Universidade de São Paulo
Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

Lilian Muniz Camilo

Diagnóstico molecular da toxoplasmose sintomática: um estudo
retrospectivo e prospectivo de 9 anos num laboratório de referência no
Estado de São Paulo

Dissertação apresentada ao Instituto de Medicina
Tropical da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde
Internacional

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lucia Pereira-Chiocola

São Paulo
2017

Lilian Muniz Camilo

Diagnóstico molecular da toxoplasmose sintomática: um estudo
retrospectivo e prospectivo de 9 anos num laboratório de referência no
Estado de São Paulo

Dissertação apresentada ao Instituto de
Medicina Tropical da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Área de concentração: Doenças Tropicais e
Saúde Internacional

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lucia
Pereira-Chioccola

São Paulo
2017

Ficha catalográfica
Preparada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da
Universidade de São Paulo
© Reprodução autorizada pelo autor

Camilo, Lilian Muniz

Diagnóstico molecular da toxoplasmose sintomática: um estudo retrospectivo e prospectivo de 9 anos num laboratório de referência no Estado de São Paulo / Lilian Muniz Camilo. – São Paulo, 2017.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Vera Lúcia Pereira-Chioccolla

Descritores: 1. TOXOPLASMA GONDII. 2. TOXOPLASMOSE. 3. DIAGNÓSTICO. 4. REAÇÃO EM CADEIA POR POLIMERASE.

USP/IMTSP/BIB-16/2017.

*Dedico este trabalho aos meus pais **Ademar** e **Lourdes** pelos cuidados, por acreditarem na minha capacidade, me apoiarem, investirem em mim. Ao meu irmão **Luan** pelo apoio incondicional em todos os momentos. Vocês são essenciais na minha vida, e permitiram com que eu atingisse essa conquista.*

AGRADECIMENTOS

À **Dra. Vera Lúcia Pereira Chioccola**, por acreditar no meu potencial e aceitar me orientar, pela dedicação, incentivo, amizade, confiança e contribuir grandiosamente para meu aprendizado;

À **Dra. Cristina da Silva Meira-Strejevitch** por compartilhar conhecimentos, pelo apoio, incentivo, amizade e momentos de descontração;

Ao meu noivo **Wallace Almeida** por estar sempre ao meu lado, pelo apoio incondicional em todos os momentos, incentivo e amizade.

Aos colegas e colaboradores desse estudo: **Cinara de Cássia Brandão de Mattos**, **Luiz Carlos Brandão de Mattos** (FAMERP), **Jose Ernesto Vidal** (IIER/FMUSP/ LIM-IMT), **Cristina Takami Kanamura** (IAL), **Fábio Batista Frederico** (HB), **Lígia Cosentino Junqueira Franco Spegiorin** e **Marcia Wakai Catelan** (FAMERP / HCM-SJRP) e **Deusenía Machado Ulisses Barbosa** (FAMERP) pelo apoio técnico e fornecimento de amostras biológicas de pacientes com toxoplasmose.

Ao **Laboratório de Biologia Molecular da Imunologia** (IAL) pelo apoio técnico e por nos permitir o uso do aparelho *ABI 7300 Real-time PCR System*;

Aos meus amigos funcionários do laboratório de Biologia Molecular de Parasitas e Fungos, **Cida Perez**, **Maria Margarete**, **Ricardo Gava** e **Jeferson Rodrigues** pela amizade, companheirismo, momentos de descontração e por todo conhecimento compartilhado, que foi muito importante para meu aprendizado; A companhia de vocês tornaram minhas estadias mais agradáveis no laboratório.

Aos meus amigos e companheiros de estudo, **Daise Carnietto**, **Kate Brigente**, **Luiz Fernando**, **Marta Marques** e **Valéria Oliveira** pela amizade, por todo apoio, por compartilharem conhecimentos, momentos de descontração e companheirismo que foi fundamental para a estadia diária no laboratório. Obrigada pela valiosa amizade;

Aos **funcionários e alunos do Núcleo de Parasitologia e Micologia** (IAL) pela amizade e compartilharem conhecimentos. Aprendi muito com cada um de vocês;

Ao **programa de pós-graduação do Instituto de Medicina Tropical da USP**, corpo docente, direção e administração, por todo aprendizado e apoio fornecido.

Ao **Carlos José Quinteiro**, bibliotecário chefe da biblioteca do IMT, pela revisão da dissertação e esclarecimento de dúvidas.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (Capes) pelo financiamento deste trabalho

“Se eu vi mais longe, foi por estar em ombros de gigantes.”

Isaac Newton

Lilian Muniz Camilo teve apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de
Pessoal de Nível Superior (CAPES) do Ministério da Educação.

RESUMO

Camilo LM. Diagnóstico molecular da toxoplasmose sintomática: um estudo retrospectivo e prospectivo de 9 anos num laboratório de referência no Estado de São Paulo. [dissertação]. São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2017.

As formas sintomáticas de toxoplasmose são um grave problema de saúde pública e ocorrem em cerca de 10 a 20% das pessoas infectadas. Com o objetivo de melhorar o diagnóstico molecular de toxoplasmose sintomática em pacientes brasileiros, este estudo avaliou o desempenho da PCR em tempo real (qPCR) na detecção do DNA de *T. gondii* testando dois conjuntos de iniciadores moleculares (B1 e REP-529) para diagnóstico molecular. A metodologia foi testada em 807 amostras clínicas com diagnóstico clínico conhecido, ELISA e PCR convencional (cPCR) em um período de 9 anos. Todas as amostras foram de pacientes com suspeita clínica de diferentes formas da toxoplasmose. De acordo com a curva mínima de limite de detecção (no C_T), o REP-529 apresentou maior sensibilidade para detectar DNA de *T. gondii* do que B1. Ambos os conjuntos de iniciadores moleculares foram avaliados retrospectivamente usando o DNA de 515 amostras clínicas diferentes. Os 122 pacientes com resultado negativo na PCR em tempo real, provavelmente por terem infecção crônica, demonstraram alta especificidade (REP-529, 99,2% e B1, 100%). Das 393 amostras com ELISA positivo (IgG), 146 apresentaram diagnóstico clínico de toxoplasmose e cPCR positivo. As sensibilidades de REP-529 e B1 foram de 95,9% e 83,6%, respectivamente. A comparação dos desempenhos do REP-529 e B1 foi analisada prospectivamente em 292 amostras. Assim, a partir de um total de 807 amostras de DNA analisadas, 217 (26,89%) apresentaram PCR positivo, pelo menos em um conjunto de iniciadores e com toxoplasmose sintomática confirmada pelo diagnóstico clínico. O REP-529 foi positivo em 97,23%, enquanto o B1 amplificou apenas 78,80%. Depois de comparar várias amostras em um laboratório brasileiro de referência, este estudo concluiu que o conjunto de iniciadores REP-529 apresentou

melhor desempenho do que B1. Essas observações foram baseadas após o uso de casos com diagnóstico clínico definido, ELISA e cPCR.

Descritores: *Toxoplasma gondii*. Toxoplasmose. Diagnóstico. Reação em cadeia por polimerase.

ABSTRACT

Camilo LM. Molecular diagnosis of symptomatic toxoplasmosis: a retrospective and prospective 9-year study in a reference laboratory in São Paulo State. [dissertation]. São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2017.

Symptomatic forms of toxoplasmosis are a serious public health problem and occur in around 10-20% of the infected people. Aiming to improve the molecular diagnosis of symptomatic toxoplasmosis in Brazilian patients, this study evaluated the performance of real time PCR (qPCR) in detecting *T. gondii* DNA testing two primer sets (B1 and REP-529) for molecular diagnosis. The methodology was assayed in 807 clinical samples with known clinical diagnosis, ELISA, and conventional PCR (cPCR) results in a 9-year period. All samples were from patients with clinical suspicion of several features of toxoplasmosis. According to the minimum detection limit curve (in C_T), REP-529 had greater sensitivity to detect *T. gondii* DNA than B1. Both primer sets were retrospectively evaluated using 515 DNA from different clinical samples. The 122 patients without toxoplasmosis (with negative real-time PCR) provided high specificity (REP-529, 99.2% and B1, 100%). From the 393 samples with positive ELISA (IgG), 146 had clinical diagnosis for toxoplasmosis and positive cPCR. REP-529 and B1 sensitivities were 95.9% and 83.6%, respectively. Comparison of REP-529 and B1 performances was further analyzed prospectively in 292 samples. Thus, from a total of 807 DNA analyzed, 217 (26.89%) had positive PCR with, at least one primer set and with symptomatic toxoplasmosis confirmed by clinical diagnosis. REP-529 was positive in 97.23%, whereas B1 amplified only 78.80%. After comparing several samples in a Brazilian referral laboratory, this study concluded that REP-529 primer set had better perform than B1 one. These observations were based after using cases with defined clinical diagnosis, ELISA, and cPCR.

Descriptors: *Toxoplasma gondii*. Toxoplasmosis. Diagnosis. Polymerase chain reaction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Toxoplasma gondii</i> em fluido ascítico de camundongo.....	18
Figura 2. Cisto tecidual contendo bradizoítos.....	19
Figura 3. (A) Oocisto esporulado e (B) não esporulado de amostras de fezes de gato.....	20
Figura 4. Ciclo de Vida de <i>T. gondii</i> : (A) hospedeiro definitivo e (B) hospedeiro intermediário.....	22
Figura 5. Gel de agarose para diagnóstico da toxoplasmose. Peso molecular 100 pb, controles positivo (CP), negativo (CN) e sete amostras.....	31
Figura 6. Desenhos e localização dos genes e dos iniciadores utilizados neste estudo. (A) cPCR (B22-B23), (B) qPCR B1 e (C) qPCR REP-529.....	42
Figura 7. Curva padrão para REP-529 (A) e B1 (B) para a detecção de DNA de <i>T. gondii</i>	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Seleção de iniciadores moleculares utilizados nesse estudo.....	41
Tabela 2. Resultados de qPCR utilizando os iniciadores moleculares REP-529 e B1. Estudo retrospectivo realizado em 515 amostras de DNA provenientes de pacientes com diagnóstico confirmado pelas análises clínica, ELISA e cPCR (B22-B23)	48
Tabela 3. Características das amostras clínicas, percentual de sensibilidades de REP-529 e B1 considerando as 217 amostras positivas.....	50
Tabela 4. Resultados clínicos e de PCR das 807 amostras clínicas analisadas.....	51
Tabela 5. Comparação entre valores médios de C_T obtidos com REP-529 e B1 qPCR considerando as 217 amostras positivas.....	53
Tabela 6. Índice de concordância entre três iniciadores para detecção de <i>T. gondii</i> em amostras clínicas.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PCR - Reação de Polimerase em Cadeia

