estágio de rápida multiplicação que ocorre em qualquer célula do hospedeiro intermediário e nas células epiteliais do hospedeiro definitivo (Rondanelli *et al.*,1986). Os taquizoítos invadem as células por penetração ativa e, após replicações se disseminam pela corrente sangüínea infectando outros tecidos, como os do sistema nervoso central (SNC). Apresentam formato de meia lua e medem cerca de 6 μm de comprimento por 2 μm de largura (Dubey *et al.*,1988; Dubey,1991; Montoya & Liesenfeld, 2004).

Durante a invasão celular é formada uma membrana de proteção chamada de vacúolo parasitóforo. Esse vacúolo impede a fusão dos lisossomos, permite a diferenciação de taquizoítos em bradizoítos, e, quando necessário, subsidia a transformação em cisto. (Gross *et al.*,1996).

Os cistos teciduais medem de 20 a 200 μm e contém centenas de bradizoítos, que são morfologicamente similares aos taquizoítos. Diferem na velocidade de multiplicação (que é mais lenta), na localização do núcleo, que está na parte posterior do parasita, pelo seu alto índice de micronemas e grânulos de amilopectina, e, por seu tamanho (bem menor do que o taquizoíto). Persistem dentro dos cistos por toda a vida do hospedeiro e são mais resistentes à tripsina ou a pepsina que os taquizoítos (Gross *et al.*,1996; Montoya & Liesenfeld, 2004).

Os oocistos são formas resultantes do ciclo sexuado e somente ocorrem no trato gastrointestinal dos felídeos. Medem em torno de 10 μm por 12 μm e são eliminados pelas fezes dos gatos ainda não esporulados. São as formas de resistência no meio ambiente e tornam-se infectantes após a esporulação que ocorre de um a 21 dias de acordo com as condições ambientais. Os oocistos esporulados contêm dois esporocistos que abrigam em seu interior quatro esporozoítos cada. Os esporozoítos medem, em média, cerca de 2 μm por 6 μm . Os oocistos esporulados podem permanecer viáveis no meio ambiente por um período de até 18 meses

(Dubey *et al.*, 1998; Montoya & Liesenfeld, 2004; Kravetz & Federman, 2005).

1.4. Ciclo biológico

T. gondii apresenta um complexo ciclo de vida, descrito somente em 1972 (Dubey & Frenkel, 1972), quando se descobriu que os hospedeiros definitivos são membros da família Felidae, incluindo os gatos domésticos. Os demais animais de sangue quente (mamíferos ou aves) servem como hospedeiros intermediários (Dubey, 1996). O ciclo de vida alterna entre um hospedeiro intermediário, onde ocorre o estágio assexuado, e um hospedeiro definitivo (felídeos) que alberga o estágio sexuado.

A infecção no hospedeiro intermediário se dá pela ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cistos; ou água e alimentos contaminados por oocistos secretados nas fezes de gatos infectados, e, mais raramente através de inoculação de taquizoítos através da via sanguínea (Dubey, 1996; Hill & Dubey, 2002; Montoya & Liesenfeld, 2004). Quando ocorre a ingestão dos oocistos, os esporozoítos são liberados invadindo as células epiteliais transformando-se em taquizoítos de replicação rápida que se disseminam pela corrente sanguínea invadindo células nucleadas, caracterizando a fase aguda da infecção. Com aproximadamente 60-90 dias, a infecção torna-se crônica. Os taquizoítos se diferenciam em bradizoítos, que se dividem mais lentamente e formam cistos em diversos tecidos, como cerebral, cardíaco e músculos em geral, permanecendo lá por meses, anos e décadas (Dubey & Frenkel, 1972). A infecção latente pode ser reativada em pacientes cronicamente infectados que apresentam imunossupressão. Neste caso pode ocorrer a ruptura dos cistos e proliferação dos taquizoítos (Dubey, 1996; Dubey *et al.*, 1998; Suzuki, 2002).

Quando os cistos teciduais são ingeridos pelo hospedeiro definitivo, as paredes císticas são dissolvidas pelas enzimas proteolíticas localizadas no estômago e intestino delgado para a liberação de bradizoítos. A seguir,

penetram no epitélio intestinal iniciando o desenvolvimento de múltiplas gerações de ciclos sexuais e assexuais (Dubey & Frenkel, 1972). O assexual (esquizogonia) ocorre nas células do epitélio intestinal dando origem aos esquizontes. Dos esquizontes são liberados merozoítos, que após várias gerações se diferenciam em macrogametas e microgametas (gametogonia) dando origem ao zigoto. Posteriormente dará origem ao oocisto, completando o ciclo sexuado (Hill, 2005). Os oocistos são liberados imaturos para o meio ambiente por um curto período (1-2 semanas) na vida do gato (Dubey, 1988). Estes esporulam no meio ambiente entre 1 e 21 dias, formando no seu interior dois esporocistos cada um com quatro esporozoítas podendo sobreviver por meses ou até anos em ambiente favorável (Hill & Dubey, 2002; Montoya & Liensefield, 2004).

1.5. Toxoplasmose humana

T. gondii é um parasita dotado de alta infectividade e de baixa patogenicidade em humanos. Diversos fatores podem influenciar na gravidade da doença, entre eles podemos citar a fonte de infecção (cistos, oocistos ou taquizoítos), o tamanho do inóculo, a linhagem da cepa e o estado imunológico do hospedeiro (Hill & Dubey, 2002).

A transmissão do parasita na espécie humana ocorre basicamente pela ingestão de água e alimentos (como frutas e verduras mal lavadas) contaminados com oocistos e pela ingestão de cistos presentes na carne crua ou mal cozida (Hill & Dubey, 2002).

Outras formas de transmissão podem ocorrer pela amamentação, durante a fase aguda da infecção; por via transplacentária, durante a primoinfecção aguda materna, por transplante de órgãos, principalmente coração, rins, fígado e medula óssea; transfusão sanguínea e seus derivados; e através de inoculação acidental em acidentes laboratoriais.

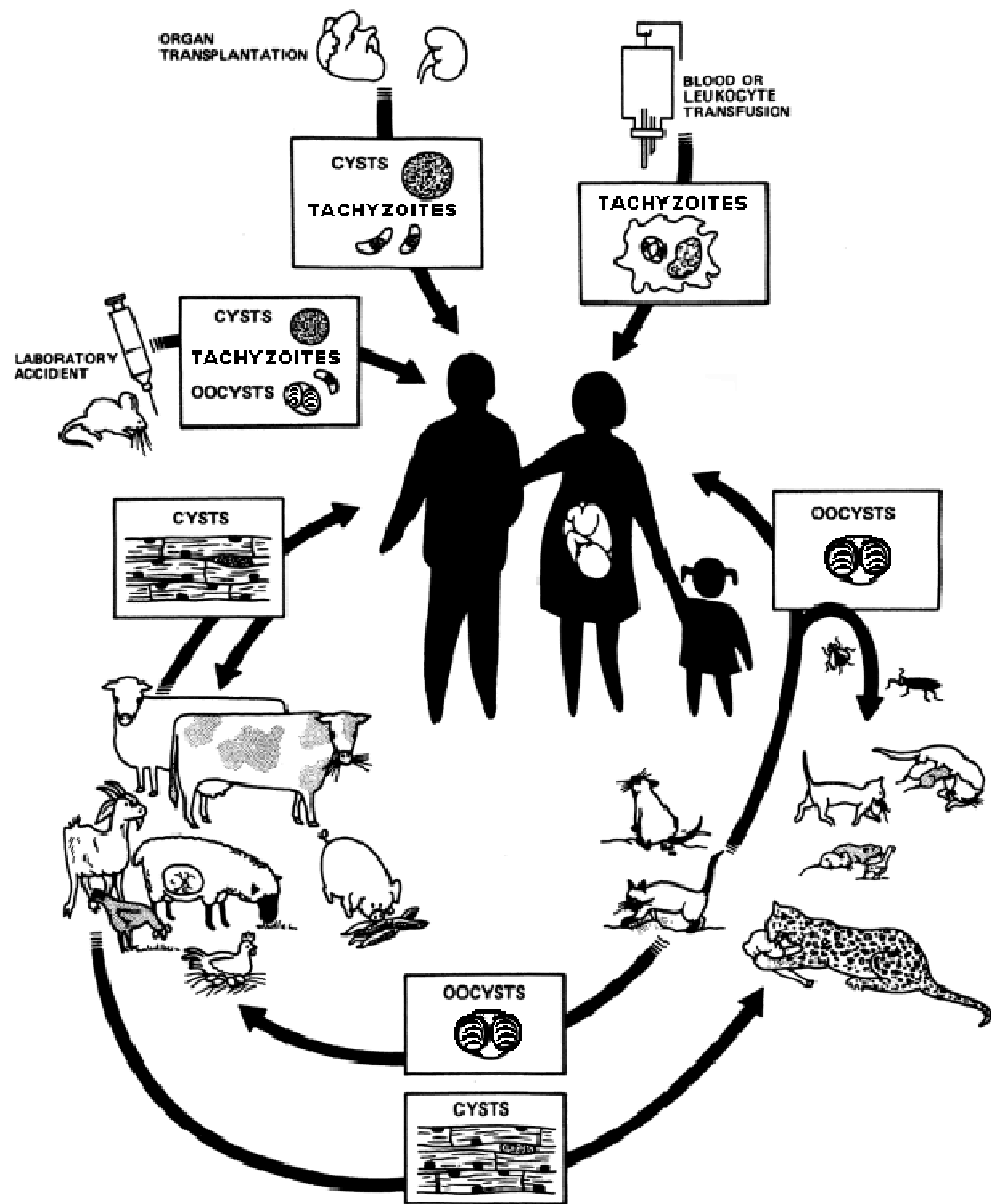


Figura 1: Ciclo de transmissão do *Toxoplasma gondii*.

Fonte: <http://www.medscape.com/content/2004/00/47/24/472409/art-ninr472409.fig2.gif>

Portanto a toxoplasmose pode ser dividida em quatro formas clínicas (Amato Neto *et al.*,1995; Remington *et al.*,1995):

- Toxoplasmose adquirida, em pacientes imunocompetentes;
- Toxoplasmose ocular, conseqüente a coriorretinite adquirida por via congênita (ou adquirida no período pós-natal);
- Toxoplasmose congênita;
- Toxoplasmose adquirida e reativada em indivíduos imunodeprimidos.

1.5.1. Toxoplasmose adquirida em imunocompetentes

A maioria dos casos de infecção por *T. gondii* é assintomática com evolução clínica benigna (Remington, 2004). A manifestação mais comum é linfadenopatia que acomete 10 a 20% destes indivíduos podendo ser acompanhada de febre, astenia e mialgia (Montoya & Liesenfield, 2004). Em alguns casos, pode ocorrer acometimento neurológico secundário causando encefalite ou meningoencefalite, com sintomas inespecíficos (Khan *et al.*, 1997), miocardites, pneumonites, polimiosites e hepatites (Montoya & Liesenfield, 2004). Alguns destes indivíduos podem desenvolver a doença ocular (Roberts & McLeod, 1999).

1.5.2. Toxoplasmose ocular

Esta forma é uma das mais importantes causas mundiais de uveítes posteriores (retinocoroidite) (Tenter, 2000). Pode ser de origem congênita com manifestações clínicas precoces ou tardias, ou ainda ser adquirida após o nascimento como resultado da infecção aguda ou reativação. A manifestação ocular mais comum é a retinocoroidite granulomatosa necrotizante que pode vir acompanhada de outras alterações oculares (Glasner, 1992; Montoya & Remington,1996). O diagnóstico é presuntivo,

baseando-se na análise clínica, testes sorológicos, PCR (Reação em cadeia da polimerase) e exclusão de outras doenças como sífilis, citomegalovírus, toxocaríase e outras (Montoya *et al.*, 1999).

1.5.3. Toxoplasmose congênita

É caracterizada pela transmissão do parasita ao feto via placentária quando a mulher desenvolve infecção primária durante a gestação. A parasitemia é temporária e raramente observam-se sintomas (Hill *et al.*, 2005). Quando a mãe se infecta num período anterior à concepção, os anticorpos são formados e dificilmente o feto será infectado (Kravetz & Federman, 2005). As infecções fetais têm seqüelas imprevisíveis. No entanto a gravidade das seqüelas pode ser prevenida ou reduzida com o tratamento da mãe durante a gravidez (Pinon *et al.*, 2001; Montoya & Liesenfeld, 2004).

A frequência e a gravidade da doença dependem da idade gestacional (Remington *et al.*, 2001). As conseqüências mais graves ocorrem quando a infecção ocorre no primeiro e segundo trimestre, o que pode levar a morte do feto no útero, aborto espontâneo ou seqüelas graves. Quando a infecção acontece no terceiro trimestre, normalmente, resulta em recém nascidos assintomáticos (Burg, 1988; Lin *et al.*, 2000; Bichara & Pova, 2001; Jones *et al.*, 2001; Montoya & Liesenfeld, 2004).

Os achados mais comuns são icterícia, hepatoesplenomegalia, danos oculares, neurológicos ou morte prematura. Estas, também, podem aparecer anos mais tarde, durante a infância e a adolescência (Holfeld *et al.*, 1994; Jenun *et al.*, 1998; Bushrod, 2004). As manifestações clínicas incluem hidrocefalia, microcefalia, coriorretinite, estrabismo, cegueira, epilepsia, retardo mental e anemia. A tríade clássica ou “Síndrome de Sabin”, composta de coriorretinite, hidrocefalia e calcificações cerebrais, é rara (Remington & Klein, 1995; Jones *et al.*, 2001; Montoya & Liesenfeld, 2004). Porém, nenhum desses sinais descritos em recém nascidos é

patognômico para toxoplasmose congênita e podem ser confundidos por infecções congênicas por outros agentes, como citomegalovírus, herpes, rubéola e sífilis (Montoya & Liesenfeld, 2004).

O diagnóstico precoce assim como o tratamento antiparasitário da mãe são capazes de reduzir a taxa de transmissão para o feto e, por consequência, o número de seqüelas (Hohlfeld *et al.*, 1989). Alguns estudos mostram que 50 a 80% das mulheres brasileiras em idade fértil exibem anticorpos IgG anti-*T. gondii*. Por conseguinte, 20 a 50% delas são susceptíveis à infecção (Nóbrega & Karnikowski, 2005). No Estado de São Paulo (região metropolitana) estima-se que 65% das mulheres em idade fértil exibem anticorpos IgG anti-*T. gondii*, e que a incidência anual varia entre 9,5 a 10,5 a cada 1000 partos (Fernandes *et al.*, 2009).

O diagnóstico pré-natal da toxoplasmose congênita se baseia em exames de ultra-sonografia, amniocentese e análise de amostras de sangue da gestante e do feto (Hohlfeld *et al.*, 1994).

O diagnóstico laboratorial é feito pela detecção de anticorpos das classes IgM e IgG por métodos como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), aglutinação (ISAGA) entre outros. Níveis de anticorpos IgG podem ser detectados 1 a 2 semanas depois da infecção e permanecem elevados indefinidamente. Os anticorpos IgM aumentam em dias e, usualmente permanecem elevados por 2 a 3 meses. A detecção de anticorpos IgG na mulher antes da gestação indica infecção anterior e portanto dificulta o risco de transferência congênita de taquizoítos (Kravetz & Federman, 2005). O teste de avidéz para anticorpos IgG tem sido utilizado para discriminar infecção recente e infecção tardia. Normalmente, é utilizado como teste confirmatório, quando usado em associação com outros testes sorológicos (Hedman *et al.*, 1989; Liesenfeld *et al.*, 2001).

A detecção de IgM em amostras de soro de neonatos é indicativo de infecção congênita, entretanto o teste deve ser repetido 10 dias após o nascimento para excluir a contaminação de anticorpos maternos (Sensini, 2006). Nos últimos anos a PCR no líquido amniótico foi adicionada ao

diagnóstico da toxoplasmose congênita (Grover *et al.*, 1990; Romand *et al.*, 2004; Cassaing *et al.*, 2006).

1.5.4. Toxoplasmose em imunodeprimidos

Indivíduos que já tiveram toxoplasmose, ainda possuem *T. gondii* em forma de cistos nos seus tecidos e que apresentem algum tipo de imunossupressão podem ter reativação da infecção causando uma doença neurológica grave. Normalmente, estas são causadas pelo uso de drogas como os transplantados, pacientes com doenças linfoproliferativas, ou, com deficiência na imunidade celular como os portadores do vírus da imunodeficiência humana, (Burg, 1988; Ferreira, 2000).

Ao contrário do curso favorável da toxoplasmose na maioria dos indivíduos imunocompetentes, a doença pode ser particularmente grave e muitas vezes fatal nestes grupos de pacientes (Liesenfeld *et al.*, 1999). A toxoplasmose cerebral é uma das mais comuns infecções neurológicas oportunistas em pacientes com aids causando significativa morbidade e mortalidade (Holliman, 1988; Luft & Chua, 2000; Lin *et al.*, 2000). Cerca de 95% da encefalite causada por *T. gondii* deve-se a reativação da infecção latente pela perda progressiva da imunidade celular (Luft & Remington, 1992). Esta reativação ocorre usualmente quando os pacientes apresentam menos de 200 células CD4+/mL de sangue (Porter & Sande *et al.*, 1992; Renold *et al.*, 1992; Luft *et al.*, 1993). Porém observa-se em cerca de 15% dos pacientes, reativação com níveis maiores de 200 células CD4+/mL de sangue (Vidal *et al.*, 2005; Pereira-Chiocola *et al.*, 2009).