cPCR - Reação em cadeia da polimerase convencional

qPCR - Reação em cadeia da polimerase em tempo real

LCR - Líquido cefalorraquidiano

SG - Sangue

LA - Líquido amniótico

AU - Fragmento de autópsia

FFPE - Fixados em formalina e embebidos em parafina

C_T - Limiar do ciclo

FAM - 6-carboxifluoresceína

EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético

DNA- ADN Ácido desoxirribonucleico

pb – Pares de base

PBS – Solução salina tamponada com fosfato

18S - Subunidade do RNA ribossomal

RNA – ARN Ácido ribonucleico

D.O. - Densidade ótica

ELISA - Ensaio imunoenzimático

et al. - e colaboradores

IgG - Imunoglobulina da classe G

Taq-polimerase - *Thermophillus aquaticus*

Cepa RH- Cepa de *Toxoplasma gondii* altamente virulenta

Células VERO- Células extraídas de macaco verde africano

LISTA DE SÍMBOLOS OU FÓRMULAS

mL – mililitro

μM - micrometro

nm – Nanômetro

°C - grau Celsius

μL - microlitro

μM - Micromolar

pg - picogramas

pH - potencial hidrogeniônico

mL - mililitro(s)

mM – milimolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Histórico	16
1.2 Epidemiologia	17
1.3 Morfologia	18
1.3.1 Taquizoítos	18
1.3.2 Cistos e bradizoítos	19
1.3.3 Oocistos	20
1.4 Ciclo biológico.....	21
1.5 Formas da doença	23
1.5.1 Toxoplasmose imunocompetentes.....	23
1.5.2 Toxoplasmose ocular.....	23
1.5.3 Toxoplasmose congênita.....	24
1.5.4 Toxoplasmose em imunocomprometidos.....	25
1.5.5 Toxoplasmose disseminada.....	26
1.6 Diagnóstico	27
1.6.1 Diagnóstico sorológico.....	27
1.6.2 Diagnóstico molecular.....	28
1.6.2.1 PCR convencional (cPCR).....	29
1.6.2.2 PCR em tempo real (qPCR).....	31
1.7 Justificativa.....	32
2 OBJETIVOS.....	33
2.1 Objetivo geral.....	33
2.2 Objetivos específicos	33
3 MATERIAIS MÉTODOS	34
3.1 Considerações éticas.....	34
3.2 Amostras biológicas	34
3.3 Antígeno de <i>T. gondii</i> e diagnóstico sorológico	36
3.3.1 Antígeno	36
3.3.2 Diagnóstico sorológico.....	36

3.4 Extração de DNA	37
3.5 cPCR: Iniciadores moleculares, controle interno e eletroforese em gel de agarose	38
3.6 qPCR: Iniciadores moleculares e controle interno.....	39
3.7 Análise da curva padrão de REP-529 e B1	43
3.8 Qualidade das reações e análise de dados.....	43
4. RESULTADOS	45
4.1 Padronização dos iniciadores moleculares REP-529 e B1 em DNA de taquizoítos	46
4.2 Amostras clínicas avaliando o desempenho de REP-529 e B1 em qPCR.....	47
5 DISCUSSÃO.....	55
6 CONCLUSÃO.....	60
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
ANEXO A – Aprovação no Comitê de Ética Humana CONEP-IAL/SES, número 815489 sob título “Otimização e validação do diagnóstico molecular da toxoplasmose em um laboratório de Saúde Pública”.....	76
ANEXO B – Artigo científico: Molecular diagnosis of symptomatic toxoplasmosis: a 9-year retrospective and prospective study in a referral laboratory in São Paulo, Brazil.	77

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

Toxoplasma gondii é um parasita intracelular obrigatório capaz de infectar uma ampla variedade de animais de sangue quente ^{1,2}, pertence ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, subclasse Coccidia, ordem Euccocidia e Família Sarcocystidae ³. O nome *Toxoplasma* (toxon = arco, plasma = forma) refere-se a forma morfológica de meia lua encontrada no estágio de taquizoíto ⁴. Os integrantes do filo Apicomplexa são caracterizados por estágios diferenciados altamente invasivos e possuem uma estrutura subcelular chamada complexo apical com papel importante na invasão celular ⁵.

Em 1908 Splendore descreveu esse parasita que parasitava um coelho de laboratório em São Paulo, Brasil. Neste mesmo ano, praticamente simultaneamente, no Instituto Pasteur da Tunísia, os pesquisadores Nicolle e Manceaux descreveram um microorganismo similar ao descrito por Splendore em células mononucleares de baço e fígado de um roedor norte-africano denominado *Ctenodactylus gundi*.⁶

Casos da doença humana passaram a ser descritos: Em 1923, Janku, observou lesões oculares em um paciente, em 1937 Wolf e Cowen, relataram casos de crianças que provavelmente se infectaram por transmissão congênita. No Brasil tivemos importantes contribuições ao conhecimento. Em 1927 Torres fez as primeiras descrições anatomo-patológicas da doença, e em 1956, Delascio, com informações detalhadas sobre a forma congênita. Em 1948, por Sabin e Feldman, foi possível associar as várias apresentações clínicas à etiologia por *T. gondii* através do desenvolvimento do teste sorológico do corante ⁷.

1.2 Epidemiologia

A toxoplasmose acomete cerca de dois bilhões de pessoas no mundo ^{8, 9, 10}. É uma zoonose de ampla distribuição geográfica, afetando cerca de um terço da população mundial ^{2, 9}. A estimativa de soroprevalência varia de 11% no EUA ¹¹ à 70% no Brasil ^{10, 12}. Dados de Pinon *et al.* ¹³ mostram que na Europa a soroprevalência varia de menos de 20% ao norte e mais de 60% ao sul ¹². Em São Paulo, se tratando de toxoplasmose gestacional, 64,4% das gestantes estão infectadas ¹⁴.

Pela capacidade desse parasita apresentar vários mecanismos de transmissão como ingestão de cistos presentes em carnes cruas ou mal cozidas, ingestão de oocistos presentes em fezes de felinos que contaminam alimentos e água, manipulação de terra contaminada com oocistos, entre outros, há uma grande dispersão desse parasita ^{15, 16}. ¹⁷. Estes fatores podem ser as causas das altas prevalências de anticorpos anti – *T. gondii* em grupos humanos com hábitos, costumes e etnias bem diferentes, sendo dependentes do grau e da frequência de exposição aos referidos fatores ¹⁸.

T. gondii infecta diversas espécies de vertebrados como aves e morcegos, herbívoros, carnívoros, mamíferos marinhos e o homem ^{9, 19}. Somente nos felinos observa-se a multiplicação parasitária por processo sexual, pois os mesmos são os únicos hospedeiros definitivos. Os demais animais, inclusive o homem, são considerados hospedeiros intermediários, onde ocorre somente a multiplicação parasitária assexuada ²⁰.

A infecção humana geralmente é assintomática, e é adquirida pela ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cistos teciduais, pela água ou alimentos contaminados com oocistos eliminados nas fezes de felinos. Estas características biológicas, somadas aos hábitos de alimentação e higiene, padrões culturais da população, faixa etária e procedência urbana ou rural estão estritamente relacionados com a variabilidade da soroprevalência da doença nas diferentes regiões, assim como a rota de infecção oral é a maior forma de contaminação ^{2, 8, 9, 21, 22}.

Nos animais, a toxoplasmose causa abortos, natimortos, perdas neonatais em todos os tipos de criação, especialmente em ovelhas e cabras, promovendo grandes perdas econômicas no mundo ²³.

1.3 Morfologia

Há três estágios infectantes de *T. gondii*: os taquizoítos (livres), os bradizoítos (em cistos teciduais) e os esporozoítos (em oocistos) ^{24, 25}. Essas três formas apresentam organelas citoplasmáticas características do filo Apicomplexa que constituem o complexo apical: conóide, anéis polares, microtúbulos subpeliculares, roptrias, micronemas e grânulos densos ^{24, 26}.

1.3.1 Taquizoítos

Os taquizoítos são formas de multiplicação rápida em quaisquer células do hospedeiro intermediário e nas células do epitélio intestinal do hospedeiro definitivo, presentes em grande número nas infecções agudas. A Figura 1 mostra os taquizoítos que se apresentam em formato de meia lua e medem cerca de 6 µm de comprimento por 2 µm de largura. Entram na célula hospedeira por penetração ativa e após a entrada, se tornam ovóides e envoltos por um vacúolo parasitóforo, o qual se acredita ser derivado de moléculas do parasita e da célula hospedeira ⁴. No interior do vacúolo parasitóforo, os taquizoítos se encontram protegidos dos mecanismos de defesa da célula ²⁴. Multiplicam-se assexuadamente dentro da célula hospedeira por repetidas endodigenias até a ruptura celular. Este processo continua até o desenvolvimento da imunidade do hospedeiro frente ao parasita ^{4, 24, 27}.

Figura 1- *Toxoplasma gondii* em fluido ascítico de camundongo.

Fonte: <https://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/index.html> ²⁸

1.3.2 Cistos e Bradizoítos

Os cistos teciduais variam de 5 a 100 μm , possuem quantidade variável, podendo conter milhares de bradizoítos em seu interior^{1, 4, 29}. Os bradizoítos se alojam no interior dos tecidos por longos períodos ou pela vida toda do hospedeiro, sem que cause resposta inflamatória ou dano tecidual significativo. Apresentam multiplicação mais lenta, localização do núcleo na parte posterior do parasita e numerosos micronemas e grânulos de amilopectina. Medem cerca de 7 μm por 1,5 μm e são mais resistentes a enzimas proteolíticas do que os taquizoítos. Estas formas estão presentes nas infecções crônicas e congênicas e, embora cistos teciduais contendo bradizoítos possam se desenvolver no pulmão, fígado e rim, são mais prevalentes em tecidos neurais e musculares (cérebro, coração, músculo esquelético e retina)⁴.

O termo bradizoíto (brady = devagar em Grego) foi definido por Frenkel³⁰ e descreve a forma de multiplicação lenta dentro do cisto. A Figura 2 mostra um cisto tecidual contendo bradizoítos.

Figura 2- Cisto tecidual contendo bradizoítos.

Fonte: <http://www.ufrgs.br/parasite/siteantigo/Imagensatlas/Protozoa/Toxoplasma.htm>³¹

1.3.3 Oocistos

Os oocistos são formas resultantes do ciclo sexuado e somente ocorrem no trato gastrointestinal dos felídeos com primo-infecção. 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 três a cinco 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 6 μm por 2 μm . Os oocistos esporulados podem permanecer viáveis no meio ambiente por um período de até 18 meses ^{9, 32, 33}.

Menos que 50% dos gatos liberam oocistos nas fezes quando ingerem taquizoítos ou oocistos, mas todos os gatos liberam oocistos quando ingerem cistos teciduais ³⁴. A Figura 3 mostra um oocisto esporulado, onde as setas apontam para dois esporocistos contendo quatro esporozoítos em seu interior e um oocisto não esporulado.

Figura 3 – (A) Oocisto esporulado e (B) não esporulado de amostras de fezes de gato.
Fonte: Hill *et al*, (2005). ⁴

1.4 Ciclo biológico

T. gondii apresenta um complexo ciclo de vida, descrito somente em 1970, quando se descobriu que os hospedeiros definitivos são membros da família Felidae, incluindo o gato doméstico ³⁵. Vários animais de sangue quente servem como hospedeiros intermediários ³⁶.