A apresentação clínica da encefalite por *T. gondii* tem como quadro principal um processo subagudo mas também pode evoluir gradualmente para um estado de confusão mental aguda. No quadro clínico observa-se também uma variedade de sinais e sintomas como cefaléia, hemiparesia, afasia, anomalias sensoriais e deterioração mental (Franzen *et al.*, 1997; Ferreira, 2000). Pode causar, ainda, necroses cerebrais com predileção das

lesões nos gânglios da base em ambos os hemisférios cerebrais (Luft & Remington, 1992; Pereira-Chiocola *et al.*, 2009).

Como os sintomas da toxoplasmose cerebral são similares a outras infecções oportunistas que comumente infectam estes pacientes imunocomprometidos, logo o diagnóstico não pode ser baseado somente em observações clínicas (Montoya & Liesenfeld, 2004). Até a década passada, o diagnóstico era complexo, pois os testes diagnósticos eram invasivos e pouco sensíveis e específicos. O diagnóstico definitivo exigia a demonstração do parasita no tecido cerebral (biópsia ou necropsia), porém, raramente era realizada devido aos riscos inerentes a métodos invasivos como a biópsia cerebral (Dupon *et al.*, 1995; Carruthers, 2002).

Atualmente, o diagnóstico presuntivo (provável ou sugestivo) estabelecido pelo “Centers for Disease Control” (CDC, 1993; Potergies *et al.*, 2004) baseia-se na presença de achados neurológicos compatíveis (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), reações sorológicas positivas (presença de anticorpos IgG contra *T. gondii*), e uma adequada resposta terapêutica ao tratamento anti-*T. gondii*.

Entretanto, os métodos diagnósticos por imagens podem revelar lesões focais no SNC que podem compartilhar características semelhantes a abscessos, tumores, linfomas ou outras infecções oportunistas do SNC em pacientes com aids (Franzen *et al.*, 1997; Ferreira, 2000). Testes sorológicos podem falhar na detecção de anticorpos das classes IgG ou IgM específicos anti-*Toxoplasma*, pois, nestes pacientes pode não ocorrer o aumento dos níveis de anticorpos (Lin *et al.*, 2000; Colombo *et al.*, 2005; Meira *et al.*, 2008; Pereira-Chiocola *et al.*, 2009). Assim, na prática de clínica médica o tratamento usualmente é iniciado quando se determina o diagnóstico presuntivo baseado em achados clínicos e radiológicos (Luft & Remington, 1992; Eggers *et al.*, 1995; Cohen, 1999; Bahia-Oliveira, 2003; Vidal *et al.*, 2005). Vários grupos têm adotado a inclusão da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando diferentes marcadores, e, mais recentemente a

PCR em tempo real (*Real-time PCR*) (Costa *et al.*, 2000; Homan *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2000; Buchbinder *et al.*, 2003; Jalal *et al.*, 2004; Hierl *et al.*, 2004; Vidal *et al.*, 2004; Cassaing *et al.*, 2006; Colombo *et al.*, 2005; Edvinsson *et al.*, 2006).

1.5.4.1. Epidemiologia da toxoplasmose cerebral

Antes da epidemia aids, a toxoplasmose cerebral era uma rara complicação que acometia principalmente pacientes transplantados renais (Harrison & McArthur, 1995).

No ano de 2007 existiam no mundo, segundo estimativas da UNAIDS (2008), em torno de 33 milhões de pessoas vivendo com o vírus do HIV, e destes, 2 milhões vieram a óbito naquele ano.

No Brasil, estimou-se em 2001 que aproximadamente 660 mil pessoas viviam com HIV, e, em 2007, este numero aumentou para 730 mil indivíduos. Em 2001 foram 9.400 óbitos, e, no ano de 2007, aproximadamente 15 mil óbitos (UNAIDS, 2008).

O país já acumulou cerca de mais de 205 mil óbitos devidos à aids até dezembro de 2007 (Ministério da Saúde, 2009). No início da epidemia da infecção pelo vírus do HIV, estimava-se que 25 a 50% dos pacientes com aids que apresentavam anticorpos IgG anti-*T. gondii* e menos de 200 células T CD4+/ μ L de sangue desenvolviam toxoplasmose cerebral. Tornou-se a causa mais comum de lesões expansivas intracranianas nestes pacientes (Burg, 1988; Beamon *et al.*, 1992; Oksenhendler *et al.*, 1994; Luft & Chua, 2000; Mamidi *et al.*, 2002). Foi a segunda infecção oportunista mais comum relacionada à aids, atrás apenas da pneumocistose, causada por fungos da espécie *Pneumocystis carinii*, e a primeira causa mais comum de doença no SNC (Holliman, 1988; Luft & Remington, 1992; Mamidi *et al.*, 2002).

A introdução de terapias anti-retrovirais altamente eficazes (HAART) levou a queda da incidência e óbitos associados à toxoplasmose cerebral em países desenvolvidos (Ammassari *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2000;

Sacktor, 2001). Porém, ocorreu discreta mudança na distribuição das doenças oportunistas definidoras de aids, incluindo a toxoplasmose cerebral. Muitos pacientes apresentam como primeira doença, a toxoplasmose cerebral e só após esta manifestação, são diagnosticados como aids. Como desconhecem que estão infectados pelo vírus HIV, não se beneficiaram do uso dos anti-retrovirais. (Ammassari *et al.*, 2000; Leport *et al.*, 2001; Manfredi & Chiodo, 2001; Gray & Keohane, 2003; Antinori *et al.*, 2004 ; Vidal *et al.*, 2005).

Atualmente, no Brasil, a toxoplasmose cerebral representa a doença que mais causa lesões expansivas intracranianas focais e a terceira doença definidora de aids (depois da tuberculose e da pneumonia por *Pneumocystis carinii*) (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003; Marins *et al.*, 2003; Vidal *et al.*, 2003; Ministério da Saúde, 2009). Apesar dos avanços obtidos nos últimos anos, a queda da prevalência foi inferior à observada em países desenvolvidos, apresentando-se aqui em torno de 50% (Vidal *et al.*, 2008).

1.6. Diagnóstico laboratorial da toxoplasmose

1.6.1. Diagnóstico parasitológico

A evidência do parasita no sangue ou em outros fluídos corporais é um indicativo de uma possível infecção aguda (Montoya & Liesenfeld, 2004). Técnicas de detecção direta do parasita são complexas e onerosas de serem realizadas, além de apresentarem baixa sensibilidade (Wong & Remington, 1993; Rey, 2001). Ainda, sabe-se que a parasitemia é detectável intermitentemente em alguns pacientes (Hofflin & Remington, 1985; Filice, 1993; Kompalic-Cristo, 2004).

Por ser um parasita intracelular obrigatório, a cultura *in vitro* é difícil de ser mantida, pois além de ser muito onerosa e necessitar de muito tempo para fornecer um resultado, acaba sendo efetiva em menos de 50% dos

casos. O isolamento do parasita pode ser feito mediante a inoculação em camundongos, sendo mais sensível, porém exigindo de três a seis semanas e manutenção dos animais em biotérios (Grover *et al.*,1990; Hitt & Filice, 1992; James *et al.*,1996; Lin *et al.*, 2000; Kupferschmidt *et al.*, 2001). A detecção de taquizoítos também pode ser obtida em cortes histológicos do cérebro, ou por esfregaços de líquidos corpóreos, porém a biópsia cerebral é um procedimento muito invasivo para uso em rotina (Dupouy-Camet *et al.*, 1993; Montoya & Liesenfeld, 2004).

1.6.2. Diagnóstico imunológico

Dentre os métodos indiretos de detecção de anticorpos, geralmente das classes IgG e IgM destacam-se a RIFI, considerada o teste padrão ouro, e ELISA. Ambos apresentam boa especificidade e sensibilidade nas fases aguda (pesquisa de anticorpos da classe IgM) e crônica (pesquisa de anticorpos da classe IgG). Normalmente, os antígenos utilizados nestas reações são extratos brutos de taquizoítos (Montoya & Lisenfeld, 2004).

Hedman *et al.* (1989) introduziram o teste ELISA-avidez de IgG com objetivo de diagnosticar uma infecção recentemente adquirida. Esta técnica baseia-se na força de interação entre o antígeno e o anticorpo (Hedman *et al.*, 1989; Joynson *et al.*, 1990; Cozon *et al.*, 1998).

Durante a resposta imune, o processo de maturação de anticorpos IgG é acompanhado pelo aumento de sua afinidade. Anticorpos de baixa avidez (30% ou menos) são produzidos em estágio precoce da infecção enquanto que anticorpos de alta avidez (60% ou mais) refletem infecção crônica. Apesar de uma baixa avidez nem sempre permitir a identificação de um caso recente de infecção, a alta avidez de IgG exclui infecções primárias com menos de 3 meses de duração (Joynson *et al.*,1990; Gutiérrez & Maroto, 1996).

Para a avaliação da avidez, verifica-se a maior ou menor facilidade com que os anticorpos são dissociados de complexos antigênicos

específicos. Essa dissociação resulta da ação de agentes desnaturantes de proteínas ou desestabilizantes de ligações de pontes de hidrogênio, utilizadas para diluir o soro teste ou adicionadas após a formação do complexo antígeno-anticorpo. O tratamento com uréia é considerado o mais simples e eficiente na medida da avidéz dos anticorpos IgG (Holliman *et al.*, 1994). É um método altamente sensível e específico na identificação de infecção primária aguda por *T. gondii* durante a gravidez (Jenum *et al.*, 1997).

Estes testes imunológicos são amplamente utilizados, mas apresentam limitações que impedem sua utilização de forma confiável na identificação de pacientes com reativação ou com risco de desenvolver toxoplasmose cerebral. Em alguns pacientes imunocomprometidos, os anticorpos específicos são dificilmente detectáveis, seja pelo motivo de que na fase aguda da infecção os níveis de IgM e IgG só possam ser detectados após algumas semanas de parasitemia, ou pelo fato de que em certos pacientes, os títulos destes anticorpos não aumentem à níveis de detecção (Franzen *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 2000; Joseph *et al.*, 2002).

1.6.3. Diagnóstico molecular

1.6.3.1. PCR convencional (cnPCR)

Nas últimas décadas destacou-se o surgimento de novas metodologias moleculares empregadas no diagnóstico microbiológico. Dentre elas destaca-se a PCR por permitir a amplificação de qualquer seqüência específica de DNA utilizando-se da propriedade da enzima *Taq*-polimerase (extraída da bactéria *Thermus aquaticus*) e de dois *primers* (oligonucleotídeos iniciadores) específicos à seqüência alvo desejada (um que irá sintetizar a seqüência alvo do DNA no sentido 3'-5' e outro para o sentido inverso isto é, 5'-3.'). A PCR pode ser dividida em três passos: i. A dupla fita DNA é separada em torno de 90°C; ii. Os *primers* “anelam” entre

50-60°C; e, iii. Ocorre a extensão da nova fita DNA entre 70-78°C (Mackay, 2004).

A sensibilidade da PCR depende de 3 fatores principais (Bastien *et al.*, 2008):

- Condições físico-químico da reação (temperatura de anelamento do marcador, concentração de Mg₂+Cl₂, concentração da Taq-polimerase, e, concentração do marcador);
- A concentração e a natureza DNA alvo (número de cópias do DNA alvo no genoma do microrganismo e concentração do DNA alvo presente na amostra);
- Seleção de marcadores (para o desenvolvimento dos marcadores é necessário conhecer o genoma do microrganismo ou pelo menos, parte dele e suas variações genéticas, pois é comum ocorrer mutações inesperadas que poderão interferir na sensibilidade).

Na pesquisa clínica de *T. gondii*, a introdução de tratamento anti-toxoplasma também influencia na sensibilidade da técnica (Pelloux *et al.*, 1998; Montoya e Liesenfeld, 2004; Maubon *et al.*, 2007; Bastien *et al.*, 2008).

Outros fatores secundários podem também influenciar na sensibilidade, como o risco de contaminação com produtos anteriormente amplificados, que levam a resultados falso-positivos (Mackay, 2004).

Quanto a degradação do DNA em amostras clínicas após sucessivos ciclos de congelamento e descongelamento, recomenda-se o congelamento de volumes maiores de que 1 ml. Em volumes inferiores recomenda-se conservar à 4°C por até 16 meses, e, quando adicionado tampão Tris-EDTA, este DNA torna-se estável por até 3 anos (evidenciando que à 4°C, o risco de contaminação da amostra é aumentado) (Bellete *et al.*, 2003).

Existem diversos métodos de extração de DNA de espécimes clínicas que variam desde uma simples fervura do material à extrações automatizadas em circuitos fechados que reduzem o risco de contaminações cruzadas e permitem obter grande reprodutibilidade. Substâncias que inibem a amplificação do DNA (como o heme presente no sangue) devem ser

removidas completamente durante a extração. O DNA extraído deve ser mantido em um pequeno volume em solução aquosa a fim de evitar a degradação e maximizar a sua detecção (Espy *et al.*, 2006).

Os métodos de extração do DNA realizados *in house* baseados na Proteinase K e fenol-clorofórmio parecem ser mais sensíveis do que os utilizados com *kits* comerciais baseados em guanidina principalmente quando existe pequena concentração de parasitas na amostra (Pelloux *et al.*, 1998; Lachaud *et al.*, 2001).

Grandes concentrações de DNA não específico e a proporção entre o volume de amostra de DNA e o volume PCR *master mix* são fatores que também influenciam nos resultados. Por exemplo, grandes concentrações de DNA humano podem diminuir a sensibilidade da PCR, pois este DNA influencia diretamente na quantidade de ions Mg^{2+} livre e na atividade enzimática da Taq polimerase (Bastien *et al.*, 2008). Sugere-se diluir a amostra a fim de evitar o excesso de DNA não específico ou de substâncias inibidoras. Porém, ao diluir o DNA não específico, dilui-se também o DNA alvo, diminuindo a sensibilidade da técnica (Flori *et al.*, 2002; Bastien *et al.*, 2008).

Existem diversos métodos de detecção dos produtos amplificados da PCR. Dentre eles incluem-se eletroforese em gel de agarose, *Southern blot*, e sistemas utilizando ELISA, porém todos permitem apenas obter dados qualitativos ou semi-quantitativos (Hohlfeld *et al.*, 1994; Mackay, 2004).

A *cnPCR* é um método útil para complementar o diagnóstico de toxoplasmose ativa pela sua alta sensibilidade e especificidade (Hohlfeld *et al.*, 1994; Guy & Joyson, 1995; Pelloux, *et al.*, 1998; Vidal *et al.*, 2004; Chandrasekar 2005; Colombo *et al.*, 2005). Revolucionou o diagnóstico pré-natal da toxoplasmose congênita, pois permitiu a realização de um diagnóstico precoce e menos invasivo para o feto (Montoya e Liesenfeld, 2004).

A detecção de *T. gondii* é utilizada com frequência em diferentes materiais biológicos como tecido cerebral, líquido cefalorraquidiano (LCR), lavado broncoalveolar, sangue, tecido hepático, líquido amniótico, líquido

pleural, líquido ascítico, urina e líquido ocular (Dupouy-Camet *et al.*, 1993; Hohlfeld *et al.*, 1994; Fuentes *et al.*, 1996; Franzen *et al.*, 1997; Costa *et al.*, 2000; Buchbinder *et al.*, 2003; Montoya e Liesenfeld, 2004; Chabbert *et al.*, 2004). Já foram descritos mais de 25 marcadores na detecção do DNA de *T. gondii*. As seqüências mais utilizadas têm como alvo o gene B1, que possui uma região repetitiva de 35 cópias no genoma de *T. gondii* (Burg *et al.*, 1989; Brindley *et al.*, 1993; Filisetti *et al.*, 2003; Chabbert *et al.*, 2004; Okay *et al.*, 2009). Em paralelo, alguns estudos relatam que a seqüência repetitiva do gene B1 apresenta sensibilidade variável quando utilizada em amostras extraídas de LCR (Franzen *et al.*, 1997; Montoya e Liesenfeld, 2004). Contudo, Vidal *et al.*, (2004) demonstraram sua alta capacidade de detectar amostras positivas em pacientes com aids e recém-natos.

Estudos realizados com objetivo de comparar sensibilidade de seqüências iniciadoras mostraram que as seqüências alvo B22-B23 do gene B1 apresentaram maior sensibilidade e especificidade comparada a outros marcadores alvo do gene B1, sendo estes, os mais recomendados para o diagnóstico em pacientes imunocomprometidos (Brindley *et al.*, 1993; Chabbert *et al.*, 2004).

Outro alvo muito utilizado do genoma de *T. gondii* é a seqüência de 529 pb que vem sendo descrita como muito mais sensível do que a seqüência do gene B1, pois é repetida de 200-300 vezes (Homan *et al.*, 2000).

Muito cuidado deve ser tomado ao se desenvolver novos marcadores, pois estes devem ser capazes de amplificar todas as cepas de *T. gondii*. Ainda que o gene B1 e o fragmento de 529 pb apresentem seqüências suficientemente conservadas para propósitos diagnósticos, a maioria dos marcadores descritos na literatura são desenvolvidos para serem complementares à cepa do tipo I de *T. gondii*. Contudo, a maioria dos parasitas isolados de líquido amniótico na França, pertence à cepa do tipo II (Reischl *et al.*, 2003). Edvinson *et al.* (2006) nos advertem em que novos trabalhos deveriam certificar-se de que a seqüência de 529 pb é complementar e conservada entre as diferentes cepas deste parasita.

Ferreira *et al.*, (2008) demonstraram que as cepas de *T.gondii* prevalentes no Brasil são altamente polimórficas, confirmando estudos prévios realizados na América do Sul.