A fase sexuada do parasita ocorre no gato jovem e não imune que adquire a infecção pela ingestão de oocistos, cistos teciduais ou taquizoítos. O ciclo sexual ocorre nas células intestinais com formação e fertilização dos gametócitos e formação do zigoto. Este origina o oocisto imaturo que posteriormente é liberado após rompimento celular, sendo eliminado nas fezes após uma ou duas semanas de infecção. Os oocistos imaturos, não infectantes, sob condições ideais de temperatura, umidade e oxigênio, como as que ocorrem em regiões de clima tropical, esporulam e podem sobreviver de 12 a 18 meses no solo desde que mantidas tais condições ^{6, 9, 37}.

Nos hospedeiros intermediários: a infecção pode acontecer por duas formas. A primeira, pela ingestão de alimentos ou contato com materiais contaminados com oocistos esporulados e maduros. A segunda pela ingestão de carnes mal cozidas de animais contendo cistos presentes nos seus tecidos. Em ambos os caminhos os parasitas penetram no intestino do hospedeiro e iniciam um processo de multiplicação assexuada chamado de endodiogenia ou endogenia (G). Esse processo é semelhante a um brotamento interno, onde primeiro formam-se os conóides ⁶. A Figura 4 mostra o ciclo biológico no hospedeiro definitivo e intermediário.

Figura 4 - Ciclo de vida de *T. gondii*: (A) hospedeiro definitivo e (B) hospedeiro intermediário.

Fonte: Frenkel e Vidal, (2010).³⁸

1.5 Formas da doença

T. gondii no hospedeiro humano comporta-se como agente dotado de alta infectividade e de baixa patogenicidade. A fonte de infecção (cistos, oocistos ou taquizoítos), assim como o tamanho de inóculo, o estado imunológico do hospedeiro e, provavelmente a linhagem da cepa são fatores que influenciam na determinação do quadro mais ou menos severo da doença ³⁹.

1.5.1 Toxoplasmose em imunocompetentes

Em imunocompetentes as formas assintomáticas da infecção constituem a maioria dos casos e figuram como acometimentos benignos, geralmente de cura espontânea ⁴⁰. Contudo, cerca de 10-20% dos indivíduos infectados apresentam algum tipo de sintomatologia. A manifestação clínica mais típica consiste em linfadenopatia isolada, com linfonodos rígidos, não supurados e discretos. Febre, por vezes, pode ocorrer. Este quadro clínico assemelha-se muito ao da mononucleose infecciosa. A doença é geralmente auto-limitada, observando-se em poucas semanas o desaparecimento dos sintomas. Outras formas podem surgir, embora com menor frequência, como miocardites, pneumonites e encefalites. O aparecimento dos sintomas está provavelmente relacionado com a virulência da cepa e com o sistema imune do hospedeiro. ^{9, 20, 41}

1.5.2 Toxoplasmose ocular

A toxoplasmose ocular é a causa mais comum de retinocoroidite em paciente não imunocomprometido, sendo responsável por 30% a 50% de todas as uveítes posteriores ⁴². 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 ^{43, 44}.

O grave impacto social da toxoplasmose ocular deve-se ao fato de levar à perda acentuada da visão. Os sintomas primordiais incluem diminuição da visão pelo edema, inflamação ou necrose retiniana e opacidades (nuvens) no campo visual, hiperemia conjuntival e ciliar, dor e fotofobia. As recidivas frequentes decorrem, provavelmente, da ruptura do cisto e liberação dos parasitas. ^{41, 45}

1.5.3 Toxoplasmose congênita

A infecção congênita se caracteriza pela transmissão do parasita ao feto via placenta. Esta forma de infecção ocorre normalmente quando a mulher desenvolve infecção primária durante a gestação, que apesar da parasitemia temporária, raramente tem sintomas ⁴. Entretanto, quando este contato se efetua num período anterior ao acontecimento da concepção, anticorpos são formados e dificilmente o feto será infectado ³³.

A gravidade da toxoplasmose congênita está relacionada com o período de infecção. A infecção adquirida durante o primeiro trimestre é mais grave do que aquela adquirida no segundo e terceiro trimestre ⁴¹. Cerca de 1% dos recém-nascidos que adquiriram toxoplasmose congênita morrem e 2% apresentam problemas neurológicos graves ^{46, 47}.

Um grande espectro de doenças clínicas pode ocorrer em crianças infectadas congenitamente, levando a um conjunto de manifestações, variando entre coriorretinite branda, que pode se apresentar muitos anos após o nascimento, a quadros mais graves com o aparecimento da tétrede de lesões: retinocoroidite, hidrocefalia, convulsões e calcificação intracerebral. Destas, a doença ocular é a sequela mais comum e a hidrocefalia a mais rara, porém, mais significativa ^{33, 48, 49}.

1.5.4 Toxoplasmose em imunocomprometidos

Indivíduos com toxoplasmose e com 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 fármacos imunossupressores usados no tratamento em pacientes transplantados, pacientes com doenças linfoproliferativas, ou, com deficiência na imunidade celular como os portadores do vírus da imunodeficiência humana.^{50, 51}

O local da infecção típica é o sistema nervoso central e aparece na forma de uma encefalite toxoplásmica, que varia de um processo subagudo e pode evoluir gradualmente para um estado de confusão agudo. No quadro clínico observa-se também uma variedade de sinais e sintomas como cefaléia, hemiparesia, afasia, anomalias sensoriais e deterioração mental.^{51, 52} Pode causar, ainda, necroses cerebrais com predileção das lesões nos gânglios da base em ambos os hemisférios cerebrais^{2, 53}.

O dano no sistema nervoso central é caracterizado por muitos focos de necrose. Essas áreas necrosadas podem calcificar e levar a sugestivos exames radiográficos, mas não patognomônicos da doença. Outro aspecto da encefalite por *Toxoplasma* é a presença de necroses cerebrais com predileção das lesões pelos gânglios da base em ambos os hemisférios cerebrais⁵³. Atualmente, o diagnóstico presuntivo (provável ou sugestivo) estabelecido pelo “Centers for Disease Control”^{54, 55} 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*.

Os métodos de imagens podem revelar lesões focais no sistema nervoso, embora estas imagens possam compartilhar características semelhantes a abscessos, tumores, linfomas ou outras infecções oportunistas do sistema nervoso em pacientes HIV positivos.^{51, 52}

1.5.5 Toxoplasmose disseminada

A toxoplasmose disseminada é definida quando a infecção acomete mais de dois sistemas ou órgãos ^{56, 57}. Como múltiplos sistemas são envolvidos, qualquer órgão pode ser acometido e podem ocorrer quadros semelhantes à sepse ou choque séptico ⁵⁸. Apesar de infrequente, está associada a um pior prognóstico ⁵⁹. A disseminação pode ocorrer em grupos de pacientes com diferentes causas de imunossupressão ^{60, 56, 61}. Entretanto, os óbitos causados pela toxoplasmose disseminada têm sido principalmente atribuídos ao acometimento do SNC. Os quadros têm sido descritos particularmente em pacientes com AIDS, submetidos a transplantes de órgãos ou naqueles em tratamentos com uso de quimioterapia para doenças malignas ^{58, 61, 62}. A infecção por *T. gondii* pode causar choque séptico geralmente associado à síndrome da angústia respiratória do adulto, semelhante aos quadros de choque séptico de origem bacteriana e com presença de infiltrado broncoalveolar difuso na maioria dos casos. Os sinais clínicos são inespecíficos, porém os achados laboratoriais podem ser sugestivos. A resposta imune de *T. gondii* é individual, complexa e compartimentalizada. Além disso, *T. gondii* pode se espalhar em todos os tecidos e cada compartimento tecidual possui sua própria resposta imune específica ⁶¹.

Pacientes infectados com HIV que apresentem quadros sépticos com febre de origem indeterminada e com as características apresentadas devem ser investigados quanto à possibilidade de quadro de disseminação de *T. gondii*. Não existem dados disponíveis sobre a magnitude da toxoplasmose disseminada em pacientes infectados com HIV, nem dos doentes com toxoplasmose cerebral, que também apresentavam comprometimento de outros órgãos por *T. gondii* ⁵⁸. O diagnóstico depende de um conjunto de sintomas clínicos, radiológicos e laboratoriais. Todavia, requer um alto índice de suspeição devido à inespecificidade do quadro clínico, laboratorial e a possível confusão com outras doenças oportunistas. As formas fulminantes são descritas e com diagnóstico muitas vezes confirmado apenas na autópsia. Os órgãos mais acometidos incluem o cérebro, os pulmões, o coração e o sistema músculo esquelético ⁵⁶.

1.6 Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial de toxoplasmose baseia-se no diagnóstico sorológico e molecular. O diagnóstico sorológico acompanha regularmente as gestantes soronegativas e a soroconversão de crianças sob investigação de toxoplasmose congênita ⁶³. No caso da soroconversão, a detecção de DNA de *T. gondii* pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em líquido amniótico (LA) confirma a toxoplasmose congênita ^{64, 65}. Após o nascimento, o diagnóstico pode ser feito em amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) ou sangue (SG) de recém-nascidos. Em casos de suspeita de toxoplasmose cerebral ou disseminada, o tratamento geralmente é iniciado usando características clínicas, radiológicas e sorológicas ^{2, 66}.

1.6.1 Diagnóstico sorológico.

Os ensaios sorológicos são comuns no diagnóstico da toxoplasmose e se baseiam principalmente, na detecção de anticorpos específicos e as classes de anticorpos mais utilizadas são IgM e IgG ⁶⁷. No momento, as técnicas mais utilizadas no diagnóstico laboratorial da toxoplasmose são a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), e o ensaio imunoenzimático (ELISA). Ambos ensaios apresentam boa especificidade e sensibilidade nas fases aguda (pesquisa de anticorpos IgM) e crônica (pesquisa de anticorpos IgG) ^{9, 68}.

A RIFI é muito utilizada nos laboratórios, porém, na detecção de anticorpos IgM, há o inconveniente de possíveis resultados falsos-positivos, pela presença no soro de anticorpos IgM anti-IgG (fator reumatóide) ou falso-negativos, pela competição de anticorpos IgG com os IgM, pelos mesmos sítios antigênicos ⁶⁹. O ensaio imunoenzimático ELISA, além de elevada sensibilidade e especificidade, tem como vantagem a rapidez, simplicidade técnica, versatilidade e objetividade de leitura. Detecta quantidades extremamente pequenas de anticorpos, podendo ter

elevada precisão, se os reagentes e os parâmetros do ensaio forem bem padronizados^{69,70}.

Para o diagnóstico em gestantes a avidéz é um teste muito útil e pode ser um teste confirmatório quando usado em associação com outros testes sorológicos^{71,72}. O teste de avidéz é um importante marcador sorológico adicional que auxilia no diagnóstico da doença aguda⁷³.