Apesar da cnPCR ser muito utilizada no diagnóstico clínico microbiológico é um método realizado *in house*, portanto não é totalmente padronizada entre os diferentes laboratórios clínicos, o que gera resultados freqüentemente inconsistentes ainda que os métodos utilizados pareçam ser os mesmos (Apfalter *et al.*, 2005). Pelloux *et al.* (1998) investigaram a acurácia da cnPCR em 15 laboratórios europeus envolvidos no diagnóstico da toxoplasmose congênita, obtendo resultados inconsistentes devido principalmente a falta de padronização da técnica entre os mesmos.

Na pesquisa clínica de *T. gondii*, a comparação interlaboratorial é extremamente necessária, pois permite estabelecer qual método apresenta melhores resultados ou aperfeiçoar uma técnica já em uso. Porém, poucas publicações vêm sendo reportadas na literatura, o que impede a elaboração de um consenso, tornando difícil qualquer tentativa de padronização dos métodos diagnósticos moleculares deste parasita (Chabbert *et al.*, 2004).

1.6.3.2. PCR quantitativa em tempo real (qrtPCR)

Das metodologias baseadas na PCR desenvolvida nos últimos anos, destaca-se a PCR em tempo real (*Real-time PCR*, também conhecida como: *Real-time quantitative PCR*, *rapid-cycle real-time PCR*, *homogeneous PCR*, ou, *kinetic PCR*), que combina uma alta sensibilidade e especificidade com uma ótima forma de detecção dos produtos amplificados (Espy *et al.*, 2006).

Apresenta-se como uma reação de fácil preparo. Vem substituindo rapidamente a cnPCR no diagnóstico molecular microbiológico devido à sua alta velocidade, reproduzibilidade, baixo risco de contaminação e de erros na interpretação de resultados, e, a possibilidade de obter informação quantitativa (Jauregui *et al.*, 2001; Espy *et al.*, 2006; Bastien *et al.*, 2008).

A qrtPCR (*Real-time quantitative PCR*) vem sendo utilizada amplamente em todo o mundo no diagnóstico da toxoplasmose. Permite a quantificação do DNA do parasita na amostra, o que a torna muito útil no monitoramento de terapia anti-*T.gondii* (Costa *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2000; Homan *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2000; Edvisson *et al.*, 2004; Hierl *et al.*, 2004; Romand *et al.*, 2004; Cassaing *et al.*, 2006; Calderaro *et al.*, 2006; Maubon *et al.*, 2007).

Com a qrtPCR, o número de amostras “falso-positivos” devida à contaminação de produtos amplificados previamente diminui drasticamente, pois ao contrário da cnPCR onde os tubos com as amostras já amplificadas necessitam ser abertos afim de proceder-se a visualização de seus respectivos produtos amplificados, esta, funciona em um sistema fechado, não expondo de forma alguma seus produtos amplificados ao meio externo (Jauregui *et al.*, 2001; Costa *et al.*, 2002; Mackay, 2004; Espy *et al.*, 2006; Botterel *et al.*, 2008).

O princípio da qrtPCR baseia-se na detecção do DNA por fluorimetria, quando presente uma molécula fluorescente na reação. Este método permite uma análise cinética dos ciclos de amplificação da PCR, permitindo que os produtos amplificados sejam detectados em tempo real. Esta detecção só é possível graças a um agente intercalante do DNA, o *SYBR Green*, ou, a uma sonda marcada com fluoróforo específica da seqüência alvo (*oligonucleotide probes* ou *oligoprobes*). Estes agentes fluorescentes produzem uma mudança do sinal da fluorescência quando interagem ou hibridizam com os produtos amplificados. Este sinal é proporcional à quantidade de produtos amplificados durante cada ciclo (Mackay, 2004; Maubon *et al.*, 2007).

O *SYBR Green* detecta o acúmulo de qualquer dupla-fita de DNA na reação, e apesar de ter boa sensibilidade, não é específico. Justamente por esta pouca especificidade, este é muito utilizado em testes de triagem (Espy *et al.*, 2006). *SYBR Green* gera grande quantidade de fluorescência de “sinal de fundo” quando a amostra contém grande quantidade de DNA não específico. Este problema é resolvido com a diluição destas amostras, porém

isto acarreta em uma grande redução da sensibilidade da reação devido a resultados falso negativos (Bellete *et al.*, 2003).

Para se obter resultados com boa sensibilidade e especificidade na qrtPCR sugere-se fazer uso da tecnologia de sondas marcadas com fluoróforo. Esta tecnologia baseia-se no princípio da *FRET* (*fluorescence resonance energy transfer*) onde duas moléculas adjacentes, uma “doadora” (*reporter*) e uma “aceptora” (*quencher*) de fluorescência (presentes em uma sonda complementar a seqüência alvo) transferem energia sob a forma de luz fluorescente quando hibridizadas com a seqüência complementar. A fluorescência emitida é proporcional a concentração de produtos gerados pela qrtPCR (fragmentos específicos de DNA) e, é captada pelo sistema de *Real-Time PCR* de forma contínua. Assim, permite o acompanhamento em tempo real de todo o ciclo da reação. Quando não ocorre a hibridização, o *quencher*, não permite a emissão de fluorescência (Espy *et al.*, 2006; Maubon *et al.*, 2007).

Três formas de *FRET* são utilizadas com freqüência na microbiologia clínica: *5' nuclease* (*TaqMan probes*), *molecular beacons*, e *FRET hybridization probes* (Espy *et al.*, 2006).

A sonda *TaqMan* é composta de um pequeno oligonucleotideo (DNA) que contem um *reporter* em 5' e um *quencher* em 3'. Para gerar o sinal de luz (e remover o efeitos do *quencher* na molécula fluorescente) dois eventos devem ocorrer: A sonda deve se ligar a fita de DNA complementar a 60°C e a *Taq*-polimerase deve clivar a posição 5' da sonda *TaqMan* separando o *reporter* do *quencher* por atividade da 5' nuclease. As moléculas fluorescentes livres acumulam-se após cada ciclo da qrtPCR podendo ser detectadas durante qualquer momento, inclusive durante a etapa de hibridização (Espy *et al.*, 2006).

Molecular beacons possuem um *reporter* na posição 5' e um *quencher* na 3' da sonda, porém não necessitam da atividade 5' nuclease como no *TaqMan*. A região desenhada para ser o final da sonda é complementar com ela mesma, portanto a baixas temperaturas, o final da sonda anela-se com o início da mesma criando uma estrutura semelhante a

um “grampo de cabelo” (*hairpin structure*). A altas temperaturas, o produto amplificado e a sonda mantêm-se como fitas simples. Quando a temperatura da reação diminui a região central da sonda (que é complementar a região do produto a ser amplificado) liga-se ao produto amplificado e força a separação do *reporter* fluorescente do *quencher*, permitindo a detecção do sinal luminoso proveniente do *reporter*. Na ausência de produtos amplificados, a sonda volta a anelar com ela mesma, forçando o *quencher* contra o *reporter* e inibindo o sinal de fluorescência. Diferentemente do *TaqMan*, a detecção da fluorescência só ocorre durante a fase de hibridização da qrtPCR (Espy *et al.*, 2006).

FRET hybridization probes (também denominados *LightCycler probes*) são compostos de duas sondas desenvolvidas para anelarem-se próximas umas das outras no produto amplificado em uma configuração “*head-to-tail*” (ou seja, posição 5’ e 3’). A sonda na posição mais adiantada possui um *reporter* na posição 3’, e a segunda sonda, um *quencher* na 5’. Quando as duas sondas anelam-se ao produto amplificado, a fluorescência do *reporter* na 3’ é absorvida pelo *quencher* na posição 5’ que é excitado emitindo luz em um terceiro comprimento de onda que é detectado pelo sistema de qrtPCR. Esta detecção só é possível durante a fase de hibridização da reação. Se as duas sondas não anelarem-se ao produto específico, então não ocorrerá a *FRET* entre as mesmas, pois a distância entre estas será muito grande (Whiley *et al.*, 2001; Teo *et al.*, 2002; Espy *et al.*, 2006).

Em pacientes imunossuprimidos, gestantes e neonatos, o diagnóstico da toxoplasmose pela qrtPCR torna-se uma ferramenta de extrema valia, pois os diagnósticos alternativos como a cultura e testes imunológicos são difíceis de se interpretar nestes pacientes (Romand *et al.*, 2004; Calderaro *et al.*, 2006; Espy *et al.*, 2006).

Esta técnica está menos sujeita a variações por parte do usuário e suas inevitáveis conseqüências. Estas variações, são comuns na cnPCR, como o uso de marcadores diversos e de varias temperaturas de anelamento, e que sempre resulta em resultados heterogêneos entre

diferentes laboratórios. Devido a esta menor “otimização”, a qrtPCR possibilita a padronização entre diferentes laboratórios (Bellete *et al.*, 2003; Reischl *et al.*, 2003; Maubon *et al.*, 2007; Bastien *et al.*, 2008).

Atualmente estão descritos na literatura diversos pares de marcadores em uso na qrtPCR para detecção de *T. gondii*, tendo a maioria como alvo o gene B1 ou a seqüência de DNA repetitiva de 529 pb. Estes trabalhos descritos, utilizam em sua maioria, as técnicas de qrtPCR como *SYBR Green* e *FRET hybridization probes* (Flori *et al.*, 2002; Buchbinder *et al.*, 2003; Reischl *et al.*, 2003; Edvinsson *et al.*, 2004; Hierl *et al.*, 2004; Romand *et al.*, 2004; Cassaing *et al.*, 2006; Edvinsson *et al.*, 2006). Trabalhos utilizando a sonda *5' nuclease (TaqMan probes)* descritos para a detecção de *T. gondii* são escassos (Costa *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2000; Jauregui *et al.*, 2001; Calderaro *et al.*, 2006).

Existem divergências entre qual a melhor seqüência alvo para o diagnóstico laboratorial da toxoplasmose. Alguns autores preferem utilizar marcadores provenientes do gene B1, pois além deste ser repetido 35 vezes no genoma do parasita, tem se mostrado bastante sensível e conservado dentre as diferentes cepas de *T. gondii* (Lin *et al.*, 2000; Contini *et al.*, 2005). Recentemente, com a descrição da seqüência de 529 pb (Homan *et al.*, 2000), que apresenta-se repetida de 200 a 300 vezes no genoma do *Toxoplasma gondii* gerou uma série de publicações afim de se comparar marcadores provenientes desta nova seqüência com os marcadores já em uso provenientes do gene B1. Os resultados encontrados por estes autores demonstram uma sensibilidade que varia de 10 a 100 vezes maior que o gene B1 (Hierl *et al.*, 2004; Calderaro *et al.*, 2006; Cassaing *et al.*, 2006; Edvinsson *et al.*, 2006).

Porém, Calderaro *et al.* (2006) notaram diferenças de sensibilidade entre diferentes materiais biológicos. Edvinsson *et al.* (2006) reportaram que o fragmento de 529 pb só é mais sensível do que o gene B1 quando há pouco DNA do parasita na amostra, e, sugerem que novos trabalhos deveriam certificar-se de que este fragmento encontra-se realmente conservado dentre diferentes cepas de *T. gondii*.

Devido a estes dados limitantes revelados nesta introdução especialmente sobre a sensibilidade e especificidade destes marcadores (tanto do gene B1 quanto do fragmento de 529 pb) e aliado ao conhecimento da sensibilidade da cnPCR em amostras brasileiras, resolvemos testar qual par apresenta maior eficácia na detecção de *T. gondii* em pacientes imunodeprimidos, e se há diferença significativa entre as metodologias da PCR (cnPCR e qrtPCR). O esclarecimento destas questões é de grande interesse para o diagnóstico molecular da toxoplasmose cerebral, pois o aperfeiçoamento da PCR possibilitará a definição diagnóstica mais rápida, permitindo aos clínicos elaborarem uma resposta adequada e eficaz ao paciente.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Aprimorar o diagnóstico molecular da toxoplasmose cerebral em amostras de pacientes com aids avaliando novos marcadores para cnPCR, e, padronizando a qrtPCR.

2.2. Objetivos específicos

1. Avaliar 2 novos marcadores para o uso na cnPCR utilizando amostras de pacientes com aids e diagnóstico definido;
2. Padronizar a técnica qrtPCR utilizando a sonda *TaqMan*, para uso no diagnóstico molecular;
3. Avaliar dois marcadores para qrtPCR;
4. Determinar a sensibilidade, especificidade e valores relativos de cada marcador.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostras clínicas

Os experimentos foram realizados utilizando-se DNA extraído e purificado de amostras de LCR e sangue encaminhadas ao Serviço de Parasitologia do Instituto Adolfo Lutz para a realização do diagnóstico molecular e imunológico da toxoplasmose.

Estas amostras foram provenientes de pacientes admitidos no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, tendo como critérios de exclusão, idade menor de 18 anos e sorologia negativa para o HIV. A média de idade foi de 41 anos (variando de 18 a 65 anos), 74% destes pertenciam ao sexo masculino e 26% ao sexo feminino.

Este trabalho foi dividido em duas partes, a primeira foi um estudo retrospectivo, e a segunda, prospectiva.

Primeiro estudo (utilizando cnPCR): 102 amostras de DNA extraídas de sangue, sendo 66 de pacientes com aids, diagnóstico clínico da toxoplasmose cerebral e títulos de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma* na RIFI. Os outros 36 pacientes constituíram o grupo controle, possuíam aids e diagnóstico clínico de outras infecções oportunistas do SNC, como meningite criptocócica, leucoencefalopatia multifocal progressiva (LEMP), tuberculose do SNC, disfunção cognitiva motora associada ao HIV sem qualquer título de anticorpos anti-*T. gondii*. Estas amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Biologia Molecular de parasitos do Instituto Adolfo Lutz no período de março de 2008 a dezembro de 2008.

Segundo estudo (utilizando qrtPCR): Durante o período de estudo (24 meses), 273 amostras (152 amostras de sangue e 121 de LCR) de pacientes com aids e suspeita de toxoplasmose cerebral foram inicialmente estudadas. Destas amostras, 149 puderam-se obter dados clínicos, sendo 124 excluídas por falta de dados nos prontuários destes pacientes. A toxoplasmose cerebral foi confirmada pela clínica e dados radiológicos em

50 pacientes, sendo 36 amostras de sangue e 14 de LCR. Em 99 pacientes (62 amostras extraídas de sangue e 37 extraídas de LCR) foram diagnosticadas outras doenças como meningite criptocócica, LEMP, tuberculose do SNC, disfunção cognitiva motora associada ao HIV, pneumonia bacteriana, tuberculose, insuficiência renal crônica, hepatite C, encefalite por citomegalovirus, histoplasmose, epilepsia, candidíase oral.

3.1.1. Diagnóstico clínico da toxoplasmose cerebral

As amostras clínicas utilizadas foram provenientes de pacientes IIER que possuíam diagnóstico sorológico positivo para a infecção por HIV, valores de células CD4+ < 200 cel/ μ L, e suspeita clínica de toxoplasmose cerebral.

A definição de toxoplasmose cerebral em pacientes com aids segundo as definições estabelecidas pelo CDC (CDC, 1993; Potergies *et al.*, 2004) e estão descritas abaixo:

1. 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;
2. Resposta ao tratamento específico anti-*T. gondii*;
3. Reações sorológicas (ELISA e RIFI) positivas.

3.1.2. Quantidade e obtenção

Todas as amostras clínicas foram coletadas antes ou até o terceiro dia da terapia específica para toxoplasmose. Estudos prévios comprovaram que o parasita é detectável em amostras biológicas em até três dias após o início da terapia (Colombo *et al.*, 2005).

De cada paciente foram coletados cerca de 8 ml de sangue em um tubo contendo EDTA (Ácido etilenodiamino tetra – acético), e/ou 2 ml de LCR em um tubo seco mantido sob refrigeração (4°C).

3.1.1.1. cnPCR

Para a avaliação dos marcadores TG1-TG2 e TOX4-TOX5 na cnPCR foram utilizadas 102 amostras de DNA extraídas de sangue de pacientes com aids, com diagnóstico clínico, radiológico e laboratorial.

O grupo com toxoplasmose cerebral foi constituído de 66 pacientes com diagnóstico clínico, radiológico e títulos de anticorpos IgG/IgM anti-*Toxoplasma* na RIFI. O grupo controle foi composto de DNA extraído de 36 pacientes com aids e outras infecções oportunistas do SNC, como meningite criptocócica, leucoencefalopatia multifocal progressiva, neurotuberculose, disfunção cognitiva motora associada ao HIV. Nenhum destes pacientes apresentou na RIFI qualquer título de anticorpos da classe IgG anti-*T. gondii*.

A fim de avaliar a qualidade das extrações de DNA e a presença de substâncias inibidoras da PCR, todas as amostras foram primeiramente submetidas a uma cnPCR utilizando o marcador β 1- β 2 que amplificam um fragmento do gene β -globulina humana.

3.1.1.2. qrtPCR

Para a validação da qrtPCR, foram analisadas 149 amostras de DNA extraídas de 98 amostras de sangue e 51 de LCR provenientes de pacientes com aids e suspeita de toxoplasmose cerebral. Todas foram previamente analisadas por RIFI e cnPCR com o marcador B22-B23.

A toxoplasmose cerebral foi confirmada em 50 pacientes através do diagnóstico clínico e de achados radiológicos. Em 99 pacientes foram diagnosticadas outras doenças como meningite criptocócica, leucoencefalopatia multifocal progressiva, neurotuberculose, disfunção cognitiva motora associada ao HIV, pneumonia bacteriana, tuberculose, insuficiência renal crônica, hepatite C, encefalite por citomegalovirus, histoplasmose, epilepsia e candidíase oral.

Dentre os 149 pacientes com dados clínicos e radiológicos, 20 possuíam tanto amostras de sangue quanto de LCR colhidas na mesma ocasião. Destes, 9 foram diagnosticados com toxoplasmose cerebral e 11 foram incluídos no grupo de outras doenças.

3.2. Multiplicação e manutenção de *T. gondii*

Para a extração de DNA do controle positivo e para a produção de antígeno para RIFI, utilizaram-se taquizoítos da cepa RH. Esta cepa foi escolhida devido a maior facilidade de seu manuseio, pois permite uma obtenção relativamente rápida de uma grande quantidade de taquizoítos, e, pode ser mantida através de inoculações em animais. É caracterizada por ser altamente virulenta, não cistogênica, e de multiplicação rápida (Sabin & Feldman, 1948). Utilizaram-se camundongos da linhagem Swiss com idade variando entre 25 e 30 dias e a via de inoculação escolhida foi a intraperitoneal com um inóculo de cerca de 1×10^7 taquizoítos/animal. Após cinco dias de infecção foram feitas lavagens intraperitoneais com 5 ml/animal de NaCl 0,85% estéril para a retirada dos taquizoítos. Posteriormente, foi feita a contagem dos parasitas em câmara de Neubauer e ajustada a concentração desejada para a extração de DNA, preparo do antígeno para RIFI ou para infectar um novo grupo de animais para a manutenção da cepa.

3.3. Extração de DNA

3.3.1. Em sangue

As amostras coletadas foram transferidas para um tubo cônico de 15 ml e centrifugadas por 10 minutos a 2800 g, para retirada de plasma, a seguir adicionaram-se aos sedimentos cerca de 5 ml de PBS estéril afim de se remover qualquer inibidor presente entre as células. Centrifugou-se por 10 minutos a 2800 g, e todos os sobrenadantes foram desprezados. A fim de realizar-se a lise de hemácias foram adicionados ao sedimento 3 vezes o volume de tampão ACK (150 mM cloreto de amônio; 1 mM bicarbonato de potássio; 0,1 mM EDTA pH 7.3) e os tubos foram incubados a temperatura ambiente sob agitação suave por 10 minutos. Após uma nova centrifugação por 10 minutos a 2800 g, os sobrenadantes contendo restos de hemácias foram desprezados e os sedimentos foram transferidos para tubos cônicos de 1,5 ml.

A seguir iniciou-se a extração/purificação através do kit *PureLink® Genomic DNA (Invitrogen®)*, conforme instruções do fabricante, e na qual baseia-se da propriedade de ligação seletiva do DNA na presença de sais caótipicos em uma membrana de sílica. Primeiramente, foram adicionados aos sedimentos, 20 µl de tampão de lise com *proteinase K* e 20 µl de tampão *RNase A* (ambos fornecidos pelo kit), a fim de lisar tanto células humanas quanto do parasita, e, de digerir qualquer resquício de RNA presente. Procedeu-se a agitação vigorosa (em vortex) e incubação por 2 minutos em temperatura ambiente. Adicionaram-se 200 µl de tampão *PureLink® Genomic Lysis/Binding*, agitação em vortex e incubação por 10 minutos em Banho-maria à 56°C. Finalmente, adicionaram-se 200 µl de Etanol (96-100%) seguido novamente de agitação em vortex.

Após a etapa de extração do DNA iniciou-se a purificação onde, o material composto dos sedimentos e com os tampões de lise com *proteinase K*, de *RNase A*, *PureLink® Genomic Lysis/Binding* e Etanol foi transferido

para um tubo cônico especial (provisto pelo kit) com membrana de sílica já pronta para uso. Centrifugou-se por 1 minuto à 10000 *g*, descartando-se o material centrifugado (mantendo-se apenas a membrana, pois o DNA liga-se à mesma). Iniciou-se, então, o processo de remoção de componentes celulares ainda presentes na membrana através de uma seqüência de duas “lavagens” com tampões providos no kit. Na primeira utilizaram-se 500 µl do tampão 1 e centrifugou-se por 1 minuto à 10000 *g*, e na segunda, 500 µl do tampão 2 por 3 minutos à 10000 *g*. Após restar apenas o DNA ligado com a membrana, adicionou-se um tampão de baixa concentração de sal, o que levou ao desprendimento do DNA da mesma. Para isto, adicionaram-se 50 µl de tampão *PureLink® Genomic Elution Buffer*, incubou-se por 1 minuto em temperatura ambiente, centrifugou-se por 1 minuto à 14000 *g*, e o DNA foi recolhido em um tubo cônico estéril de 1,5 ml. Em seguida procedeu-se a PCR ou o armazenamento do DNA a -20°C.

3.3.2. Em LCR

As amostras de LCR foram transferidas para tubos cônicos estéreis de 1,5 ml e centrifugadas por 5 minutos a 2.000 *g*. Descartaram-se os sobrenadantes, e os sedimentos contendo células foram lavadas com 500 µl PBS estéril por centrifugação por 5 minutos a 2.000 *g*. Após o descarte dos sobrenadantes, foram adicionados aos sedimentos, 40 µl de água *Milli-Q* autoclavada e incubados a 95°C por 5 a 10 minutos. Não é necessária a purificação da amostra, pois em LCR, encontram-se poucas substâncias inibidoras da PCR. Em seguida procedeu-se a PCR ou o armazenamento do DNA a -20°C.

3.3.3. Em taquizoítos de *T.gondii*

O DNA dos taquizoítos provenientes de camundongos foi extraído através do kit *PureLink® Genomic DNA (Invitrogen®)* descrito previamente no item 3.3.1. O grau de pureza das extrações e a quantidade de DNA das amostras foram determinados por absorbâncias em *Nanodrop* no comprimento de onda 260 e 280 nm (luz ultravioleta). O grau de pureza das extrações foi determinado pela razão entre as leituras em DO (densidade ótica) 260/DO 280 nm que deveria apresentar valores entre 1,8 e 2,0. As leituras realizadas a 260 nm determinaram as concentrações de DNA. Segundo Sambrook *et al.* (1989) absorvância igual a 1 equivale a concentração de 50 µg/ml de DNA de fita dupla.

3.4. Seleção das regiões alvo de *T.gondii* e dos marcadores

As regiões alvo escolhidas foram o gene B1 e o fragmento repetitivo de 529 pb de *T. gondii*. A escolha por um marcador do gene B1 deveu-se ao fato deste apresentar-se altamente conservado entre as diferentes cepas e ser composto de 35 regiões repetitivas contendo 2214 nucleotídeos por região (Burg *et al.*, 1989; Grover *et al.*, 1990; Lin *et al.*, 2000; Contini *et al.*, 2005; Okay *et al.*, 2009).

Apesar de não se ter ainda certeza de que a seqüência de 529 pb encontra-se conservada entre as diferentes cepas de *T. gondii*, vem sendo descrita como sendo mais sensível do que a seqüência do gene B1, pois é repetida de 200-300 vezes no genoma deste parasita (Homan *et al.*, 2000; Edvinson *et al.*, 2006).

3.4.1. Marcadores para cnPCR

Foram selecionados três marcadores que amplificam diferentes regiões do genoma de *T. gondii* e um par que amplifica um fragmento do gene β -globulina humana, utilizado como controle de inibição da reação: As seqüências foram:

- B22 (5'-AACGGGCGAGTAGCACCTGAGGAGA-3') e B23 (5'-TGGGTCTACGTCGATGGCATGACAAC-3'), que amplificam uma seqüência de 115 pb de uma região do gene B1 (Burg *et al.*, 1988; 1989; Vidal *et al.*, 2004; Colombo *et al.*, 2005).

- TG1 (5'-AAAAATGTGGGAATGAAAGAG-3') e TG2 (5'-ACGAATCAACGGAAGTGTAAAT-3') que amplificam outra região do gene B1 de 469 pb (Jalal *et al.*, 2004).

- TOX4 (5'-CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG-3') e TOX5 (5'-CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT-3') que amplificam uma seqüência repetitiva de 529 pb de uma região não-codificante (Homan *et al.*, 2000).

- β 1 (5'-ACCACCAACTTCATCCACGTTCCACC-3') e β 2 (5'-CTTCTGACACAACTGTGTTCACTAGC-3') que amplificam um produto de 140 pb do gene β -globulina humana (Lee *et al.*, 2001). Esta reação foi realizada para analisar a qualidade da extração de DNA e a presença de inibidores da Taq DNA polimerase.

3.4.2. Marcadores para qrtPCR

Os 2 marcadores desenhados e utilizados na qrtPCR foram desenvolvidos a fim de hibridizarem-se com um fragmento do gene B1 e com a região repetitiva de 529 pb. Após a escolha das regiões gênicas e provável início dos oligonucleotídeos, *primers* e *probes* foram sintetizados através do *Primer Express software* pela *Applied Biosystems*.

- B1Tg-F (5'-CAAGCAGCGTATTGTGCGAGTAGAT-3'), B1Tg-R (5'-GCGTCTCTTTTCATTCCCACATTTT-3'), sonda (*probe*) B1Tg-TM (FAM [Reporter]-5'-CAGAAAGGAACTGCATCCGTT-3'- NFQ [Quencher]). Amplificam uma seqüência de 83 pb.

- RETg-F (5'-GGCGAGGGTGAGGAT GAG-3'), RETg-R (5'-CATCTTCTCCCTCTCCGACTCT-3'), sonda (*probe*) RETg-M (FAM [Reporter]- 5'-TCGCTTCCCAACCACG-3' - NFQ [Quencher]). Amplificam uma seqüência de 64 pb. A figura 2 mostra a localização dos *primers* e *probes* desenhados para qrtPCR no genoma de *T. gondii*.

```

A 601 gcaaatgaaaaggattcattttcgcagtacaccaggagttggattttgtagagcgtctct
661 cttcaagcagcgtattgtcagtagatcagaaaggaactgcatccgttcatgagtataag
721 aaaaaatgtgggaatgaaagagacgctaatgtgtttgcataggttgcagtcactgacga
781 gctcccctctgctggcgaaaagtgaaattcatgagtatctgtgcaactttgggtgatttc

B 181 cacagaagggacagaagtccaaggggactacagacgcgatgccgctcctccagccgtctt
241 ggaggagagatatcaggactgtagatgaagggcgaggggtgaggatgaggggggtggcgtggt
301 tgggaagcgacgagagtcggagagggagaagatgtttccggcttggctgcttttctgga
361 ggggtgaaaaagagacaccggaatgcgatccagacgagacgactttcctcgtgggtgat

```

Figura 2: Localização no genoma de *T. gondii*, de onde foram sintetizados os *primers* (em negrito) e as sondas *TaqMan FAM dye-labeled* (em vermelho): (A) - Seqüência parcial do gene B1 com 2214 pb (GenBank AF 179871), onde o marcador B1TG esta localizado entre os nucleotídeos 664 e 747; (B) – Região repetitiva de 529 pb (GenBank AF146527), onde o iniciador RETG esta localizado entre os nucleotídeos 270 e 334.

3.5. Reação em cadeia de polimerase

3.5.1. cnPCR

As amplificações foram realizadas com um kit comercial (*GoTaq[®] Green Master Mix - Promega*) contendo 2 corantes (azul e amarelo) que permitem monitorar o progresso das amostras durante a eletroforese. Cada 12,5 µl do “mix” continha 1 unidade de Taq DNA polimerase em 10mM Tris-HCl, pH 8.5; 50mM KCl; 1.5 mM MgCl₂ e 200 mM de cada um dos desoxinucleosídeos trifosfatados (dATP, dGTP, dCTP, dTTP). Cada reação foi realizada adicionando-se 5 µl do DNA alvo (com intervalo de concentração em torno de 500 ng/µl) e 50 pmol de cada iniciador num volume final de 25 µl. As amplificações foram realizadas utilizando um termociclador (*LongGene*). Para cada reação foram adicionados um controle positivo, a partir de DNA extraído de taquizoítos (concentração de 1x10⁷ taquizoítos/ml) e dois controles negativos. Em um adicionou-se DNA proveniente de um indivíduo sem toxoplasmose e em outro, água ultrapura que substituiu o DNA. Nas reações em que o marcador B22-B23 foi utilizado, as amplificações consistiram de um ciclo inicial de desnaturação de 5 minutos a 95°C, uma segunda etapa com 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 62°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. Após essa etapa o processo foi finalizado por um ciclo final de extensão por 5 minutos a 72° C. Para as reações utilizando o marcador TOX4-TOX5, as amplificações consistiram de um ciclo inicial de desnaturação de 5 minutos a 94°C, uma segunda etapa com 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 55°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos. Após essa etapa o processo foi finalizado por um ciclo final de extensão por 5 minutos a 72° C. Quando o marcador TG1-TG2 foi utilizado, as amplificações consistiram de um ciclo inicial de desnaturação de 5 minutos a 94°C, uma segunda etapa com 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 42.5°C por

30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. Após essa etapa o processo foi finalizado por um ciclo final de extensão por 5 minutos a 72° C. As reações controle, na qual foi utilizado o marcador β 1- β 2 foram realizadas simultaneamente, ou com o mesmo protocolo de temperatura das reações de um dos marcadores.

3.5.2. qrtPCR

As reações foram realizadas em um *ABI 7300 Real-time PCR System (Applied Biosystems®)*. Cada *mix* de reação continha 10 μ l *TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)*, 1 μ l do marcador com sua respectiva sonda (18 μ M de cada *primer*, 5 μ M da sonda *TaqMan FAM dye-labeled* e 5 μ M de *quencher NFQ*), 3 μ l do DNA extraído/purificado (com intervalo de concentração em torno de 300 ng/ μ l), e 6 μ l de H₂O milli-Q autoclavada para completar volume final de 20 μ l. Para cada reação foram adicionados um controle positivo, a partir de DNA extraído de taquizoítos (concentração de 1×10^7 taquizoítos/ml) e dois controles negativos. Em um adicionou-se DNA proveniente de um indivíduo sem toxoplasmose e em outro, água ultrapura que substituiu o DNA.

Primeiramente, incubou-se a reação a uma temperatura de 50°C por 2 minutos (a fim de otimizar a atividade da enzima *AmpErase® Uracil N-glycosylase (UNG)*, que permitiu a remoção de qualquer produto anteriormente amplificado, minimizando a contaminação cruzada), seguido por 95°C por 10 minutos. Em seguida realizou-se 40 ciclos compostos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

O sistema *ABI 7300* verifica o sinal fluorescente a cada segundo e calcula automaticamente o *mean baseline* (ou *baseline fluorescence*), ou seja, o “sinal de fundo” da fluorescência gerado durante os ciclos iniciais (3-15) da qrtPCR. Com base nesta “fluorescência de fundo” pode-se detectar a fluorescência gerada pelo acúmulo de DNA amplificado, denominado Ct (*threshold cycle*), com acurácia. O Ct é definido como o ciclo em que a

fluorescência excede estatisticamente o *mean baseline*, sendo proporcional ao número de DNA alvos presentes na amostra e representando a mesma quantidade de produtos amplificados presentes no tubo.

As reações de qrtPCR foram previamente padronizadas utilizando DNA de *T. gondii* extraído de amostras de sangue sabidamente negativas para este parasita e misturadas com um número determinado de taquizoítos. Estas amostras diluídas permitiram estabelecer o real valor representativo da carga parasitária em cada amostra clínica.

3.6. Eletroforese em gel de agarose

Os produtos amplificados pela PCR foram separados por eletroforese em um sistema eletroforético horizontal em gel de agarose a 2% em TBE pH 8,0 (0,045M de Tris-Borato; 0,001M EDTA) com 0,5 µl/ml brometo de etídio, juntamente com o marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pb em uma velocidade de 6V/cm. As amostras foram visualizadas e fotografadas em um transluminador GeneGenius (Programa GeneSnap, Syngene, versão 6.08.04) de ultravioleta a uma longitude de onda de 302 nm (Sambrook *et al.*, 1989).

3.7. RIFI

3.7.1. Preparo de antígeno

Os taquizoítos foram lavados por três vezes com 40 ml de PBS pH 7,2 por 15 minutos a 2800 g. Por fim, foram adicionados ao sedimento 1 ml de água destilada e formol 2% em PBS pH 7,2 na proporção de 1:1 e incubados por 30 minutos a 37°C. O sobrenadante foi desprezado após uma centrifugação por 15 minutos a 2800 g e ao sedimento foi adicionada

aleatoriamente, solução salina até que se obtivesse 20 a 30 taquizoítos por campo, quando observado em microscopia no aumento de 400 vezes. O antígeno, então foi distribuído em lâminas de 10 orifícios contendo em média 20 µl por orifício e deixadas secar naturalmente em temperatura ambiente. As lâminas secas foram embrulhadas em papel vegetal e acondicionadas em papel de alumínio e posteriormente conservadas em freezer a -20°C até o momento do uso.