Os ensaios sorológicos são amplamente usados, mas apresentam limitações, como por exemplo em pacientes imunocomprometidos, onde os anticorpos específicos produzidos são dificilmente detectados e, por isso, não são muito confiáveis nestes casos^{52,74}. Por este motivo, os títulos de anticorpos IgG anti-*T. gondii* não são utilizados para identificar pacientes com reativação ou com risco de desenvolver toxoplasmose cerebral. Alguns artigos relatam que não observaram nenhuma correlação com o aparecimento da doença e a variação de títulos IgG^{75,76,77,78,79,80,81,82}.

1.6.2 Diagnóstico molecular

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), é uma metodologia que pode ser executada inteiramente *in vitro* sem o uso de células. A técnica da PCR foi desenvolvida nos anos 80 por Kary Mullis, que recebeu em 1993, prêmio Nobel⁸³.

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 sequência específica de DNA utilizando-se da propriedade da enzima *Taq*-polimerase (extraída da bactéria *Thermus aquaticus*) e de dois *primers* (oligonucleotídeos iniciadores) específicos à sequência alvo desejada (um que irá sintetizar a sequência 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°C⁸⁴.

O desenvolvimento da técnica de amplificação de fragmentos de DNA utilizando a PCR abriu enormes perspectivas para análises de genes, diagnóstico de doenças genéticas e detecção de agentes infecciosos como citomegalovírus, vírus da hepatite B e C, herpes vírus simples, vírus da rubéola, vírus da imunodeficiência humana (HIV) entre outros ⁸⁵.

A sensibilidade da PCR depende de 3 fatores principais ⁸⁶:

- Condições físico-químicas da reação (temperatura de anelamento do iniciador, concentração de Mg²⁺+Cl⁻, concentração da Taq polimerase e concentração do iniciador);
- 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 iniciadores (para o desenvolvimento dos iniciadores 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).

A sensibilidade dos resultados da PCR pode ser afetada por diversas razões como: manuseio inadequado da amostra, transporte e condições de armazenamento, introdução de tratamento anti-parasitário ⁴⁶. Existem outros fatores que influenciam os resultados, principalmente a escolha dos iniciadores e o DNA alvo. Já foram descritos mais de 25 pares de sequências de iniciadores para detectar *T. gondii* ^{9, 52}.

1.6.2.1 PCR convencional (cPCR)

A cPCR obtém sucesso para detectar fragmentos de DNA de *T. gondii* em diferentes fluidos biológicos e usando vários iniciadores. O diagnóstico por cPCR tem sido aplicado em infecções, utilizando materiais biológicos como tecido cerebral, LCR, lavado broncoalveolar, sangue, tecido hepático, líquido amniótico, líquido pleural, líquido ascítico, urina e líquido ocular, porém o sangue é o material biológico que se apresenta com maior facilidade na coleta ^{52, 87, 88}. Para a análise dos produtos amplificados da PCR existem diversos métodos, 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 ^{46, 84}.

A técnica é um método útil para complementar o diagnóstico de toxoplasmose na fase aguda pela sua alta sensibilidade e especificidade ^{65, 82, 89, 90, 91, 92, 93}. As sequências mais utilizadas para detecção de fragmentos de DNA de *T. gondii* têm como alvo o gene B1, que possui uma região repetitiva de 35 cópias no genoma desse parasita ^{94, 95, 96, 97, 98}. O gene B1 possui um tamanho de 2,2Kb, foi isolado e descrito por Boothroyd *et al.*⁹⁹ (1987), demonstrando ter uma natureza repetitiva no genoma. Burg *et al.*⁹⁴ demonstraram a alta sensibilidade da PCR na detecção de apenas um parasito presente no lisado celular usando o gene B1 como alvo de amplificação. Junto a 100 mil células humanas, esses autores conseguiram detectar até um único parasita. O Gene B1 de *T. gondii* é uma região altamente específica por ser uma região conservada em todas as cepas testadas ¹⁰⁰.

Outro alvo utilizado do genoma de *T. gondii* é a sequência de 529 pb ¹⁰¹, que se apresenta repetida de 200 a 300 vezes no genoma do *T. gondii* gerou uma série de publicações afim de se comparar iniciadores provenientes desta nova sequência com os iniciadores 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 ^{102, 103, 104, 105, 106}. Porém comparando o gene B1 com a sequência de 529 pb, Filisetti *et al.* ⁹⁶ relataram que não há diferença significativa de sensibilidade entre os mesmos.

Os produtos amplificados pela PCR são separados em um sistema eletroforético horizontal em gel de agarose, após essa etapa as amostras são visualizadas e fotografadas em um translumador de ultravioleta ¹⁰⁷. Muitas vezes na visualização do gel de agarose, algumas amplificações geram bandas muito fracas, o que dificulta a liberação do diagnóstico para toxoplasmose. A Figura 5 mostra um gel de agarose, contendo marcador molecular de 100 pares de bases, um controle positivo (CP), um controle negativo (CN) e sete amostras com algumas amplificações muito fracas como as amostras 5 e 7, gerando dúvidas para liberar o diagnóstico do paciente.

Figura 5. Gel de agarose para diagnóstico da toxoplasmose. Peso molecular de 100 pb, controles positivo (CP), negativo (CN) e sete amostras.

1.6.2.2 PCR em tempo real (qPCR)

Como já dito nesta introdução, a cPCR tem grande sucesso para detectar fragmentos de DNA de *T. gondii*, porém essa metodologia traz alguns fatores que podem prejudicar o diagnóstico molecular. Para a realização da eletroforese é necessário o manuseio dos microtubos após a PCR, podendo aumentar as chances de contaminar a reação e interferindo nos resultados. Um outro fator que costuma gerar muitas dúvidas é a leitura do gel de agarose, onde uma amostra de paciente com baixa carga parasitária pode amplificar uma banda muito fraca no gel de agarose dificultando o diagnóstico desse paciente (Figura 5).

A possibilidade de monitorar a qPCR revolucionou o processo de quantificação de fragmentos de DNA e RNA. A qPCR realiza a quantificação desses ácidos nucleicos de maneira precisa e com maior reprodutibilidade, porque determina valores durante a fase exponencial da reação ¹⁰⁸. A técnica pode ser usada para estimar a concentração de parasitos no fluido corporal e no caso de líquido amniótico é capaz de contribuir precocemente para o prognóstico da toxoplasmose congênita, ao permitir avaliar a concentração de parasitos no mesmo ^{109, 110}. Com esse cenário, os resultados obtidos por Romand *et al.* ¹¹⁰ (2004) mostram excelente relação entre carga parasitária, período da infecção materna e risco de infecção fetal, abrindo novas perspectivas para a valorização da qPCR como um ensaio que pode contribuir significativamente na orientação diagnóstica e terapêutica por parte dos obstetras e infectologistas ¹¹⁰.

A qPCR é uma técnica rápida, sensível, quantitativa e qualitativa de detecção de *T. gondii* em amostras clínicas. O ensaio pode ser usado na rotina de laboratórios em combinação com testes sorológicos. É particularmente útil em pacientes com AIDS, uma vez que a capacidade destes em gerar IgM se encontra limitada, além da dificuldade encontrada para a interpretação dos estudos sorológicos. Os ensaios quantitativos pela qPCR parecem ser apropriados para o diagnóstico da toxoplasmose e o monitoramento terapêutico ^{110,111}.

A aplicabilidade da qPCR no diagnóstico de toxoplasmose com diferentes alvos já foram testados. Entre eles, como dito anteriormente, uma sequência de 529 pb, que tem 200-300 cópias no genoma de *T. gondii* ¹⁰¹, e o gene B1, que tem 35 cópias no genoma e está conservado em diferentes cepas de parasitas ⁹⁴ estavam bem avaliados ^{93, 97, 104, 105, 111, 112, 113}. Em paralelo, alguns estudos relatam que a sequência repetitiva do gene B1 apresenta sensibilidade variável quando utilizada em amostras extraídas de LCR ^{9, 52}.

1.7. Justificativa

Esta Introdução pontuou a importância e gravidade das formas sintomáticas da toxoplasmose. Ao mesmo tempo, também foi pontuada a variabilidade de iniciadores moleculares especialmente sobre a sensibilidade e especificidade para uso no diagnóstico molecular. Assim, estudar padronizações, eficiência de iniciadores moleculares para melhorar a eficácia na detecção de *T. gondii* em pacientes infectados é de grande valia em Saúde Pública. O esclarecimento destas questões pode favorecer o diagnóstico molecular da toxoplasmose sintomática, possibilitando uma 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 sintomática em pacientes brasileiros avaliando o desempenho da qPCR na detecção de DNA de *T. gondii* usando dois conjuntos de iniciadores.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar o desempenho dos iniciadores moleculares REP-529 e B1 num estudo retrospectivo com 515 amostras clínicas;
- b) Avaliar o desempenho dos iniciadores moleculares REP-529 e B1 num estudo prospectivo com 292 amostras clínicas;
- c) Determinar a sensibilidade, especificidade e índices de concordância de cada iniciador molecular.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Considerações éticas

Este trabalho foi aprovado no Comitê de Ética Humana de todas as instituições envolvidas e foi realizado conforme recomendações do CONEP-IAL/SES sob número 815489. O título foi “Otimização e validação do diagnóstico molecular da toxoplasmose em um laboratório de Saúde Pública”. (ANEXO A)

3.2 Amostras biológicas

Este estudo foi dividido em duas partes (retrospectivo e prospectivo) onde foram analisadas 807 amostras clínicas de pacientes recebidas no Centro de Parasitologia e Micologia, do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo) no período de janeiro de 2008 a novembro de 2016, para o diagnóstico molecular da toxoplasmose. O critério de escolha das amostras clínicas foi de testar amostras clínicas com diagnóstico clínico já estabelecido. As amostras clínicas foram provenientes do Instituto de Infecologia Emilio Ribas (São Paulo); do Ambulatorio de Oftalmologia do Hospital de Base (São Jose do Rio Preto); do Serviço de Atenção Pré-natal e Fetal de Alto Risco (São Jose do Rio Preto); do Serviço de Pediatria de Alto Risco Fetal e Serviço de Medicina Fetal (São Jose do Rio Preto). As amostras clínicas analisadas durante o período foram: 173 (2008-2010), 204 (2011-2013), 138 (2014-2015) e 292 (2016). Essas amostras clínicas enviadas ao laboratório incluíram LCR (302); sangue periférico coletado com EDTA (SG) (439); líquido amniótico (LA) (47); cortes de autópsias de cérebro e pulmão embebidos em parafina fixados em formol seccionados em 4 µm de espessura (19) (AU).

Para os testes sorológicos as amostras de SG foram coletadas em tubos com anticoagulantes e as amostras de LCR em tubos sem anticoagulantes. Todas as

amostras clínicas (para PCR e sorologia) foram enviadas ao laboratório dentro de 48 horas após a coleta e imediatamente processadas.

No estudo retrospectivo, o diagnóstico das 515 amostras clínicas coletadas até 2015 consistiu da cPCR usando o iniciador molecular B22-B23, que amplifica uma sequência de 115 pares de bases (pb) do gene B1 ⁹⁴ e ELISA utilizando o antígeno lisado de *T. gondii* (ALT) ^{116, 117}.