3.7.2. Ensaio

As lâminas com antígeno contendo taquizoítos íntegros foram retiradas do freezer e mantidas em temperatura ambiente. Os soros foram diluídos nas concentrações 1:16, 1:256, 1:1024, 1:2048, 1:4096 e as amostras de LCR nas concentrações 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, e, acrescentados na lâmina em ordem decrescente num volume de 20 µl. A seguir, foram incubadas por 30 minutos em câmara úmida a 37°C e, posteriormente, lavadas com PBS pH 7,2 por dois períodos de 10 minutos. As lâminas foram secas suavemente com papel de filtro, e sobre os orifícios foram acrescentados 15 µl de uma globulina anti-IgG humana marcada com fluoresceína (Biolab-Merieux) diluído 1:200 em 0,05% Azul de Evans PBS pH 7,2. Após nova incubação em câmara úmida por 30 minutos a 37°C, as lâminas foram novamente lavadas por 2 vezes com PBS pH 7,2. A seguir, foram secas, receberam uma fina camada de glicerina tamponada com PBS pH 7,2 e foram recobertas com lamínula. As leituras foram feitas em microscópio de fluorescência (Nikon) em aumento de 400 vezes. O cut-off, já estabelecido pela seção de Toxoplasmose do Instituto Adolfo Lutz foi considerado a diluição de 1:16 para soro e 1:64 para LCR (Camargo & Leser,1976).

3.8. Análise de dados

3.8.1. Na cnPCR

Todos os resultados divergentes foram repetidos ao mínimo 2 vezes. As porcentagens de sensibilidade e especificidade foram calculadas através das seguintes fórmulas:

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{Verdadeiros positivos}}{\text{Verdadeiros positivos} + \text{falsos negativos}} \times 100$$

$$\text{Especificidade} = \frac{\text{Verdadeiros negativos}}{\text{Verdadeiros negativos} + \text{falsos positivos}} \times 100$$

Os Índices de concordância (expressos em porcentagens) entre os 3 marcadores foram calculados pela fórmula:

$$\text{Índice de concordância} = \frac{\text{Número de resultados concordantes}}{\text{Número total de amostras}} \times 100$$

3.8.2. Na qrtPCR

Todos os resultados divergentes foram repetidos ao mínimo 2 vezes.

- Sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos (VPP) e negativos (VPN) foram determinados considerando os resultados do consenso e foram calculados como:

- Sensibilidade e especificidade são descritos no item 3.8.1.

- Valor preditivo positivo =
$$\frac{\text{Verdadeiros positivos}}{\text{Verdadeiros positivos} + \text{falsos positivos}}$$

- Valor preditivo negativo =
$$\frac{\text{Verdadeiros negativos}}{\text{Verdadeiros negativos} + \text{falsos negativos}}$$

As médias e desvios padrão foram calculados pelo programa “Sigma Plot 9.0”.

3.8.3. Aprovação de comitês de ética e científico

Este estudo foi aprovado nos Comitês de Ética em Pesquisa e Conselho Técnico Científico:

1. Instituto Adolfo Lutz (Pré-aprovação) (Anexo 8.1.);
2. Faculdade de Medicina de São Jose do Rio Preto (Anexo 8.2.);
3. Conselho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz (Anexo 8.3.).

4. RESULTADOS

Amplificações positivas demonstraram a ausência de qualquer substância inibidora da PCR e puderam ser utilizadas para os experimentos nas cnPCR e qrtPCR. Nas amostras negativas, o DNA foi re-extraído. A figura 3D ilustra uma eletroforese em gel de agarose 2% onde pode se observar que as amostras de origem humana geram o produto característico quando não houver nenhum inibidor presente.

4.1. Eficácia dos marcadores TG1-TG2 e TOX4-TOX5 para cnPCR no diagnóstico da toxoplasmose cerebral

Durante a rotina utilizando a cnPCR com o marcador B22-B23 notamos que em alguns pacientes o produto amplificado era de difícil visualização no gel de agarose devido a baixa intensidade da banda. Estas reações podem gerar falsos resultados negativos. Supõe-se que tais resultados refletem na baixa parasitemia em alguns pacientes, o que leva a amplificação de uma pequena quantidade de DNA. Tal dificuldade nos levou a avaliar 2 novos marcadores para o diagnóstico de *T. gondii* em amostras clínicas.

Como a cnPCR já se encontrava padronizada no nosso laboratório com o marcador B22-B23 (que amplificam um fragmento de 115 pb do gene B1) (figura 3A), utilizamos mais um par (TG1-TG2) que amplificam um outro fragmento do gene B1 (de 469 pb), e, um (TOX4-TOX5) que amplificam um fragmento de 529 pb de uma região não-codificante do genoma de *T. gondii*. As figuras 3B e 3C ilustram os produtos amplificados de cada um dos marcadores estudados.

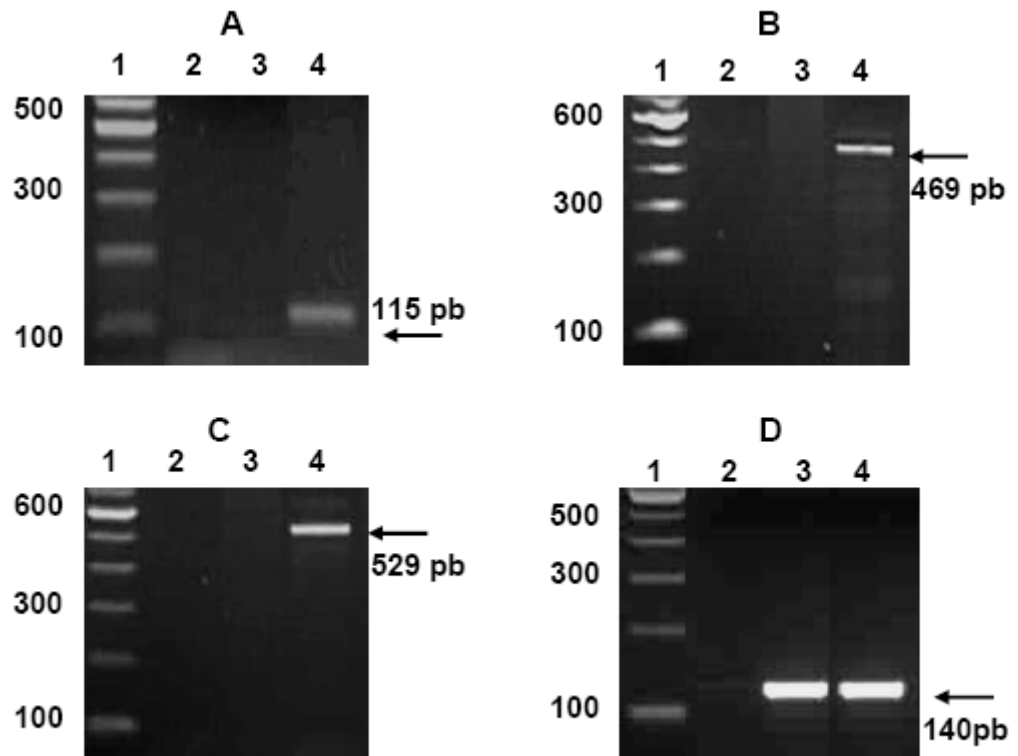


Figura 3: Produtos de PCR amplificados em três diferentes regiões alvo do genoma de *Toxoplasma gondii*. O marcador B22-B23 amplifica um fragmento de 115 pb do gene B1 (A); TG1-TG2, um fragmento de 469 pb do gene B1 (B); e TOX4-TOX5 um fragmento de 529 pb de uma região não codificante (C). O controle da reação foi realizado testando-se as amostras de DNA com um par de oligonucleotídeos (β 1- β 2) (D) que amplificam um fragmento de 140 pb do gene β -globulina humano. As amplificações foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 2%. Coluna 1, padrão de massa molecular - 100 pb; Coluna 2, controle negativo (água); Coluna 3, amostra clínica proveniente de um paciente negativo para toxoplasmose; Coluna 4, amostra clínica proveniente de um paciente com toxoplasmose cerebral.

4.1.1. Sensibilidade e especificidade dos marcadores

As sensibilidades dos marcadores B22-B23, TG1-TG2 e TOX4-TOX5 foram analisadas utilizando DNA extraído de 66 pacientes com toxoplasmose cerebral. Estes marcadores amplificaram seus produtos específicos em 63, 62 e 58 amostras respectivamente, provendo 95,5%, 93,9% e 89,3% de sensibilidade. Todas as 66 amostras foram positivas em pelo menos um dos marcadores.

A análise das amostras dos 36 pacientes sem toxoplasmose e com outras patologias neurológicas demonstrou especificidade de 97,2%, 88,9% e 91,7% respectivamente com os marcadores B22-B23, TG1-TG2 e TOX4-TOX5. Todas as 36 amostras foram negativas em pelo menos um dos marcadores.

Os índices de concordância demonstrados entre B22-B23 e TOX4-TOX5 foram de 83,3%; entre B22-B23 e TG1-TG2, de 93,1%; entre TG1-TG2 e TOX4-TOX5, de 87,2%; e, entre os 3 marcadores, de 79,4%.

Tabela 1: Resultados da cnPCR em 102 amostras de DNA de pacientes com aids do IIER

Marcadores	Resultados			
	Toxoplasmose Cerebral		Outras doenças neurológicas	
	n=66 Positivas ¹	Número de amostras (%) Negativas	Positivas	n=36 Negativas ²
B22-B23	63 (95,5)	3	1	35 (97,2)
TG1-TG2	62 (93,9)	4	4	32 (88,9)
TOX4-TOX5	58 (89,3)	8	3	33 (91,7)

¹Sensibilidade e ²Especificidade foram calculados como descrito no item 3.8.1 de Materiais e Métodos.

Tabela 2: Índice de concordância entre os 3 marcadores na cnPCR para a detecção de *T. gondii*.

Marcadores	Toxoplasmose Cerebral		
	Concordantes ¹	Discordantes ²	Índice Concordância ³ (%)
B22-B23/TG1-TG2/TOX4-TOX5	81	21	(79,4)
B22-B23/TOX4-TOX5	85	17	(83,3)
B22-B23/TG1-TG2	95	07	(93,1)
TOX4-TOX5/TG1-TG2	89	13	(87,2)
Total	102	0	(100)

¹Positivo em todos os marcadores; ² Negativo em pelo menos um marcador; ³Porcentagem dos índices de concordância foram calculados como descrito no item 3.8.1 de Materiais e Métodos.

4.2. Validação da qrtPCR no diagnóstico da toxoplasmose

O objetivo desta segunda parte do estudo foi o de avaliar se a qrtPCR apresentava melhor sensibilidade no diagnóstico da toxoplasmose utilizando marcadores moleculares que têm como alvo as mesmas regiões gênicas que as utilizadas na cnPCR. Os resultados gerados permitiram a nossa compreensão de diferentes situações na prática laboratorial.

Nas reações de qrtPCR utilizando *TaqMan FAM dye-labeled*, o sistema ABI 7300 verificou o sinal fluorescente a cada segundo e calculou automaticamente o “*threshold line*” (ou “*mean baseline*”) ou seja, o momento em que a fluorescência excede o “sinal de fundo” gerado durante os ciclos iniciais (do 3º ao 15º). O “*Threshold*” nada mais é do que o desvio padrão do “*Rn*” (*normalized reporter* – que é a intensidade de emissão de fluorescência gerada pelo *reporter* [FAM] dividida pela intensidade de emissão da referência passiva [ROX]) dos ciclos iniciais multiplicado por fator ajustável e é plotado na região onde ocorre o pico de fluorescência (crescimento exponencial dos produtos da PCR).

Com base neste “*mean baseline*” pôde-se detectar a fluorescência gerada pelo acúmulo de DNA amplificado, e medir o *Ct* (que é o número fracionado do ciclo em que a fluorescência excede estatisticamente o “*mean baseline*”, sendo proporcional ao número de DNA alvos presentes na amostra).

A figura 4 ilustra uma destas reações, onde “*Delta Rn*” corresponde ao eixo Y (e que é magnitude do sinal de fluorescência determinada pela fórmula: $[(R_{n+}) - (R_{n-})]$, sendo R_{n+} toda a fluorescência gerada inclusive pelas amostras, e, R_{n-} o sinal gerado nos ciclos iniciais e por reações sem amostras positivas) e o *Ct* corresponde ao eixo X.

Como comparação entre as duas metodologias, utilizamos o marcador B22-B23 para cnPCR, este já se encontrava previamente padronizado e implementado em nossa rotina. Na qrtPCR os 2 marcadores utilizados foram: B1Tg-F e B1Tg-R do gene B1, e, RETg-F e RETg-R, da

seqüência não codificante de 529 pb. Ambos (B1Tg e RETg) possuíam sondas *TaqMan FAM dye-labeled*.

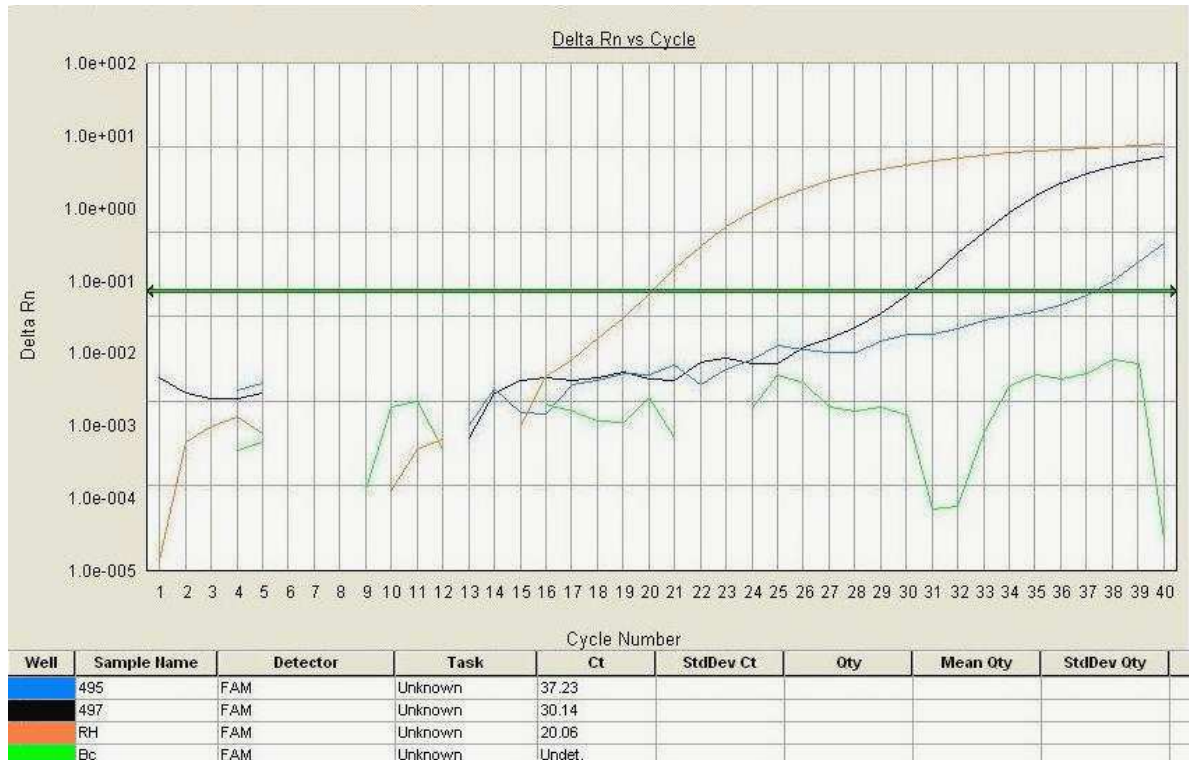


Figura 4: Modelo do protocolo da qrtPCR utilizando o marcador B1Tg, contendo no eixo Y o “*Delta Rn*” (que é magnitude do sinal de fluorescência gerado) e no eixo X o “*Ct*” (que indica o numero de ciclos da PCR). A linha horizontal verde corresponde ao “*Threshold line*” que é o momento em que a fluorescência excede o “sinal de fundo” gerado durante os ciclos iniciais (do 3º ao 15º ciclos). Neste Quadro observam-se 4 situações: amostra “Bc” (cor verde), controle negativo (usando água como amostra) não gera sinal de fluorescência (*Ct=Undetected*); amostra “RH” (cor laranja), controle positivo (com DNA extraído da cepa RH de *T. gondii*) e gera pico de fluorescência no 20º ciclo da qrtPCR (*Ct=20,06*) sendo a maior carga parasitária da reação; amostra “497” (cor preta), amostra clínica de paciente com toxoplasmose cerebral, pico no ciclo 30º (*Ct=30,14*); amostra “495” (cor azul), amostra clínica de paciente sem toxoplasmose, pico inespecífico no final da reação (*Ct=37,23*).

4.2.1. Sensibilidade e especificidade dos marcadores B1Tg e RETg

Os resultados das cnPCR e qrtPCR das 149 amostras de DNA foram avaliados a fim de se determinar a sensibilidade, especificidade, VPP e VPN de cada marcador.

Dentre as 98 amostras de DNA extraídas de sangue, os resultados positivos (número de amostras) e a sensibilidade (expressa em %) para os marcadores B22-B23 (cnPCR), B1Tg e RETg foram 35 amostras (97,2%), 32 (88,9%) e 35 (97,2%) respectivamente. Das 51 amostras de LCR, 11 foram positivas no marcador B1Tg e 14 nos marcadores B22-B23 e RETg, gerando sensibilidades de 78,6% e 100% respectivamente.

Quando as 149 amostras foram analisadas em conjunto a sensibilidade encontrada foi de 98% na cnPCR (B22-B23) e qrtPCR com marcador RETg e 86% na qrtPCR com B1Tg. A sensibilidade e o valor preditivo positivo do marcador B1Tg (0,877) foram menores que os outros marcadores (B22-B23 e RETg de 0,980).

A especificidade das 149 amostras foi calculada em 97% (96 amostras) para B22-B23 e B1Tg; e 88,8% (88) para RETg. As reações utilizando-se os marcadores B22-B23, B1Tg e RETg para amostras de sangue foram negativas em 61 amostras (98,4%), 61 (98,4%), 55 (88,7%) respectivamente. Em LCR, a especificidade foi de 97,2% (35) para B22-B23 e RETg e 91,7% (33) para B1Tg.