No estudo prospectivo, as 292 amostras clínicas enviadas ao laboratório em 2016 foram analisadas por qPCR utilizando os iniciadores moleculares REP-529 e B1. As amostras avaliadas (em ambos estudos) foram provenientes de pacientes com diagnóstico posteriormente confirmado das seguintes formas sintomáticas da toxoplasmose: cerebral (404 pacientes com HIV); ocular (193 pacientes com alterações oculares); infecção congênita por via transplacentária (125 recém-nascidos); aguda gestacional (66 gestantes); e disseminadas (19 autópsias cerebrais de pacientes HIV-pós-morte).

Pacientes infectados por HIV com suspeita de toxoplasmose cerebral apresentaram déficits neurológicos progressivos e lesões de massa que melhoram o contraste em tomografia computadorizada ou ressonância magnética. Estes casos foram incluídos na "definição de toxoplasmose cerebral" ^{2, 66}. Os óbitos por toxoplasmose disseminada grave apresentaram sorologia e imuno-histoquímica positivas para a toxoplasmose, pelo menos em dois órgãos. Ambos os grupos de pacientes foram admitidos e tratados no Instituto de Infectologia Emilio Ribas pelo grupo do Dr. José E. Vidal. Pacientes com suspeita de toxoplasmose ocular apresentaram alterações oculares, como retinocoroidite ou lesões exsudativas da retina. Foram admitidos e tratados no Ambulatório de Oftalmologia, pelo grupo do Dr. Fábio B. Frederico. As gestantes com suspeita de toxoplasmose aguda foram internadas e tratadas no Serviço de Atenção Pré-natal e Fetal de Alto Risco. Todas fizeram o teste para toxoplasmose, rubéola, sífilis, citomegalovírus, hepatite e HIV ^{114, 115}. Aquelas com suspeita clínica e epidemiológica de toxoplasmose e com IgM positiva ou baixa avididade de IgG para Anti-*T. gondii* foram submetidos à amniocentese para a PCR em líquido amniótico. Os recém-nascidos dessas mães com infecção fetal suspeita ou confirmada foram admitidos e tratados no Serviço de Pediatria de Alto

Risco e Serviço de Medicina Fetal. Mães e recém-nascidos foram tratados pelo grupo do Dr. Lígia CJF Spegiorin.

3.3 Antígeno de *T. gondii* e diagnóstico sorológico

3.3.1 Antígeno

O antígeno utilizado nas reações sorológicas foi preparado como descrito previamente ¹¹⁶ e com taquizoítos da cepa RH de *T. gondii*. Os parasitas foram mantidos em culturas de células VERO. As células foram infectadas com 1×10^7 taquizoítos, observadas diariamente até rompimento das células e liberação dos parasitas para o meio de cultura, quando o sobrenadante foi recolhido e transferido para um tubo de 15 mL. A seguir foi centrifugado e lavado com PBS por 3 vezes (2500 g por 10 minutos). O sedimento, contendo os taquizoítos foi diluído em PBS, filtrado em membrana de 3.0 μ m foi adicionado pérolas de vidro (Sigma 150:212 microns) numa quantidade de aproximadamente 250 μ L. Os parasitas foram triturados em um disruptor (Qiagen) por 8 ciclos de 4 minutos e intervalos de 2 minutos (oscilação e 50 s); Após esta etapa o material foi levado ao sonicador por 5 minutos; Após a verificação da lise dos parasitas em Câmara de Neubauer, foi adicionado à solução NaCl 0,3 M (v/v) e o antígeno bruto teve sua concentração proteica dosada por espectrofotometria (Nanodrop ND 1000).

3.3.2 Diagnóstico sorológico

O método imunoenzimático ELISA foi utilizado para diagnóstico sorológico como descrito previamente ^{116, 117}. As reações foram realizadas em placas de polietileno com 96 orifícios e após cada segmento da reação, as placas foram lavadas

com PBS Tween-20 (50 µL de Tween; 100 mL de PBS). O antígeno (1 µg/ mL) diluído em bicarbonato de sódio foi distribuído nos orifícios. Após incubação á 4°C por 18 horas, os sítios livres remanescentes do plástico foram bloqueados com PBS (pH 7.2) -Leite desnatado 5% por 1 hora a 37° C. Os soros e LCRs foram diluídos em PBS-Leite (soro 1/200 µL) e (LCR - total) incubados a 37° C num volume final de 50 µL por orifício. As placas foram novamente incubadas com o segundo anticorpo conjugado a peroxidase (1/20.000 em PBS-Leite). A revelação ocorreu adicionando-se o substrato enzimático contendo *o*-fenilenodiamina (OPD) diluído em fosfato de sódio dibásico (0.1 M), ácido cítrico (0.1 M) e H₂O₂. A adição de ácido sulfúrico 4N (diluído 1:9) interrompeu a reação após a incubação no escuro. Os resultados foram avaliados por leitura de espectrofotômetro em comprimento de onda de 492 nm. Cada passo da reação foi avaliado. As amostras foram testadas em duplicata. O “cut-off” da reação foi determinado com as medias das leituras obtidas de 50 soros de indivíduos não infectados com *T. gondii*, onde foi estabelecido com corte, D.O de 0.160 para SG e 0.086 LCR.

3.4 Extração de DNA

As amostras de SG (5 mL) foram preparadas como descrito previamente¹⁰⁶. O soro foi separado dos eritrócitos por centrifugação (2500 g por 10 min) e utilizadas no diagnóstico sorológico. Os eritrócitos foram lavados (2.500 g, por 10 minutos) com PBS (cerca de 8 mL). Para a lise dos eritrócitos foram misturados com três vezes ao volume de um tampão contendo clorato de amônio 150 mM, bicarbonato de potássio 1 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.3; incubados por 15 min à temperatura ambiente sob agitação suave e centrifugados (2500 g por 10 min) para posterior utilização do sedimento formado.

As amostras de LA (10 mL) foram centrifugadas (2500 g por 10 min) e os sobrenadantes descartados.

Os fragmentos de AU (5 secções de 4 µm de espessura) foram dissolvidos em xilol (1 mL), incubados por 30 segundos, centrifugados duas vezes (8000 g por 1 min)

e os sobrenadantes foram removidos. A seguir, as amostras receberam 1 mL de etanol, centrifugadas (8000 g por 1 min) e incubados por 10 min, à temperatura ambiente para evaporação completa do xilol ¹¹⁸.

As moléculas de DNA foram extraídas de SG, LA, AU e taquizoítos (controle positivo e curvas padrão) por QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen); e de AU, pelo kit QIAamp DNA FFPE Tissue (Qiagen). Os protocolos foram seguidos de acordo com as instruções do fabricante numa estação de trabalho robótica para extração automatizada de DNA (QIAcube, Qiagen).

As moléculas de DNA de amostras de LCR (3 mL) foram extraídas como descrito antes ⁹¹. As amostras de sobrenadantes de LCR utilizadas no diagnóstico sorológico foram separadas por centrifugação (2500 g por 10 min). Os sedimentos foram dissolvidos em 50 µL em água ultra-pura e incubadas a 100°C por 5 min. Para esse procedimento não foi necessário uso de kit.

As concentrações de DNA e a pureza foram determinadas pela relação de D.O. a 260 e 280 nm em NanoDrop ND1000. Para utilização na PCR, amostras com concentrações de DNA elevadas (como algumas SG e AU) foram diluídas com água ultra-pura até a concentração 100 ng/µL.

3.5 cPCR: Iniciadores moleculares, controle interno e eletroforese em gel de agarose

As amplificações foram realizadas utilizando um kit comercial (GoTaq®Green Master Mix - Promega). Cada 12,5 µL do “mix” continha 1 unidade de Taq DNA polimerase em 10 mM 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, 1 µL do DNA controle e 50 pmol de cada iniciador molecular, num volume final de 25 µL. As amplificações foram realizadas utilizando o termociclador Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems®).

Para identificar *T. gondii* na cPCR foi utilizado o par de iniciadores moleculares B22/B23, que amplifica uma sequência de 115 pb de uma região repetitiva do gene B1 de *T. gondii* ^{50, 94}.

Para o controle das extrações foi utilizado o iniciador molecular $\beta 1/\beta 2$ que amplifica uma sequência de 140 pb do gene β -globulina humana. Ambas reações foram realizadas simultaneamente, e com o mesmo protocolo de temperatura ¹¹⁹. Em todas as reações foram adicionados um controle positivo, a partir de DNA extraído de taquizoítos e um controle negativo, onde foi utilizada água ultrapura que substituiu o DNA. As sequências dos conjuntos de iniciadores B22/B23, $\beta 1/\beta 2$ e a característica de suas respectivas sondas estão descritos na Tabela 1.

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) corados com brometo de etídio. Em todos os géis foram adicionados o marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pb e as corridas tiveram uma velocidade de 6V/cm. As amostras foram visualizadas e fotografadas em um transiluminador MiniBis Pro (Programa Gel Capture, Mini Bis Pro, versão 4.5.3) de ultravioleta a um comprimento de onda de 312 nm ¹⁰⁷.

3.6 qPCR: Iniciadores moleculares e controle interno

Foram analisados, o desempenho de dois conjuntos de iniciadores moleculares para qPCR. O primeiro é o B1, que amplifica um fragmento de 71 pb do gene B1 como modelo ^{120, 121}. A sonda utilizada nessa sequência de oligonucleotídeos é marcada com FAM (6-carboxifluoresceína) e BHQ1 (Black Hole Quencher 1) nas extremidades 5' e 3', respectivamente.

O segundo é o REP-529, que amplifica uma sequência de 112 pb, altamente repetitiva no genoma do *Toxoplasma gondii* (Genbank AF487550) ^{120, 122}. A Tabela 1 mostra as sequências dos conjuntos de iniciadores B1, REP-529 e suas respectivas sondas. As localizações no gene de cada um dos iniciadores moleculares estão descritas na Figura 6. Ambas as sequências de iniciadores moleculares foram

previamente padronizadas em nosso laboratório usando diluições seriadas de DNA de *T. gondii* (cepa RH).

Para confirmar a ausência de inibidores da PCR, em todas as reações foi incluído um tubo contendo um iniciador molecular que amplifica uma região do gene 18S rRNA de eucariotos (código de acesso GenBank X03205.1) (Applied Biosystems). As reações foram realizadas num ABI 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) em volume final de 20 μ L por reação. DNA teste (3 μ L na concentração de até 100 ng/ μ L), ou o DNA controle (5 ng/ μ L) ou o DNA para a curva padrão (3 μ L para cada ponto) foram adicionados a mistura que continha 10 μ L de 2X TaqMan Universal PCR Master Mix (NoAmpliErase UNG) e os iniciadores moleculares (1.25 μ L de um “Assay Mix” contendo 18 μ M de cada iniciador molecular e 5 μ M da sonda). Foram adicionados às reações um controle negativo e um controle positivo, assim como realizados na cPCR. As amplificações ocorreram em um ciclo inicial de 50°C por 2 min para melhor atividade da AmpliErase UNG, uma enzima que remove qualquer produto amplificado anteriormente, evitando contaminação cruzada. A segunda etapa foi um ciclo a 95°C por 10 min. A seguir foram realizados 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e a 60°C por 1 min.

Tabela 1 – Seleção de iniciadores moleculares utilizados neste estudo.

PCR	Iniciadores moleculares	Sequência 5'→ 3'	Produto esperado (pb)/ Temperatura de pareamento/ Características da sonda	Referências
Convencional	B22/B23	AACGGGCGAGTAGCACCTGAGGAGA TGGGTCTACGTCGATGGCATGACAAC	115/ 62°	Burg <i>et al.</i> , 1988,1989 ^{50,94}
Tempo Real	Gene B1	GAAAGCCATGAGGCACTCCA TTCACCCGGACCGTTTAGC	CGGGCGAGTAGCACCTGAGGAGATACA 5' FAM 3' QSY ^d	Fekkar <i>et al.</i> , 2008 ¹²¹ ; Belaz <i>et al.</i> , 2015 ¹²⁰
	REP-529	AGAGACACCGGAATGCGATCT TTCGTCCAAGCCTCCGACT	TCGTGGTGATGGCGGAGAGAATTGA 5' FAM 3' QSY	Robert-Gangneux <i>et al.</i> , 2010 ¹²² ; Belaz <i>et al.</i> , 2015 ¹²⁰
Integridade do DNA	β1 β2	ACCACCAACTTCATCCACGTTACCC CTTCTGACACAACCTGTGTTCACTAGC	140/62°	Lee <i>et al.</i> , 2001 ¹²³

Figura 6 - Desenho e localização dos genes e dos iniciadores moleculares utilizados neste estudo. (A) cPCR (B22-B23), (B) qPCR B1 e (C) qPCR REP-529.

3.7 Análise da Curva Padrão de REP-529 e B1

Para análise dos iniciadores moleculares para qPCR foram feitas as curvas padrão com 8 concentrações de DNA (a partir de 1×10^7 taquizoítos) na concentração de 35 ng/ μ L em triplicata. As diluições seriadas variaram até 1 taquizoíto (3,5 fg). Os valores de “*Cycle Threshold*” (C_T) foram traçados como média das triplicatas contra os valores da curva padrão para cada iniciador molecular. As concentrações de DNA dos parasitas foram determinadas após o cálculo da equação de regressão linear ($y = ax + b$), onde $y = C_T$; a = inclinação da curva (*slope*); X = número de parasitas; e b = onde a curva intersepta o eixo y (intercepção de y) ¹²⁴.

3.8 Qualidade das reações e análise de dados

Para cada reação utilizou-se um controle negativo (água DNA free) juntamente com a mistura para PCR. Para cada etapa foram utilizadas salas diferentes. I) extração de DNA; II) mistura para PCR e preparação dos iniciadores moleculares; III) adição de DNA das amostras clínicas e controle positivo; e IV) análise de eletroforese em gel de agarose pós-PCR no caso do cPCR. As amostras clínicas foram ensaiadas em triplicata e, pelo menos, duas vezes para determinar a reprodutibilidade. Para determinar qualidade das amostras de DNA armazenadas durante 9 anos e re-analisada retrospectivamente por qPCR foi utilizado o iniciador molecular 18S para confirmação dos resultados negativos.

Para regressão linear e construção da curva padrão para REP-529 e B1 foi utilizado o programa de computador GraphPad Prism 6.0. A comparação das médias de C_T dos dois iniciadores moleculares foi analisada estatisticamente usando o teste T de variância baseado em um valor crítico de $P \leq 0,05$.

A sensibilidade e a especificidade de ambos iniciadores moleculares nas amostras clínicas foram determinadas considerando o diagnóstico verdadeiro (clínico e laboratorial) pelo cálculo: % de sensibilidade = verdadeiros positivos / (verdadeiros

positivos + falso negativos) x 100. % de especificidade = verdadeiros negativos / (verdadeiros negativos + falso positivos) x 100. Os índices de concordância foram calculados segundo a fórmula: (número de resultados concordantes) / (número total de amostras) x 100.

4 RESULTADOS

O objetivo principal desse estudo foi avaliar o desempenho de dois conjuntos de iniciadores para qPCR em amostras biológicas de pacientes com suspeita clínica de toxoplasmose sintomática, afim de aprimorar o diagnóstico molecular da toxoplasmose sintomática. A avaliação da qualidade da extração de DNA e dos inibidores de PCR foram testados com os iniciadores moleculares 18S e β 1- β 2 para qPCR e cPCR, respectivamente. Os resultados positivos comprovaram a qualidade das amostras de DNA.

4.1 Padronização dos iniciadores moleculares REP-529 E B1 em DNA de taquizoítos

Os primeiros ensaios foram realizados para se determinar os limites de detecção dos iniciadores moleculares REP-529 (Figura 7A) e B1 (Figura 7B) usando DNA extraído de taquizoítos (cepa RH). As curvas mostraram o limite de detecção mínimo de cada curva. REP-529 teve $R^2 = 0,9923$ e B1, $R^2 = 0,9985$, *slope* entre -3,10 e -3,58. Estes números indicam alta linearidade das variáveis ¹²⁵. O limite mínimo de detecção (em C_T) de REP-529 foi de 39.28 (correspondendo a um parasita) e superior ao B1, que foi de 37.18 (correspondendo a 100 parasitas).

Número de taquizoítos em log10

Figura 7 - Curva padrão para REP-529 (A) e B1 (B) para a detecção de DNA de *T. gondii*. Os dados são apresentados em valores médios das triplicatas de “Cycle Threshold” (C_T) obtido de cada concentração de DNA (Y). As diluições foram feitas em série de 10 vezes de DNA extraído de taquizoítos, na concentração inicial de 35 ng/ μ L (1×10^7 taquizoítos) (X).

4.2 Amostras clínicas avaliando o desempenho de REP-529 e B1 em qPCR

Os resultados das primeiras 515 amostras de DNA (coletadas até 2015) incluíram o diagnóstico clínico, ELISA e cPCR (B22-B23). Essas amostras de DNA foram usadas para avaliar o desempenho de REP-529 e B1 na qPCR e os resultados são apresentados na Tabela 2.

Nas amostras de DNA dos 122 pacientes com diagnósticos sorológico, molecular e clínico negativos (sem toxoplasmose), o REP-529 e B1 apresentaram especificidades de 99,2% e 100% respectivamente. Todas as amostras foram negativas considerando-se os resultados de pelo menos um iniciador molecular. Para a sensibilidades dos conjuntos de iniciadores os resultados foram de 95,9% e 83,6%, respectivamente. REP-529 amplificou 141/146 amostras com média de C_T de $31,71 \pm 0,36$. B1 amplificou 122/146, com média de C_T de $32,12 \pm 0,38$.

A Tabela 2, ainda, mostra resultados de PCR de 393 amostras clínicas com ELISA positivo. Anticorpos IgG positivos anti-*T. gondii* não são suficientes para estabelecer infecção sintomática como ocorre no diagnóstico molecular. A detecção de fragmentos de DNA de *T. gondii* em fluidos biológicos pode diagnosticar uma infecção sintomática, como formas cerebrais, oculares ou disseminadas^{91, 118, 126}.

Tabela 2- Resultados de qPCR utilizando os iniciadores moleculares REP-529 e B1. Estudo retrospectivo realizado em 515 amostras de DNA provenientes de pacientes com diagnóstico confirmado pelas análises clínica, ELISA e cPCR (B22-B23).

Amostras clínicas		Resultados							
Diagnóstico sorológico (ELISA)	<i>n</i>	cPCR (B22-B23)		qPCR (REP-529)			qPCR (B1)		
		Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	%	Negativo	Positivo	%
Negativo	122	122	0	121	1	99.2 ¹	122	0	100 ¹
Positivo	393	247	146 ²	253	140	95.9 ²	281	122	83.6 ²
Total	515	369	146	374	141	-	403	122	-

¹ Porcentagem de especificidade foi calculada pela formula: verdadeiros negativos/ verdadeiros negativos + falsos positivos x 100. (O diagnóstico clínico e os resultados de ELISA foram considerados métodos padrão-ouro – 122 pacientes sem toxoplasmose). ²Porcentagem de sensibilidade foi calculada pela formula verdadeiros positivos / verdadeiros positivos + falso negativos x 100. (O diagnóstico clínico e a cPCR foram considerados métodos padrão-ouro).

A Tabela 3 mostra em detalhes o desempenho de ambos iniciadores moleculares e características clínicas das 217 amostras positivas. REP-529 amplificou o DNA de *T. gondii* em 97,23% (211/217) das amostras positivas e B1 foi positivo apenas em 78,80% (171/217) deles.

As sensibilidades de REP-529 e B1 foram calculadas considerando cPCR e diagnóstico clínico (146 amostras, que incluíram 94 pacientes com toxoplasmose cerebral, 10 recém-nascidos com infecção congênita, 6 gestantes com toxoplasmose, 21 pacientes com toxoplasmose ocular e 15 pacientes pós-mortem com toxoplasmose disseminada grave) (Tabela 4).

Após esses resultados e um consenso na literatura para o diagnóstico molecular da toxoplasmose, utilizamos apenas os dois iniciadores moleculares para qPCR e a cPCR foi descontinuada. Até outubro de 2016 foram incluídos neste estudo 292 amostras clínicas, perfazendo um total de 807 amostras clínicas analisadas. Conforme mostrado na Tabela 4, entre as 807 amostras clínicas, 217 (26,89%) foram positivos na PCR, pelo menos em um dos iniciadores moleculares e com diagnóstico clínico confirmado. Estes incluem: I. 30,94% (125/404) pacientes com toxoplasmose cerebral; II. 12,80% (16/125) recém-nascidos com alterações congênitas; III. 18,18% (12/66) gestantes com toxoplasmose aguda com DNA de *T. gondii* em LA ou SG; IV. 23,83% (46/193) pacientes com alterações oculares e DNA de *T. gondii* em SG; e V. 94,74% (18/19) pacientes pós-mortem com toxoplasmose disseminada grave.

Tabela 3 - Características das amostras clínicas, percentual de sensibilidades de REP-529 e B1 considerando as 217 amostras positivas.

Forma clínica (<i>n</i>)	Amostra	Total ¹	REP-529		B1	
			Positivo	%	Positivo	%
Cerebral (125)	LCR	49	49	100	41	83.67
	SG	76	72	94.74	62	81.58
Congênita (16)	LCR	3	3	100	2	66.67
	SG	13	13	100	9	69.23
Gestacional (12)	LA	8	8	100	5	62.50
	SG	4	4	100	3	75.00
Ocular (46)	SG	46	44	95.65	36	78.26
Disseminada (18)	AU	18	18	100	13	72.22
Total		217	211	97.23	171	78.80

¹Pelo menos um iniciador molecular positivo

Tabela 4- Resultados clínicos e de PCR das 807 amostras clínicas analisadas.