Apesar da alta sensibilidade do marcador RETg (98%), especificidade (88,8%) e valor preditivo negativo foram baixos (0,900), enquanto que B22-B23 e B1Tg tiveram valor preditivo negativo de 0,970. O marcador B1Tg demonstraram menor sensibilidade (86%) e VPP (0,877) A tabela 4 mostra em detalhes os resultados de cada marcador individualmente.

Tabela 3: Diagnóstico molecular da toxoplasmose cerebral em 149 pacientes com aids, utilizando os marcadores B22-B23 (cnPCR), B1Tg e RETg (qrtPCR): sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo.

Marcadores	Numero de amostras		Sensibilidade	Especificidade	VPP ^a	VPN ^b	
	<i>Positivas</i>	<i>Negativas</i>					
<i>Sangue</i>	B22-B23 (cnPCR)	35	61	97.2	98.4	0.973	0.984
	B1Tg (qrtPCR)	32	61	88.9	98.4	0.900	0.984
	RETg (qrtPCR)	35	55	97.2	88.7	0.973	0.898
	<i>n=</i>	36	61				
<i>LCR</i>	B22-B23 (cnPCR)	14	35	100	97.2	1.0	0.973
	B1Tg (qrtPCR)	11	35	78.6	97.2	0.823	0.973
	RETg (qrtPCR)	14	33	100	91.7	1.0	0.924
	<i>n=</i>	14	38				
<i>Total</i>	B22-B23 (cnPCR)	49	96	98.0	97.0	0.980	0.970
	B1Tg (qrtPCR)	43	96	86.0	97.0	0.877	0.970
	RETg (qrtPCR)	49	88	98.0	88.8	0.980	0.900
	<i>n=</i>	50	99				

^aValor preditivo positivo (VPP), ^b Valor preditivo negativo (VPN), Sensibilidade e especificidade para cada marcador foram determinadas considerando o consenso laboratorial descrito em Materiais e Métodos.

4.2.2. Situações laboratoriais observadas toxoplasmose cerebral

Dentre todos pacientes analisados, 20 foram coletados sangue e LCR simultaneamente. Assim, os resultados permitiram comparar as informações moleculares, sorológicas e clínicas do mesmo paciente. Nove foram diagnosticados como toxoplasmose cerebral, mas com diagnósticos laboratoriais diferentes. Assim, quatro situações podem ser vistas na Tabela 4. Os dois primeiros casos tiveram diagnóstico molecular negativo no LCR e positivo no sangue. Títulos de RIFI foram variáveis no LCR, conforme demonstrado no caso 1 (negativo) e caso 2 (positivo). Assim, um perfil sorológico negativo não exclui a presença de infecção ativa, principalmente, quando o diagnóstico sorológico é feito no LCR. Os valores das reações sorológicas no LCR são limitadas, pois a sensibilidade e especificidade variam em cerca de 60 a 70% (Collazos, 2003). O terceiro caso teve diagnóstico molecular positivo no LCR e negativo no sangue. O quarto caso teve um diagnóstico molecular positivo em ambas as amostras. Títulos de RIFI no soro e LCR podem ser variáveis. Elevados como no caso 3, ou baixos, como no caso 4. Os outros 11 pacientes tinham outras infecções neurológicas oportunistas. Os casos 5, 6, 7 e 8 ilustram os casos negativos. Embora todas as amostras fossem negativas no diagnóstico molecular, os títulos de RIFI foram variáveis tanto no soro como no LCR com negativo (caso 5) e com altos (caso 6) ou baixos (caso 7). RIFI negativa no LCR e positiva no soro também foram vistos (caso 8).

Tabela 4: Informações clínicas e laboratoriais de pacientes com aids e toxoplasmose cerebral (casos 1 a 4) ou outras infecções oportunistas (casos 5 a 8) com amostras de sangue e LCR colhidas no mesmo momento.

Caso	Amostra	Marcadores			RIFI ^a	Diagnóstico Clínico
		qrtPCR		cnPCR		
		(B1Tg)	(RETg)	(B22-B23)		
1	LCR Sangue	Neg Pos	Neg Pos	Neg Pos	Neg 1:1024	Toxoplasmose Cerebral
2	LCR Sangue	Neg Pos	Neg Pos	Neg Pos	1:8 1:4000	Toxoplasmose Cerebral
3	LCR Sangue	Pos Neg	Pos Neg	Pos Neg	1:32 1:4000	Toxoplasmose Cerebral
4	LCR Sangue	Pos Pos	Pos Pos	Pos Pos	1:8 1:256	Toxoplasmose Cerebral
5	LCR Sangue	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Tuberculose do SNC
6	LCR Sangue	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	1:16 1:4000	Encefalite Citomegalovírus
7	LCR Sangue	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	1:4 1:256	Epilepsia
8	LCR Sangue	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg 1:1024	LEMP

RIFI^a: soros e LCR foram considerados reagentes acima de 1:16 e 1:4 respectivamente.

5. DISCUSSÃO

Ao contrário do curso favorável da toxoplasmose na maioria dos indivíduos imunocompetentes, esta infecção apresenta-se como uma doença de alta morbidade e mortalidade entre os imunocomprometidos. A forma cerebral é a mais comum infecção oportunista em pacientes com aids (Holliman, 1988; Liesenfeld *et al.*, 1999; Luft & Chua, 2000; Lin *et al.*, 2000). Os métodos diagnósticos convencionais como os de imagem e os sorológicos tendem a falhar em evidenciar ou a confundir-se com outras patologias nestes pacientes especiais (Franzen *et al.*, 1997; Ferreira, 2000; Lin *et al.*, 2000).

Ultimamente, vários grupos têm adotado a cnPCR no diagnóstico laboratorial da toxoplasmose utilizando diferentes marcadores na detecção de *T. gondii*. Mais recentemente, o uso da qrtPCR possibilitou a quantificação da carga parasitária e o acompanhamento da terapia anti-*toxoplasma* (Costa *et al.*, 2000; Homan *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2000; Buchbinder *et al.*, 2003; Chabbert *et al.*, 2004; Edvinsson *et al.*, 2004; Jalal *et al.*, 2004; Hierl *et al.*, 2004; Vidal *et al.*, 2004; Contini *et al.*, 2005; Calderaro *et al.*, 2006; Cassaing *et al.*, 2006; Colombo *et al.*, 2005; Edvinsson *et al.*, 2006; Okay *et al.*, 2009).

Ainda que existam diversas seqüências de marcadores para detecção de *T. gondii*, as mais utilizadas na cnPCR e qrtPCR têm como alvo o gene B1 por possuir uma região que se repete 35 vezes no genoma deste parasita. (Burg *et al.*, 1989; Brindley *et al.*, 1993; Filisetti *et al.*, 2003; Chabbert *et al.*, 2004; Okay *et al.*, 2009). Particularmente, o marcador B22-B23 do gene B1 é o mais recomendado para o diagnóstico em pacientes imunocomprometidos, pois apresenta maior sensibilidade e especificidade comparada a outros marcadores alvo deste gene. (Brindley *et al.*, 1993; Chabbert *et al.*, 2004).

Recentemente foi descrito outro alvo. Trata-se de uma seqüência de 529 pb que se encontra repetida de 200-300 vezes, e que vem sendo relatada por possuir uma sensibilidade que varia de 10 a 100 vezes maior do

que a seqüência do gene B1 (Homan *et al.*, 2000; Hierl *et al.*, 2004; Calderaro *et al.*, 2006; Cassaing *et al.*, 2006; Edvinsson *et al.*, 2006). No entanto, alguns autores discordam desta maior sensibilidade do fragmento de 529 pb, pois ao compararem com o gene B1 não observaram qualquer diferença significativa entre os mesmos (Filisetti *et al.*, 2003). Calderaro *et al.* (2006) notaram diferenças de sensibilidade entre os dois alvos apenas entre diferentes materiais biológicos, Edvinsson *et al.* (2006) reportaram que o fragmento de 529 pb só é mais sensível quando há pouco DNA do parasita na amostra e Okay *et al.* (2009) concluíram que no Brasil deve ser utilizado o gene B1 ao invés da seqüência de 529 pb para o diagnóstico da toxoplasmose fetal, preferencialmente o marcador B22-B23 devido a sua maior sensibilidade.

Uma seqüência alvo ideal deve ser capaz de amplificar todas as cepas de *T. gondii* e não ser complementar apenas à cepa do tipo I como ocorre com a maioria dos marcadores descritos na literatura (Reischl *et al.*, 2003). Edvinsson *et al.* (2006) nos advertem que deveriam certificar-se em novos trabalhos de que a seqüência de 529 pb demonstra-se realmente complementar e conservada entre as diferentes cepas deste parasita. Logo alguns autores preferem utilizar marcadores provenientes do gene B1, pois este tem se mostrado bastante conservado dentre as diferentes cepas de *T. gondii* (Lin *et al.*, 2000; Contini *et al.*, 2005; Okay *et al.*, 2009).

A proposta inicial deste trabalho foi a de comparar diferentes marcadores a fim de aumentar a sensibilidade do diagnóstico molecular da toxoplasmose cerebral através da cnPCR. O marcador B22-B23 tem se mostrado (realizando a cnPCR) altamente sensível e específico para fins diagnóstico. Este marcador já se mostrou altamente sensível (100%) e específico (94,4%), quando testado em amostras de LCR de recém-nascidos com suspeita de toxoplasmose congênita e pacientes com aids, com suspeita de toxoplasmose cerebral (Vidal *et al.*, 2004). Estes achados foram confirmados posteriormente, num estudo caso-controle, na qual se analisaram amostras de sangue de pacientes com aids. A sensibilidade e especificidade da PCR empregando-se este marcador foram de 80% e 98%,

respectivamente (Colombo *et al.*, 2005). A partir destes estudos, este marcador passou a ser utilizado rotineiramente no laboratório de Biologia Molecular de Parasitos do Serviço de Parasitologia para a realização do diagnóstico molecular das toxoplasmoses congênita e cerebral.

Porém, notou-se na rotina que produtos amplificados de algumas reações, eram extremamente fracos e de difícil visualização no gel de agarose. Esta dificuldade poderia levar a falsos resultados negativos. Supõe-se que tais resultados reflitam na baixa parasitemia em alguns pacientes, o que leva a amplificação de uma pequena quantidade de DNA.

Portanto, devido a necessidade de comprovar a real positividade destas amostras, partiu-se para a comparação de 2 novos marcadores moleculares de *T. gondii* na cnPCR. Um destes tendo como alvo uma seqüência do gene B1 (diferente da região amplificada pelo marcador B22-B23) e outro amplificando o fragmento de 529 pb. O marcador TG1-TG2 (gene B1) amplifica uma seqüência de 469 pb e possui um limite de detecção relatado como sendo de 2 parasitas/amostra (Jalal *et al.*, 2004). O marcador TOX4-TOX5 (seqüência não-codificante de 529 pb) apresentou uma sensibilidade que variou de 10 a 100 vezes maior que o gene B1 (Homan *et al.*, 2000; Hierl *et al.*, 2004; Calderaro *et al.*, 2006; Cassaing *et al.*, 2006; Edvinsson *et al.*, 2006).

A escolha de qual tipo de material clínico deve-se extrair o DNA varia de um laboratório a outro. Espy *et al.* (2006) sugerem que a camada leucocitária é o melhor espécime clínico para extração e detecção de *T. gondii*. Porém, a detecção deste vem sendo realizada em diferentes materiais biológicos, como sangue, soro, LCR, líquido amniótico, lavado bronco alveolar, humor aquoso, aspirado de medula óssea, biópsias de linfonodo, de placenta, de pele e de pulmão (Costa *et al.*, 2000; Buchbinder *et al.*, 2003; Hierl *et al.*, 2004; Romand *et al.*, 2004; Calderaro *et al.*, 2006; Cassaing *et al.*, 2006; Edvinsson *et al.*, 2006). Foi utilizado sangue preferencialmente por apresentar uma coleta menos invasiva do que LCR. Embora fossem extraídos DNA de LCR quando enviado ao laboratório.

A fim de se verificar a integridade do DNA extraído das amostras de sangue e LCR, acrescentou-se mais uma etapa de cnPCR utilizando-se o marcador $\beta 1$ - $\beta 2$, que amplifica um fragmento de 140 pb do gene β -globulina humana (Lee *et al.*, 2001). Este procedimento adicional permitiu verificar a existência algum agente capaz de inibir a reação de amplificação. Se alguma substancia inibidora da *Taq*-DNA polimerase porventura estivesse presente na amostra devido algum erro durante a extração da mesma, o resultado seria negativo.

Após a certificação de que todas as amostras clínicas não possuíam nenhum inibidor, realizou-se as cnPCR utilizando os marcadores específicos para *T. gondii*. Todas amostras de DNA utilizadas haviam sofrido nenhum ou poucos ciclos de descongelamento e congelamento, e, mantinham suas concentrações de DNA quase inalteradas, como recomendado por Bellete *et al.* (2003).

Com os resultados desta etapa em mãos, ainda sim, sentiu-se a necessidade de melhorar ainda mais a sensibilidade da reação, o que nos levou a padronizar a qrtPCR utilizando marcadores que amplificam o fragmento do gene B1 (B1TgF-B1TgR) e do fragmento de 529 pb (RETgF-RETgR).

Portanto o objetivo geral deste trabalho tornou-se além de avaliar 2 marcadores moleculares para cnPCR, avaliar mais 2 marcadores moleculares para qrtPCR, padronizando esta técnica utilizando *FRET* na forma de *5' nuclease (TaqMan probes)*. Em ambas as etapas do estudo, o método controle foi a cnPCR utilizando-se o marcador B22-B23.

Na primeira etapa foram analisadas retrospectivamente, amostras de DNA extraídas de sangue provenientes de pacientes com aids e com diagnóstico clínico já estabelecido. Comparando os resultados dos 2 marcadores estudados com o B22-B23, obteve-se sensibilidades de 95.5%, 93.9% e 89.3%; especificidades de 97.2%, 88.9% e 91.7% respectivamente para B22-B23, TG1-TG2 e TOX4-TOX5. A associação de pelo menos 2 marcadores aumentou a sensibilidade e especificidade da técnica, e, os índices de concordância entre 2 marcadores variou de 83.3% à 93.1%.

Apesar de todos os marcadores apresentarem boa sensibilidade na detecção de *T. gondii*, B22-B23 ainda foi o melhor, achado semelhante a de Okay *et al.* (2009). A associação de 2 marcadores promoveu um pequeno aumento de sensibilidade e especificidade, porém demandou mais tempo e custo.

A correlação dos resultados da cnPCR com os da RIFI (PCR detectando a presença do parasito através de moléculas de DNA e a RIFI revelando a presença de anticorpos da classe IgG anti-*T. gondii*) evidenciou-se limitada. Diversos casos onde em uma mesma amostra se detectou o DNA do parasito pela cnPCR e uma total ausência de anticorpos IgG podem ser explicados como sendo resultado de uma infecção na fase final da aids, onde o paciente não produz resposta humoral devido ao comprometimento do sistema imunológico, ou, mais dificilmente uma infecção recém adquirida. A maioria dos estudos registra baixos índices imunológicos não reagentes em pacientes com aids (< 6%) (Skiest, 2002; Collazos, 2003; Vidal *et al.*, 2005; Meira *et al.*, 2008). Porém os resultados são variáveis. Porter e Sande (1992) e Hernández-González *et al.*, (2002) relataram percentuais de soronegatividade de 17% e 32%, respectivamente. Por outro, os resultados também demonstram que altos títulos de anticorpos não são necessariamente acompanhados de DNA dos parasitas circulantes, situação característica de fase crônica da doença ou de uma quantidade insuficiente de DNA do parasita para a amplificação.

Na segunda etapa deste estudo, a qrtPCR permitiu gerar resultados em menor tempo do que a cnPCR e com grande reprodutibilidade, além de nos proporcionar com menor carga de trabalho, menor índices de contaminação das reações (diminuindo o número de falsos resultados positivos), menor índices de erros na interpretação de resultados (subjetividade da interpretação visual em gel de agarose), além de permitir a quantificação da carga parasitária.

Como utilizou-se a qrtPCR com a tecnologia *TaqMan*, conseguiu-se aumentar ainda mais a sensibilidade da reação. Este ganho só foi possível, pois, na *FRET*, amostras com grandes quantidades de DNA não específico

produzem pouca interferência na reação (como no caso de amostras clínicas que possuem elevada concentração de DNA do próprio paciente), não necessitando serem diluídas (como no caso da cnPCR), e portanto não se arrisca diluir o DNA alvo, o que levaria a diminuição da sensibilidade da técnica (Bellete *et al.*, 2003).

Foram analisadas amostras de DNA extraídas de sangue e LCR provenientes de pacientes com aids, porém não foi possível obter os achados clínicos e radiológicos de todos os pacientes.

O diagnóstico molecular usando ambas as amostras biológicas é uma ferramenta útil para o diagnóstico precoce minimamente invasivo da toxoplasmose cerebral (Colombo *et al.*, 2005; Bretagne *et al.*, 2003; Bastien, 2002). A análise dos 2 materiais concomitantemente, permitiu visualizarmos os diferentes quadros laboratoriais encontrados em pacientes com aids. No entanto, os resultados devem ser interpretados em associação com as informações sorológicas, clínicas e radiológicas (Pereira-Chioccola *et al.*, 2009).