Toxoplasmose (Forma clínica)	Número total de amostras clínicas analisadas	Amostras positivas			% Positividade (Ambos estudos)
		Clínico, molecular, e diagnóstico sorológico			
		Estudo retrospectivo (515 amostras)	Estudo prospectivo (292 amostras)	Ambos estudos (807 amostras)	
Cerebral	404	94	31	125	30.94
Congênita	125	10	6	16	12.80
Gestacional	66	6	6	12	18.18
Ocular	193	21	25	46	23.83
Disseminada (pós-mortem)	19	15	3	18	94.74
Total	807	146	71	217	26.89

Embora a média da C_T de REP-529 seja menor do que para B1, estatisticamente, não houve diferença no C_T nos dois iniciadores moleculares (Tabela 5).

Em seguida foram estudados os índice de concordância entre os iniciadores moleculares. Os valores foram calculados de acordo com a concordância em resultados positivos. Os resultados discordantes foram considerados quando um resultado negativo mostrou pelo menos um iniciador molecular. O número total de amostras foi baseado nos resultados de 515 amostras clínicas com resultados positivos (146) e negativos (369) em cPCR (B22-B23) até 2015 e 807 amostras clínicas com resultados positivos (217) e negativos (590) em qPCR (REP-529 e B1) (2008-2016). Conforme mostrado na Tabela 6, a concordância dos resultados entre os três iniciadores moleculares foi de 83,56%. A concordância entre B22-B23 e REP-529 foi de 95,89%. Entre B22-B23 e B1 foi de 83,56%, e REP-529 e B1, 83,87%.

Tabela 5 - Comparação entre valores médios de C_T obtidos com REP-529 e B1 qPCR considerando as 217 amostras positivas.

Forma clínica (n)	Amostra	Total	Media $\pm$ (n) C_T EP ¹		<i>P</i> valor ²	
			REP-529	B1	ΔC_T	Test T
Cerebral (125)	LCR	49	32.86 $\pm$ 0.43 (49)	33.71 $\pm$ 0.40 (41)	0.85	0.2420 (ns) ³
	SG	76	31.08 $\pm$ 0.54 (72)	31.92 $\pm$ 0.51 (72)	0.84	0.2830 (ns) ³
Congênita (16)	LCR	3	35.61 $\pm$ 0.22 (3)	36.37 $\pm$ 1.67 (2)	1.68	0.2628 (ns) ³
	SG	13	31.06 $\pm$ 1.06 (13)	32.99 $\pm$ 1.13 (9)	1.93	0.6757 (ns) ³
Gestacional (12)	LA	8	34.69 $\pm$ 0.63 (8)	36.13 $\pm$ 0.56 (3)	1.44	0.0554 (ns) ³
	SG	4	35.02 $\pm$ 0.58 (4)	36.36 $\pm$ 0.21 (2)	1.34	0.0192 (ns) ³
Ocular (46)	SG	46	32.07 $\pm$ 0.62 (44)	33.22 $\pm$ 0.66 (24)	1.15	0.0225 (ns) ³
Disseminada (18)	AU	18	30.92 $\pm$ 0.96 (18)	31.27 $\pm$ 1.48 (10)	0.35	0.2172 (ns) ³

¹EP (erro padrão). ²valor significativo a $p < 0.01$. ³ não significativo

Tabela 6 - Índice de concordância entre os três iniciadores para detecção de *T. gondii* em amostras clínicas.

Período do estudo	Iniciadores moleculares	Amostras clínicas com toxoplasmose sintomática	Resultados PCR		
			Concordante ¹	Discordante ²	Índice de concordância ³ (%)
2008-2015	B22-B23/REP-529/B1	146	122	24	(83.56)
	B22-B23/ REP-529	146	140	06	(95.89)
	B22-B23/B1	146	122	24	(83.56)
2008-2016	REP-529/B1	217	182	35	(83.87)

¹Positivo em todos os iniciadores; ²Negativo em pelo menos um iniciador; ³Porcentagem do índice de concordância foram calculados com a proporção: número de resultados concordantes) / (número total de amostras) x 100. O número total de amostras foi baseado no resultado das 515 amostras clínicas com resultados positivos (146) e negativos (369) em cPCR (B22- B23) até 2015; e 807 amostras clínicas com resultados positivos (217) e negativos (590) em qPCR (REP-528 e B1) (2008- 2016).

5 DISCUSSÃO

A PCR tem sido eleita como método potencialmente poderoso para complementar o diagnóstico de toxoplasmose sintomática pela sua alta sensibilidade e especificidade^{82, 91, 89}. A utilização da qPCR, com sonda que emite fluorescência quando ligada a uma região específica do DNA alvo também vem sendo utilizada amplamente em todo o mundo no diagnóstico da toxoplasmose^{93, 104, 127}. A vantagem da qPCR é a agilidade, quantificação do DNA do parasita na amostra e baixa chance de contaminação, pois dispensa o uso do gel de agarose^{101,128}.

Ao longo destes anos, alguns problemas foram encontrados em relação ao diagnóstico da toxoplasmose. Amostras que apresentam pouca concentração de parasitas, as amplificações são difíceis de serem detectadas no gel de agarose e, conseqüentemente, dificultando a deliberação do resultado. Assim, a proposta deste estudo foi avaliar a performance da qPCR em detectar DNA de *T. gondii* usando dois iniciadores moleculares, que são utilizados em laboratórios de países europeus^{120, 121, 122}.

Ainda que existam diversos iniciadores moleculares para detecção de *T. gondii*, as mais utilizadas na cPCR e qPCR têm como alvo o Gene B1 por possuir uma região que se repete 35 vezes no genoma deste parasita^{94, 95, 97, 98}. A sequência gênica de 529 pb, que se encontra repetida de 200-300 vezes também tem sido bem estudada e com sensibilidade que varia de 10 a 100 vezes mais do que as sequências que amplificam regiões do Gene B1^{101, 103, 102, 104, 105}. Alguns estudos realizados comprovaram a eficiência dos genes alvos, bem como os iniciadores moleculares para a amplificação do DNA de *T. gondii* em diferentes tipos de amostras clínicas de pacientes com formas sintomáticas de toxoplasmose. O estudo prospectivo realizado por Cassaing *et al.*¹⁰⁴ comparou a sensibilidade entre os iniciadores B1 e REP-529 em fetos, neonatos, pacientes imunocomprometidos e casos de toxoplasmose ocular, onde os resultados obtidos mostraram que o REP-529 foi mais sensível para todas as amostras biológicas (líquido amniótico, placenta, humor aquoso, sangue total e fluidos cerebrospinal e broncoalveolar) e melhorou significativamente o desempenho do diagnóstico de toxoplasmose^{93, 93, 104, 105, 111, 112, 113}.

O nosso laboratório realizava o diagnóstico molecular utilizando o iniciador molecular B22-B23 em cPCR, capaz de detectar e amplificar DNA de um único organismo diretamente de um lisado de células brutas ou 10 parasitas na presença de 100.000 leucócitos humanos ⁹⁴. A alta sensibilidade e especificidade deste iniciador molecular pode ser comprovada em estudos previamente publicados onde foram estudadas amostras de LCR e SG coletadas de pacientes com toxoplasmose cerebral/AIDS e toxoplasmose ocular ^{82, 91, 126}.

Para dar início as análises das performances dos iniciadores moleculares utilizados nesse estudo foram feitas padronizações para determinar o limite mínimo de detecção. O REP-529 mostrou ser mais sensível na detecção de DNA de *T. gondii*, pois seu limite mínimo foi de 39.28 (C_T) o que corresponde a um parasita. Já o B1, o limite mínimo de detecção foi de 37.18, o que corresponde a 100 parasitas. Estes resultados podem estar correlacionados a abundância da sequência do REP-529 no genoma de *T. gondii*, que é maior em número de repetições do que o Gene B1. ¹⁰¹

Apesar dessas diferenças de sensibilidade, uma boa reprodutibilidade foi vista em ambos iniciadores moleculares, uma vez os resultados sempre foram semelhantes nas réplicas (em triplicata) e em diferentes reações (mesma amostra analisada em dias diferentes).

O estudo retrospectivo foi realizado com os iniciadores REP-529 e B1 e foram avaliados utilizando 515 amostras de DNA previamente extraídas de diferentes amostras clínicas coletadas de pacientes com resultados conhecidos para diagnóstico clínico e laboratorial. As condições de trabalho foram mantidas para que tivéssemos uma boa performance das reações. A extração de DNA das amostras clínicas foram feitas rapidamente dentro de 48 horas após a coleta para prevenir a inibição da Taq-polimerase ^{82, 128, 129}. Considerando a variação da concentração de DNA do parasita, todas as amostras utilizadas neste estudo foram quantificadas após a extração (uma vez que concentrações de acima de 100ng/μL poderiam inibir a reação). Foram verificadas também os inibidores de DNA amplificando um gene humano. Este controle de qualidade impediu a presença de resultados negativos pela baixa qualidade do DNA ¹³⁰. Assim, utilizando-se os conjuntos de iniciadores moleculares 18S e β-globulina verificou-se a boa qualidade das amostras de DNA armazenadas a -20 ° C por período de até 9 anos e re-analisadas retrospectivamente. Além disso, todos os resultados

discordantes entre os três iniciadores foram repetidos (em triplicata) pelo menos duas vezes.

As amostras de DNA dos 122 pacientes negativos para toxoplasmose na qPCR tiveram resultados negativos no ELISA (IgG), cPCR e no diagnóstico clínico. Somente uma amostra apresentou resultado positivo no REP-529. Assim, ambos iniciadores moleculares apresentaram especificidades elevadas (99,2% e 100% respectivamente).

Das 393 amostras clínicas com ELISA positivo (IgG), 146 tiveram cPCR positivo e estes pacientes desenvolveram infecção sintomática. Considerando, também, os resultados de cPCR e o diagnóstico clínico, as sensibilidades de REP-529 e B1 foram de 95,9% e 83,6%, respectivamente. Os resultados em médias de C_T para REP-529 e B1 foram $31,71 \pm 0,36$ e $32,12 \pm 0,38$, respectivamente. Embora as amostras de DNA armazenadas até 9 anos tenham sido verificadas usando dois genes humanos (β -globulina e 18S); 6 (2,8%) amostras foram falsas negativas determinadas por REP-529 e 24 (16,4%) por B1 na primeira parte do estudo (retrospectiva). Apesar disso, estes resultados confirmam que o REP-529 foi consideravelmente melhor do que B1 na detecção do DNA de *T. gondii*. Esses dados também foram confirmados em outros estudos. Edvinsson *et al.*¹⁰⁵ investigando a sensibilidade dos iniciadores moleculares REP-529 e B1 em amostras biológicas com baixa carga parasitária, mostraram que o REP-529 apresentou maior sensibilidade e precisão diagnóstica. Belaz *et al.*¹²⁰ também realizaram um estudo retrospectivo de 10 anos comparando o desempenho dos iniciadores REP-529 e B1 no diagnóstico de rotina, os resultados também demonstraram a maior sensibilidade do REP-529 comparado ao B1^{120, 104, 105}.