Assim nesta segunda parte analisaram-se prospectivamente as amostras clínicas dos 149 pacientes com confirmação de diagnóstico clínico e radiológico. Dos 20 pacientes que tinham sangue e de LCR coletadas simultaneamente, permitiu estabelecer uma melhor compreensão dos diferentes cenários de diagnóstico laboratorial e clínico. Esse pequeno grupo de pacientes serviu para ilustrar diferentes situações. Os resultados dos pacientes com toxoplasmose cerebral permitiram concluir que situações divergentes podem ser observadas na prática laboratorial e clínica desta infecção oportunista. Alguns pacientes podem ter um diagnóstico negativo molecular no LCR e positivo no sangue e os anticorpos anti-*T. gondii* podem ser variáveis. Outros podem apresentar diagnóstico molecular positivo no LCR e negativo no sangue, ou positivo nos dois fluídos e com altos índices de anticorpos anti-*T. gondii*. No entanto, uma pequena parcela destes pacientes pode apresentar testes sorológicos negativos. Segundo um estudo recente do Brasil, pacientes com quatro ou mais lesões cerebrais

apresentam maior positividade no diagnóstico molecular (Correia *et al.*, 2010).

Os pacientes com outras doenças oportunistas apresentaram diagnóstico molecular negativo em ambas as amostras clínicas, apesar de que alguns deles apresentaram anticorpos anti-*T. gondii* no soro ou em LCR. A análise do diagnóstico diferencial de lesões cerebrais expansivas em pacientes com aids é extremamente importante, pois determina a eficácia de um tratamento específico. A maioria das amostras analisadas neste estudo foi negativa (66,4%). cnPCR empregando o marcador B22/B23 tem mostrado alta sensibilidade como repetidamente demonstrado anteriormente, incluindo-se amostras brasileiras (Bretane, 2003; Vidal *et al.*, 2004, Colombo *et al.*, 2005, Okay *et al.* 2009; Correia *et al.* 2010). Alta especificidade também foi observada na qrtPCR usando o marcador B1Tg, cujo é o gene B1 como B22-B23. Estes dados confirmam outros estudos (Bretane, 2003; Reischl *et al.* 2003, Raffi *et al.*, 1997; Nagy *et al.* 2006, Okay *et al.* 2009; Correia *et al.* 2010), mas RETg, cuja região-alvo, é o fragmento de 529bp apresentou menor especificidade (88,8%) do que dois outros do gene B1.

6. CONCLUSÕES

- Marcadores tendo como alvo o gene B1 (especialmente B22-B23), apresentam alta especificidade, o que corrobora com trabalhos anteriores. Resultados similares também foram obtidos qrtPCR.
- Ainda que o número de cópias do DNA alvo presentes no genoma de *T. gondii* seja um fator essencial para se garantir uma alta sensibilidade, a especificidade é um fator de extrema importância. Diante disto, o marcador B22-B23 foi o mais indicado para o diagnóstico em pacientes imunocomprometidos.
- A utilização de marcadores tendo como alvo o fragmento de 529pb não trouxe grande vantagem na qrtPCR. Embora o marcador RETg tenha se mostrado muito sensível, apresentou baixa especificidade. Cerca de 10% amostras negativas para *T. gondii* foram positivas com este marcador, principalmente nas amostras sangue.
- A realização das três metodologias (RIFI, cnPCR e qrtPCR) numa mesma amostra clínica, permitiu a visualização de diferentes situações encontradas em pacientes imunodeprimidos. Pode se observar amostras onde se detectou o DNA do parasito pela cnPCR e uma total ausência de anticorpos IgG, e, amostras com altos títulos de anticorpos e sem a presença de DNA dos parasitas circulantes.
- A investigação concomitante no sangue e no LCR do mesmo paciente permitiu determinar que diferentes situações podem ocorrer no decurso da infecção.
- As principais vantagens da qrtPCR sobre a cnPCR foram a obtenção de resultados em menor tempo do que a cnPCR, a grande reprodutibilidade, a

quantificação da carga parasitária, e, a pouca interferência de amostras com grandes quantidades DNA não específico na sensibilidade da reação.

- Ainda que a qrtPCR permita um rápido diagnóstico laboratorial, alguns casos ainda apresentam discrepância entre os resultados desta metodologia com os da cnPCR. Assim, ambas as metodologias devem ser mantidas na rotina do diagnóstico molecular da toxoplasmose.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amato Neto V, Medeiros EAS, Levi GC, Duarte MIS. Toxoplasmose. 4.ed. São Paulo: Sarvier; 1995. 154.

Ammassari A, Cingolani A, Pezzotti P, De Luca A, Murri R, Giancola ML, Larocca LM, Antinori A. AIDS-related focal brain lesions in the era of highly active antiretroviral therapy. *Neurology*. 2000; 55: 1194-1200.

Antinori A, Ammassari A, De Luca A, Cingolani A, Murri R, Scoppettuolo G, *et al.* Diagnosis of AIDS-related focal brain lesions: A decision-making analysis based on clinical and neuroradiologic characteristics combined with polymerase chain reaction assays in CSF. *Neurology*. 1997; 48: 687-694.

Antinori A, Larussa D, Cingolani A, Lorenzini P, Bossolasco S, Finazzi MG, *et al.* Prevalence, associated factors, and prognostic determinants of AIDS-related toxoplasmic encephalitis in the era of advanced highly active antiretroviral therapy. *HIV/AIDS*. 2004; 39: 1681-1691.

Apfalter P, Reischl U, Hammerschlag MR. In-House nucleic acid amplification assays in research: How much quality control is needed before one can rely upon the results? *J Clin Microbiol*. 2005; 43: 5835-5841.

Bahia-Oliveira LM, Jones JL, Azevedo-Silva J, Alves CC, Oréfice F, Addiss DG. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro State, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2003; 9: 55-62.

Bastien P. Molecular diagnosis of toxoplasmosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2002; 96(Suppl 1), S205-215.

Bastien P, Procop GW, Reischl U. Quantitative Real-Time PCR Is Not More Sensitive than “Conventional” PCR. *J Clin Microbiol*. 2008; 46: 1897–1900.

Beamon MH, Luft BJ, Remington JS: Prophylaxis for toxoplasmosis in AIDS. *Ann Intern Med.* 1992; 117: 163-164.

Belleste B, Floria P, Hafidb J, Raberina H, Tran Manh Sung R. Influence of the quantity of nonspecific DNA and repeated freezing and thawing of samples on the quantification of DNA by the Light Cycler®. *J Microb Met.* 2003; 55: 213– 219.

Bichara C, Povia, M. Perfil da toxoplasmose em Belém. FUNASA: informativo do Instituto Evandro Chagas. 2001; março-abril; 2:8.

Bretagne S. Molecular diagnostics in clinical parasitology and mycology: limits of the current polymerase chain reaction (PCR) assays and interest of the real-time PCR assays. *Clin Microbiol Infect.* 2003; 9, 505-511.

Brindley PJ, Gazzinelli RT, Denkers EY, Davis SW, Dubey JP, Belfort Jr. R, *et al.* Differentiation of *Toxoplasma gondii* from closely related coccidia by riboprint analysis and a surface antigen gene polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 1993; 48: 447-456.

Buchbinder S, Blatz R, Rodloff AC. Comparison of real-time PCR detection methods for B1 and P30 genes of *Toxoplasma gondii*. *Diag Microb Infec Dis.* 2003; 45: 269–271.

Burg JL, Perelman D., Kasper LH, Ware PL. and Boothroyd JC. Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* 1988; 141: 3584–3591.

Burg JL, Grove CM. Pouletty P. and Boothroyd JC. Directed and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *J Clin Microb.* 1989; 27: 1787–1792.

Bushrod F. Toxoplasmosis: not just a risk during pregnancy. Clin Lab Inter. 2004; 28: 4.

Calderaro A, Piccolo G, Gorrini C, Peruzzi S, Zerbini L, Bommezzadri S, Dettori G, Chezzi C. Comparison between two Real-time PCR assays and a nested-PCR for the detection of *Toxoplasma gondii*. Acta Biomed. 2006; 77: 75-80.

Carruthers, VB. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. Acta Trop. 2002; 81: 111-122.

Cassaing S., Bessières M.H., Berry A., *et al.* Comparison between Two Amplification Sets for Molecular Diagnosis of Toxoplasmosis by Real-Time PCR. 2006. J Clin Microb; 44: 720-724.

Centers for Disease Control and Prevention. Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. 1993. JAMA; 1993; 10: 729-730.

Chabbert E, Lachaud L, Crobu L, Bastien P. Comparison of two widely used PCR primers systems for detection of *toxoplasma* in amniotic fluid, blood, and tissues. J Clin Microb. 2004; 42: 1719-1722.

Chandrasekar PH. Real-Time Polymerase Chain Reaction for Early Diagnosis of Toxoplasmosis in Stem Cell Transplant Recipients: Ready for Prime Time? Clin Infect Dis. 2005; 40: 79–81.

Cingolani A, De Luca A, Larocca LM, Ammassari A, Scerrati M, Antinori A, Ortoni L. Minimally invasive diagnosis of acquired immunodeficiency syndrome-related primary central nervous system lymphoma. J Natl Cancer Inst. 1998; 90: 364-369.

Cohen BA. Neurological manifestations of toxoplasmosis in AIDS. *Sem Neurol.* 1999; 19: 201-211.

Collazos J. Opportunistic infections of the CNS in patients with AIDS. *CNS Drugs* 2003; 17: 869-887.

Colombo FA, Vidal JE, Penalva de Oliveira AC, Hernández AV, Bonasser-Filho F, Nogueira RS, *et al.* Diagnosis of cerebral toxoplasmosis in AIDS patients in Brazil: importance of molecular and immunological methods using peripheral blood samples. *J Clin Microb.* 2005; 43: 5044-5047.

Contini C, Seraceni S, Cultrera R, Incorvaia C, Sebastiani A, Picot S. Evaluation of a Real-time PCR-based assay using the lightcycler system for detection of *Toxoplasma gondii* bradyzoite genes in blood specimens from patients with toxoplasmic retinochoroiditis. *Intern J Parasit.* 2005; 35: 275–283.

Correia C.C, Melo H.R.L. & Costa V. M.A. Influence of neurotoxoplasmosis characteristics on real-time PCR sensitivity among AIDS patients in Brazil *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2010; 104:24-28.

Costa JM, Pautas C, Ernault P, Foulet F, Cordonnier C, Bretagne S. Real-Time PCR for Diagnosis and Follow-Up of *Toxoplasma* Reactivation after Allogeneic Stem Cell Transplantation Using Fluorescence Resonance Energy Transfer Hybridization Probes. *J Clin Microb.* 2000; 38: 2929–2932.

Cozon GJ, Ferrandiz J, Nebhi H, Wallon M, Peyron F. Estimation of the avidity of immunoglobulin G for routine diagnosis of chronic *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women. *Eur J Clin Microb Infect Dis* 1998; 17: 32-36.

Dubey JP, Frenkel JK. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *J Protozool.* 1972; 1: 155-77.

Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachizoites, bradizoites, sporozoites and development of tissue cyst. *Clin Microb Rev.* 1988; 2: 267-269.

Dubey JP, Beattie CP. *Toxoplasmosis of animals and man.* Press 1988; 41-60.

Dubey JP. Toxoplasmosis - An overview. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1991; 22: 88-119.

Dubey JP. *Toxoplasma gondii.* In S. Baron, R.C. Peake, D.A. James, M.Susman, C.A. Kennedy, M.J.D. Singleton, and S.Schuenke (ed.), *Medical Microbiology*, 5th ed. The University of Texas. [on line] 1996; [acesso em 11 fev 2008]. Disponível em: URL: www.ncbi.nlm.nih.gov/books.

Dubey JP. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii.* *Int J Parasit* 1998; 7: 1019-1024.

Dupon M, Cazenave J, Pellegrin JL, Ragnaud JM, Cheyrou A, Fischer I, *et al.* Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR and tissue culture in cerebrospinal fluid and blood of human immunodeficiency virus-seropositive patients. *J Clin Microb.* 1995; 33: 2421-2426.

Dupouy-Camet J, De Souza SL, Maslo C, Paugam A, Saimot AG, Benarous R, *et al.* Detection of *Toxoplasma gondii* in venous blood from AIDS patients by polymerase chain reaction. *J Clin Microb.* 1993; 31: 1966-1969.

Edvinsson B, Jalal S, Nord CE, Pedersen BS, Evengård B; ECSMID Study Group on Toxoplasmosis.. DNA extraction and PCR assays for detection of *Toxoplasma gondii*. APMS. 2004; 112: 342-348.

Edvinsson B, Lappalainen M, Evengård B. Real-time PCR targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis. Clin Microb Infect. 2006; 12: 131-136.

Eggers C, Grob U, Klinker H, Schalke B, Stellbrink HJ, Kunze K. Limited value of cerebrospinal fluid for direct detection of *Toxoplasma gondii* in toxoplasmic encephalitis with AIDS. J Neurol. 1995; 242: 644-649.

Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, *et al*. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. J Clin Microb. 2006; 19: 165–256.

Fernandes GCVR, Azevedo RS, Amaku M, Yu ALF, Massad E. Seroepidemiology of Toxoplasma infection in a metropolitan region of Brazil. Ep Infect. [periódico on line] 2009; doi:10.1017/S0950268809 002799 [acesso em 28 agosto 2009]. Disponível em: <http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=5637600>

Ferreira MS. Infections by protozoa in immunocompromised hosts. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000; 95 (suppl I): 159-162.

Filice GA, Hitt JA, Mitchell CD, Blackstad M, Sorensen SW. Diagnosis of *Toxoplasma* parasitemia in patients with AIDS by gene detection after amplification with polymerase chain reaction. J Clin Microb 1993; 31: 2327-2331.

Filisetti D, Gorcii M, Pernot-Marino E, Villard O, Candolfi E. Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis: Comparison of Targets for Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR. J Clin Microb. 2003; 41: 4826-4828.

Flori P, Hafid J, Bourlet T, Raberin H, Genin C, Tran Manh Sung R. Experimental model of congenital toxoplasmosis in guinea-pigs: use of quantitative and qualitative PCR for the study of maternofetal transmission. *J Clin Microb.* 2002; 51: 871–878.

Franzen C, Altfeld M, Hegener P, Hartmann P, Arendt G, Jablonowski H, *et al.* Limited value of PCR for detection of *Toxoplasma gondii* in blood from human immunodeficiency virus-infected patients. *J Clin Microb* 1997; 35: 2639-2641.

Frenkel JK. Toxoplasmosis in and around us. *Bio Science.* 1973; 23: 343-352.

Fuentes I, Rodriguez M, Domingo CJ, Castillo F, Juncosa T, Alvar J. Urine Sample Used for Congenital Toxoplasmosis Diagnosis by PCR. *J Clin Microbiol.* 1996; 34: 2368–2371.

Glasner PD, Silveira C, Kruszon-Morau D, Martins MC, Burnier Junior M, Silveira S, *et al.* An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in Southern Brazil. *Am J Ophthalmol.* 1992; 144: 136-144.

Gray F, Keohane C. The neuropathology of HIV infection in the era of highly antiretroviral therapy (HAART). *Brain Pathol.* 2003; 13: 79-83.

Gross U, Bohne W, Soête M, Dubremetz JF. Developmental differentiation between tachyzoites and bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Today.* 1996; 12: 30-33.

Grover CM, Thulliez P, Remington JS, Boothroyd JC. Rapid prenatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2297-2301.

Gutiérrez J, Maroto C. Are IgG antibody avidity assays useful in the diagnosis of infectious disease? A review. *Microbios* 1996; 87: 113-121.

Guy EC, Joynson DH. Potential of the polymerase chain reaction in the diagnosis of active *Toxoplasma* infection by detection of parasite in blood. *J Infect Dis*. 1995; 172(1): 319-22.

Harrison MJ, McArthur JC. Opportunistic infections – parasites. In: Harrison MJ, McArthur JC, editors. *Clinical neurology and neurosurgery monographs. AIDS and neurology*. Edinburgh: Churchill Livingstone. 1995: 171-181.

Hedman K, Lappalainen M, Seppä I, Makela O. Recent primary *Toxoplasma* infection indicated by a low avidity of specific IgG. *J Infect Dis* 1989; 159: 736-740.

Hernández-González E, Zamora F, Barnés J, Bender JE, Rodríguez-Delgado F, *et al*. Manifestaciones clínicas de La toxoplasmosis cerebral em pacientes com sida. *Ver Neurol* 2002; 34: 618-621.

Hierl T, Reischl U, Lang P, Hebart H, Stark M, Kyme P, Autenrieth IB. Preliminary evaluation of one conventional nested and two real-time PCR assays for the detection of *Toxoplasma gondii* in immunocompromised patients. *J Med Microb*. 2004; 53: 629–632.

Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microb Infect*. 2002; 8: 634-640.

Hill DE, Chirukandoth S, Dubey JP. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Anim Health Res Rev*. 2005; 6: 41-61. Review.

Hitt JA, Filice GA. Detection of *Toxoplasma gondii* parasitemia by gene amplification, cell culture, and mouse inoculation. J Clin Microb. 1992; 30: 3181-3184.

Hofflin JM, Remington JS. Tissue culture isolation of *Toxoplasma* from blood of a patient with AIDS. Arch Intern Med 1985; 145: 925-926.

Hohlfeld P, Daffos F, Thulliez P, Aufrant C, Couvreur J, MacAleese J, *et al.* Fetal toxoplasmosis outcome of pregnancy and infant follow-up after in uterus treatment. J Pediatr. 1989; 115: 765-769.

Hohlfeld P, Daffos F, Costa JM, Thulliez P, Forestier F, Vidaud M. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase-chain-reaction test on amniotic fluid. N Engl J Med. 1994; 331: 695-699.

Holliman RE. Toxoplasmosis and the acquired immune deficiency syndrome. J Infect 1988; 16: 121-128.

Holliman RE, Raymond R, Renton N, Johnson JD. The diagnosis of toxoplasmosis using IgG avidity. Epidemiol Infect 1994; 112: 399-408.

Homan WL, Vercammenb M, De Braekeleer J, Verschueren H. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. Inter J Parasit 2000; 30: 69-75.

Jalal S, Nord CE, Lappalainen M, Evenga B. Rapid and sensitive diagnosis of *Toxoplasma gondii* infections by PCR. Clin Microb Infect. 2004; 10: 937-939.

James GS, Sintchenko VG, Dickeson DJ, Gilbert GL. Comparison of cell culture, mouse inoculation, and PCR for detection of *Toxoplasma gondii*:

effects of storage conditions on sensitivity. J Clin Microb 1996; 34: 1572-1575.

Jauregui LH, Higgins J, Zarlenga D, Dubey JP, Lunney JK. Development of a Real-Time PCR Assay for Detection of *Toxoplasma gondii* in Pig and Mouse Tissues. J Clin Microb. 2001; 39: 2065–2071.

Jenum PA, Stray-Pedersen B, Gundersen AG. Improved diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in early pregnancy by determination of anti-*toxoplasma* immunoglobulin G avidity. J Clin Microb. 1997; 35: 1972-1977.

Jenum PA, Holberg-Petersen M, Melby KK, Stray-Pedersen B. Diagnosis of congenital *Toxoplasma gondii* infection by polymerase chain reaction (PCR) on amniotic fluid samples. The Norwegian experience. APMIS. 1998; 106: 680-686.

Jones CD, Okhravi N, Adamson P, Tasker S, Lightman S. Comparison of PCR detection methods for B1, P30, and 18S rDNA genes of *T. gondii* in aqueous humor. Invest Ophthalmol. Vis. Sci. 2000; 41: 634-644.

Jones JL, Lopez A, Wilson M, Schulkin J, Gibbs R. Congenital toxoplasmosis: A review. Obstet Gyn Survey. 2001; 58: 296-305.

Joseph P, Calderon 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 Microb. 2002; 40: 4499-4503.

Joynton DH, Payne RA, Rawal BK. Potential role of IgG avidity for diagnosing toxoplasmosis. J Clin Pathol. 1990; 43: 1032-1033.

Khan EA, Correa AG. Toxoplasmosis of the central nervous system in non-human immunodeficiency virus-infected children: case report and review of the literature. *Pediatr Infect Dis J.* 1997; 16: 611-618.

Kompalic-Cristo A, Nogueira SA, Guedes AL, Frota C, Gonzalez LF, Brandão A, *et al.* Lack of technical specificity in the molecular diagnosis of toxoplasmosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2004; 98: 92-95.

Kravetz JD, Federman DG. Toxoplasmosis in pregnancy. *Am J Med.* 2005; 118: 212-216.

Kupferschmidt O, Kruger D, Held TK, Ellerbrok H, Siegert W, Janitschke K. Quantitative detection of *Toxoplasma gondii* DNA in human body fluids by TaqMan polymerase chain reaction. *Clin Microb Infect* 2001; 7: 120-124.

Lachaud L, Chabbert E, Dubessay P, Reynes J, Lamothe J, Bastien P. Comparison of Various Sample Preparation Methods for PCR Diagnosis of Visceral Leishmaniasis Using Peripheral Blood. *J Clin Microb.* 2001; 39: 613–617.

Lee C.N., Cavanagh H.M., Lo S.T. and Ng C.S. Human papillomavirus infection in non-neoplastic uterine cervical disease in Hong Kong. *Brit J Biomed Sci.* 2001; 58: 85–91.

Leport C, Franck J, Chene G, Derouin F, Ecobichon JL, Pueyo S, *et al.* Immunoblot profile as predictor of toxoplasmic encephalitis in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin Diag Lab Immunol.* 2001; 8: 579-584.

Levine ND, Corliss JO, Cox FEG, Deroux G, Grain J, Honigberg BM, *et al.* A newly revised classification of the Protozoa. *J Protozol.* 1980; 27: 37-58.

Lin MH, Chen TC, Kuo TT, Tseng CC, Tseng CP. Real time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. J Clin Microb. 2000; 38: 4121-4125.

Liesenfeld O, Wong SY, Remington JS. Toxoplasmosis in the setting of AIDS. In: Bartlett JG, Merigan TC, Bolognesi D, eds. Textbook of AIDS medicine, 2 ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1999. 225-59.

Liesenfeld O, Montoya JG, Kinney S, Press C, Remington JS. Effect of testing for IgG avidity in the diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women: experience in a US reference laboratory. J Infect Dis. 2001; 183: 1248-1253.

Luft BJ, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis. Clin Infect Dis. 1992; 15: 211-222.

Luft BJ, Hafner R, Korzun AH, Leport C, Antoniskis D, Bosler EM, *et al*. Toxoplasmic encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome - Members of the ACTG 077p/ANRS 009 Study Team. N Engl J Med. 1993; 329: 995-1000.

Luft BJ, Chua A. Central Nervous System toxoplasmosis in HIV: pathogenesis, diagnosis, and therapy. Curr Infect Dis Rep 2000; 2: 358-362.

Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin Microb Infect. 2004; 10: 190–212.

Mamidi A, DeSimone JA, Pomerantz RJ. Central nervous system infections in individuals with HIV-1 infection. J Neurovirol. 2002; 8: 158-167.

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 Microb Infect Dis* 2001; 20: 410-413.

Marins JR, Jamal LF, Chen SY, Barros MB, Hudes ES, Barbosa AA, *et al.* Dramatic improvement in survival among adult Brazilian AIDS patients. *AIDS*. 2003; 17: 1675-1682.

Maubon D, Brenier-Pinchart MP, Fricker-Hidalgo H, Pelloux H. Real-time PCR in the diagnosis of toxoplasmosis: the way to standardisation?. *Pathol Biol*. 2007; 55: 304–311.

Mei-Huil L, Tse-Ching C, Tseng-Tong K, Ching-Chung T, Ching-Ping T. Real-Time PCR for Quantitative Detection of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microb*. 2000; 38: 4121-4125.

Meira CS, Costa-Silva TA, Vidal JE, Ferreira IMR, Hiramoto RM, Pereira-Chiocola VL. Use of the serum reactivity against *Toxoplasma gondii* excreted–secreted antigens in cerebral toxoplasmosis diagnosis in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Med Microb*. 2008; 57, 845–850.

Menotti J, Garin YJF, Thulliez P, Serugue MC, Stanislawiak J, Ribaud P, de Castro N, Houze S, Derouin F. Evaluation of a new 5´ nuclease real-time PCR assay targeting the *Toxoplasma gondii* AF146527 genomic repeat. *Clin Microb Infec* [periódico on line] 2009; 10.1111/j.1469-0691.2009.02809.x [acesso em 20 maio 2009]. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19519844?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DefaultReportPanel.Pubmed_RVDocSum.

Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico - Aids e DST. [periódico on line] 2008; [acesso em 06 ago 2009]. Disponível em: <http://www.AIDS.gov.br/>

Ministério da Saúde. Dados e pesquisas em DST e AIDS. [periódico on line] 2006; [acesso em 06 nov 2009]. Disponível em: <http://www.AIDS.gov.br/data/Pages/LUMISD3352823PTBRIE.htm>

Montoya JG, Remington JS. Toxoplasmic chorioretinitis in the setting of acute acquired toxoplasmosis. *Clin Infec Dis*. 1996; 23: 277-282.

Montoya JG, Parmley S, Liesenfeld O, Jaffe GJ, Remington JS. Use of the polymerase chain reaction for diagnosis of ocular toxoplasmosis. *Ophthalmology*. 1999; 106: 1554-1563.

Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *The Lancet*. 2004; 363: 1965-1976.

Nagy B., Ban Z., Beke A., Nagy G. R., Lazar L., Papp C., Toth-Pal E. & Papp Z. Detection of *Toxoplasma gondii* from amniotic fluid, a comparison of four different molecular biological methods. *Clin. Chim.* 2006; *Acta* 368,131-137.

Nobrega OT, Karnikowski MGO. An estimation of the frequency of gestational toxoplasmosis in the Brazilian Federal District. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005; 38: 358–360.

Okay TS, Yamamoto L, Oliveira LC, Manuli ER, Andrade Junior HF, Del Negro GMB. Significant performance variation among PCR systems in diagnosing congenital toxoplasmosis in São Paulo, Brazil: Analysis of 467 amniotic fluid samples. *CLINICS*. 2009; 64: 171-176.

Oksenhendler E, Charreau I, Tournerie C, Azihary M, Carbon C, Aboulker JP. *Toxoplasma gondii* infection in advanced HIV infection. *AIDS*. 1994; 8: 483-487.

Pappas G, Roussos N, Falagas ME. Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *Int J Paras* [periódico on line] 2009; doi:10.1016/j.ijpara.2009.04.003 [acesso em 15 maio 2009]. Disponível em: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T7F-4W7YXX8-&_user=3717590&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=&view=c&_acct=C000061202&_version=1&_urlVersion=0&_userid=3717590&md5=98fe90ae2284c52eeddb7fd7c517ef49.

Pelloux H, Guy E, Angelici MC, Aspoëck H, Bessieéres ME, Blatz R , *et al.* A second European collaborative study on polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii*, involving 15 teams. *FEMS Microbiol Letters*. 1998; 165: 231-237.

Pereira-Chioccola VL, Vidal JE, Su C. *Toxoplasma gondii* infection and cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients. *Future Microbiology*. 2009; 4,10: 1363-1379.

Pinon JM, Dumon H, Chemla C, Franck J, Petersen E, Lebech M, *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 Microb*. 2001; 39: 2267- 2271.

Portegies P, Solod L, Cinque P, Chaudhuri A, Begovac J, Everall I, *et al.* Guidelines for the diagnosis and management of neurological complications of HIV infection. *Eur J Neurol*. 2004; 11: 297-304.

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

Raffi F., Aboulker J.P., Michelet C., Reliquet V., Pelloux H., Huart A., Poizot-Martin I., Morlat P., Dupas B., Mussini J.M., Lepout C. 1997.

Reischl U., Bretagne S., Kruger D., Ernault P. & Costa J. M. Comparison of two DNA targets for the diagnosis of Toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. BMC Infect. 2003; Dis. 3, 7.

Reischl U, Bretagne S, Krüger D, Ernault P, Costa JM. Comparison of two DNA targets for the diagnosis of Toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. BMC Infect Dis [periódico on line] 2009; 3:7 [acesso em 05 junho 2009]. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/3/7>.

Remington JS & Klein JO. Infections diseases of the fetus and newborn infant. 4^a ed. WB Saunders Company. 1995: 140-268.

Remington 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. 2001; 205-346.

Remington, J. S.; Thulliez, P.; Montoya, J. G. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. J Clin Microb. 2004; 42: 941-945.

Renold C, Sugar A, Chave JP, Perrin L, Delavelle J, Pizzolato G, *et al.* *Toxoplasma* encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Medicine 1992; 71: 224-239.

Rey L. *Toxoplasma gondii* e Toxoplasmose. In: Parasitologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. 321-334.

Roberts F, McLeod R. Pathogenesis of toxoplasmic retinochoroiditis. *Parasit Today*. 1999; 15: 51-57.

Romand S, Chosson M, Franck J, Wallon M, Kieffer F, Kaiser K, *et al.* Usefulness of quantitative polymerase chain reaction in amniotic fluid as early prognostic marker of fetal infection with *Toxoplasma gondii*. *American J Obst Gynecol*. 2004; 190 : 797-802.

Rondanelli EG, Senaldi G, Strosselli M, Brustia R, Parisi A, Scaglia M. Dynamic and ultrastructural studies of in vitro interaction between *Toxoplasma gondii* and cultured cell lines. I. Adhesion and cellular penetration. *Boll Ist Sieroter Milan*. 1986; 65: 193-203.

Sabin AB, Feldman HA. Dyes as microchemical indicators of new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite *Toxoplasma*. *Science* 1948; 108: 660-663.

Sacktor N, Lyles RH, Skolasky R, Kleeberger MA, Selnes OA, Miller EN, *et al.* HIV-associated neurologic disease incidence changes: Multicenter AIDS Cohort Study, 1990-1998. *Neurology*. 2001; 56: 257-260.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press. 1989.

Sensini A. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy: opportunities and pitfalls of serological diagnosis. *Clin Microb Infect*. 2006; 12: 504 -512.

Simpson D, Tagliati M. Neurologic manifestation of HIV infection. *Ann Intern Med*. 1994; 121: 769-785.

Skiest DJ. Focal neurological disease in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 103-115

Suzuki Y. Immunopathogenesis of cerebral toxoplasmosis. J Infect Dis. 2002; 186: 234-240.

Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Inter J Parasit. 2000; 30:1217-1258.

Teo IA, Choi JW, Morlese J, Taylor G, Shaunak S. LightCycler qPCR optimisation for low copy number target DNA. JIM. 2002; 270: 119– 133.

UNAIDS – Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. [periódico on line] 2008; [acesso em 05 abril 2009]. Disponível em: http://data.unAids.org/pub/GlobalReport/2008/jc1510_2008_global_report_pp211_234_en.pdf.

Vidal JE, Penalva de Oliveira AC, Hernandez AV. Prognostic factors of clinical response in patients with toxoplasmic encephalitis and AIDS in the HAART era. J Neurovirol. 2003; 60:16-17.

Vidal JE, Colombo FA, Penalva de Oliveira AC, Focaccia R, Pereira-Chiocola VL. PCR assay using cerebrospinal fluid for diagnosis of cerebral toxoplasmosis in Brazilian AIDS patients. J Clin Microb. 2004; 42: 4765-4768.

Vidal JE, Hernandez AV, Penalva de Oliveira AC, Dauar R, Barboza SP, 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; 19: 840-848.

Vidal JE, Penalva de Oliveira AC, Fink MCDS, Pannuti CS, Trujillo JR. Aids-related progressive multifocal leukoencephalopathy: a retrospective study in a referral center in São Paulo, Brazil. Rev Inst Med trop SP. 2008; 50(4):209-212.

Wahab T, Edvinsson B, Palm D, Lindh J. (2009). Comparison of two real-time PCR targets used for detection of *Toxoplasma gondii*; the AF146527 and B1 repeated elements. J Clin Microb 25, in press.

Whiley DM, Mackay IM, Sloots TP. Detection and Differentiation of Human Polyomaviruses JC and BK by LightCycler PCR. J Clin Microb. 2001; 39: 4357–4361.

Wong SY, Remington JS. Biology of *Toxoplasma gondii*. AIDS 1993; 7: 299-316.

8. ANEXOS

8.1. Parecer da Comissão de Ética do Instituto Adolfo Lutz



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
DIVISÃO DE BIOLOGIA MÉDICA

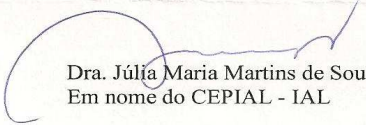


São Paulo, 29 de outubro de 2007.


**PRÉ – PARECER - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO INSTITUTO
ADOLFO LUTZ - CEPIAL**

Venho por meio desta, informar que o Projeto **DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA TOXOPLAMOSE: COMPARAÇÃO DE DIFERENTES MARCADORES UTILIZADOS NA PCR PARA DETERMINAÇÃO DE T.gondii EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS**, sob a coordenação da **Dra. VERA LÚCIA PEREIRA CHIOLLA** não apresenta problemas de caráter ético em concordância com a Resolução 196/96-CNS/MS e aguarda a nova efetivação do CEPIAL para a emissão do Parecer Definitivo.

Atenciosamente


Dra. Júlia Maria Martins de Souza Felipe
Em nome do CEPIAL - IAL

8.2. Parecer da Comissão de Ética da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

 **FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO**
Autarquia Estadual - Lei n.º 8699 de 27/09/94
(Reconhecida pelo Decreto Federal n.º 74.179 de 14/06/74)


Parecer n.º 295/2008

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Protocolo nº 4534/2008 sob a responsabilidade de Luiz Carlos de Mattos com o título "Diagnóstico laboratorial da toxoplasmose com enfoque nas infecções congênicas e cerebral" está de acordo com a resolução CNS 196/96 e foi aprovado por esse CEP.

Lembramos ao senhor(a) pesquisador(a) que, no cumprimento da Resolução 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.

São José do Rio Preto, 11 de agosto de 2008.


Prof. Dr. Antônio Carlos Pires
Coordenador do CEP/FAMERP

Av. Brinário Faria Lima, 5416 - 15090-000 - São José do Rio Preto - SP - Brasil

8.3. Aprovação no Concelho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
CTC / IAL



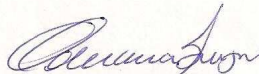
Projeto nº 0008D-BM10732/2008

Diagnóstico laboratorial da toxoplasmose: comparação de diferentes marcadores moleculares utilizados na PCR para determinação de *T. gondii* em amostras biológicas

Coordenação: Vera Lúcia Pereira Chioccola

Senhora Coordenadora,

Comunicamos que o projeto supra citado foi **cadastrado** no Conselho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz, após aprovação quanto o mérito científico pela CCD-BM e quanto a avaliação dos aspectos éticos pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.


ADRIANA BUGNO
Presidente do CTC/IAL

São Paulo, 17 de Novembro de 2008