Quando apenas o qPCR para ambos os iniciadores moleculares foram testados no diagnóstico de rotina, as reações também foram feitas com o DNA extraído recentemente (em um intervalo até 48 horas após a coleta). A comparação dos desempenhos REP-529 e B1 também foi analisada prospectivamente em 292 amostras clínicas coletadas em 2016 (Tabela 4). Assim, um total de 807 amostras de DNA foram analisadas retrospectivamente e prospectivamente. A partir deles, 217 (26,9%) apresentaram resultados de PCR positivos, pelo menos um iniciador e diagnóstico clínico confirmado como toxoplasmose sintomática. O DNA de *T. gondii* foi amplificado por REP-529 em 211 amostras clínicas (97,23%), enquanto o B1 amplificou apenas 78,80% deles. Os resultados positivos determinados pelo REP-529

em 18 amostras de cérebro da AU também foram confirmados pela visualização do parasita por imunohistoquímica em tecidos cerebrais. No entanto, 5 deles tiveram resultados negativos quando o B1 foi utilizado. Embora essas análises tenham sido realizadas em amostras clínicas brasileiras, elas confirmam achados de outros estudos realizados em amostras clínicas europeias com o objetivo de comparar as sensibilidades de ambas as regiões do DNA, o que mostrou que a região 529 era mais sensível do que a do gene B1, sendo provável que os resultados negativos utilizando o B1 podem sugerir baixa carga parasitária no material analisado ^{97, 105, 120, 132}.

O índice de concordância entre três iniciadores moleculares (B22-B23/REP-529/B1) variou de 83,56% a 95,89%. Embora os genes B22-B23 e REP-529 ampliem diferentes regiões genéticas de *T. gondii*, ambos tiveram quase o mesmo poder na detecção de *T. gondii*. Por outro lado, os índices de concordância entre B1 e REP-529 ou B22-B23 foram 83,87 e 83,56, respectivamente. A combinação de B1 não aumentou a sensibilidade da PCR, uma vez que nenhuma amostra apresentou resultado positivo no B1 e negativo em REP-529. Apesar de B1 e B22-B23 amplificar a mesma região do gene B1 (Figura 6), eles apresentaram diferentes sensibilidades. Embora a genotipagem de *T. gondii* não tenha sido determinada nos 217 pacientes com PCR positiva, provavelmente, diferentes genótipos brasileiros podem estar circulando entre esses pacientes, como já demonstrado por outros ^{133, 134}. Uma pequena confirmação desses dados foi verificada pela genotipagem de 15 das 18 amostras de cérebro de AU analisadas nesse estudo. Entre eles, seis genótipos foram determinados em nosso estudo anterior ¹¹⁸.

Os dados de sequenciamento do REP-529 mostram uma sequência de nucleotídeos altamente conservada entre várias cepas e isolados de *T. gondii* e, igualmente importante para a detecção por base de sonda de hibridação de amplicões, entre diferentes cópias intragenômicas deste alvo específico. No estudo realizado por Reischl *et al.* ¹³⁵ o melhor desempenho do iniciador REP-529 comparado ao B1, deve-se as cópias intragênicas individuais do alvo REP-529 que são conservadas no nível de sequência, esse alto número de cópias de conjunto de iniciadores leva a um nível máximo de sensibilidade analítica na prática rotineira. O baixo desempenho do conjunto de iniciadores B1 provavelmente se deve a baixa carga parasitária presente na amostra, lembrando que o B1 se repete 35 vezes no genoma do parasita

Esse foi um grande estudo que envolveu 807 amostras de pacientes com suspeita clínica de toxoplasmose, vinda de vários laboratórios do estado de São Paulo. A perspectiva desse estudo foi de melhorar desempenho e a precisão diagnóstica para toxoplasmose sintomática. O rápido diagnóstico melhora significativamente a taxa de tratamento bem-sucedido. O REP-529 pode ser uma ótima escolha de sequência para amostras com baixa carga parasitária.

6 CONCLUSÃO

- a) No estudo retrospectivo, as sensibilidades de REP-529 e B1 foram de 95,9% e 83,6%, respectivamente. Um total de 6 (2,8%) amostras foram falso negativas determinadas por REP-529 e 24 (16,4%) por B1;
- b) A comparação dos desempenhos REP-529 e B1 foi analisada prospectivamente e retrospectivamente (217 amostras clínicas positivas) e mostrou que REP-529 foi positivo em 211 amostras clínicas (97,23%), enquanto o B1 amplificou apenas 78,80% deles;
- c) B1 e REP-529 apresentaram boa reprodutibilidade, uma vez os resultados sempre foram semelhantes nas réplicas e em diferentes reações. Em adição ambos iniciadores moleculares apresentaram especificidades elevadas. O índice de concordância dos resultados entre os B22-B23 e REP-529 foi satisfatório (95,89). Porém, os índices de concordância dos iniciadores B22-B23 e REP-529 com o B1 foram inferiores (83,56%). A combinação de B1 e REP-529 não aumentou a sensibilidade da PCR, uma vez que nenhuma amostra apresentou resultado positivo no B1 e negativo em REP-529;
- d) Os resultados mostraram que o REP-529 é o iniciador ideal para uso na rotina de diagnóstico molecular da toxoplasmose sintomática.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dubey JP. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol. 1998 Jul;28(7):1019-24.
2. Pereira-Chiocola VL, Vidal JE, Su C. *Toxoplasma gondii* infection and cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients. Future Microbiol. 2009 Dec;4(10):1363-79.
3. Ravdin JJ. Protozoal Disease. In: Mandell, GL, Benett, JE, Dolin R. Principles and Practice of Infectious Disease. New York: Churchill Livingstone, 1995. P.2393-95.
4. Hill DE, Chirukandoth S, Dubey JP. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. Anim Health Res Rev. 2005 Jun;6(1):41-61.
5. Dubremetz JF. Host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. Trends Microbiol. 1998 Jan;6(1):27-30.
6. Rey L. Parasitologia. 3º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. *Toxoplasma gondii* e Toxoplasmose; p. 321-34.
7. Coutinho SG, Vergara TRC. Toxoplasmose. In: Coura JR, editor. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 815-829.
8. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int J Parasitol. 2000; 30(12-13):1217-58.
9. Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. Lancet. 2004 Jun 12; 363(9425):1965-76.
10. Pappas G, Roussos N, Falagas ME. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. Int J Parasitol. 2009 Oct;39(12):1385-94.

11. Jones JL, Kruszon-Moran D, Sanders-Lewis K, Wilson M. *Toxoplasma gondii* infection in the United States, 1999-2004, decline from the prior decade. *Am J Trop Med Hyg*. 2007 Sep;77(3):405-10.
12. Cantos GA, Prando MD, Siqueira MV, Teixeira RM. Toxoplasmose: ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e diagnóstico. *Rev Assoc Med Bras*. 2000 Oct-Dec; 46(4):335-41.
13. 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 Microbiol*. 2001 Jun;39(6):2267-71.
14. Mattos C de C, Spegiorin LC, Meira Cda S, Silva Tda C, Ferreira AI, Nakashima F, Pereira-Chiocola VL, Mattos LC *et al*. Anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in pregnant women and their newborn infants in the region of São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil. *Sao Paulo Med J*. 2011;129(4):261-6.
15. Frenkel JK, Dubey JP. Toxoplasmosis and its prevention in cats and man. *J Infect Dis*. 1972 Dec;126(6):664-73.
16. Remington JS, McLeod R, Thulliez P, Desmonts G. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein J, editores. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. Philadelphia: WB Saunders; 2001. P. 205-346.
17. Cenci-Goga BT, Rossitto PV, Sechi P, McCrindle CM, Cullor JS. *Toxoplasma* in animals, food, and humans: an old parasite of new concern. *Foodborne Pathog Dis*. 2011 Jul;8(7):751-62.
18. Jamra LMF. Contribuição para a epidemiologia de toxoplasmose. Inquérito em 100 famílias de uma área da cidade de São Paulo. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo; 1964.
19. Carruthers, VB. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Acta Trop*. 2002 Feb;81(2):111-22.

20. Bushrod F. Toxoplasmosis: not just a risk during pregnancy. Clin Lab Inter. 2004; 28: 4.
21. Contreras M, Schenone H, Salinas P, Sandoval L, Rojas A, Villarroel F, *et al.* Seroepidemiology of human toxoplasmosis in Chile. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1996 Nov-Dec;38(6):431-5.
22. Santos TR, Costa AJ, Toniollo GH, Luvizotto MC, Benetti AH, Santos RR *et al.* Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in dairy cattle, dogs, and humans from the Jauru micro-region, Mato Grosso state, Brazil. Vet Parasitol. 2009 May 12;161(3-4):324-6.
23. Buxton D. Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis spp.*) in sheep and goats: recent advances. Vet Res. 1998 May-Aug;29(3-4):289-310.
24. Dubey JP. The history of *Toxoplasma gondii* – The first 100 years. J Eukaryot Microbiol. 2008 Nov-Dec;55(6):467-75
25. Innes EA. A brief history and overview of *Toxoplasma gondii*. Zoonoses Public Health. 2010 Feb;57(1):1-7.
26. Soldati D, Meissner M. Toxoplasma as a novel system for motility. Curr Opin Cell Biol. 2004 Feb;16(1):32-40.
27. Blader IJ, Saeij JP. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion and virulence. APMIS. 2009 May;117(5-6):458-76.
28. Center For Disease Control And Prevention. Parasites – Toxoplasmosis (*Toxoplasma* infection). Image: *Toxoplasma gondii* in mouse ascitic fluid. [Citado em 13 de Julho, 2017]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/index.html>
29. Dubey JP, Beattie CP. Toxoplasmosis of Man and Animals. Boca Raton: CRC ress. 1988. 220 p.

30. Frenkel JK. *Toxoplasma* in and around us. BioScience. 1973 Jun; 23 (6): 343-352.
31. Universidade Federal do Rio Grande do sul- UFRGS. *Toxoplasma gondii*. Cisto tecidual contendo bradizoítos. [Citado em 13 de Julho, 2017]. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/para-site/siteantigo/Imagensatlas/Protozoa/Toxoplasma.htm>
32. Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. Clin Microbiol Infect. 2002 Oct;8(10):634-40.
33. Kravetz JD, Federman DG. Toxoplasmosis in pregnancy. Am J Med. 2005 Mar;118(3):212-6.
34. Dubey JP, Frenkel JK. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. J Protozool. 1976 Nov;23(4):537-46.
35. Frenkel JK, Dubey JP, Miller NL. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages indentified as coccidian oocysts. Science. 1970 Feb 6;167(3919):893-6.
36. Dubey JP. Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. Vet Parasitol. 2004 Dec 9;126(1-2):57-72.
37. Lappin MR. Feline infectious uveitis. J Feline Med Surg. 2000 Sep;2(3):159-63.
38. Frenkel JF, Vidal JE. Toxoplasmose. In: Veronesi R, Focacci R. Tratado de infectologia. São Paulo: Atheneu; 2010.
39. Dubey JP, Lago EG, Gennari SM, Su C, Jones JL. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease and epidemiology. Parasitology. 2012 Sep;139(11):1375-424.
40. Mele A, Paterson PJ, Prentice HG, Leoni P, Kibbler CC. Toxoplasmosis in bone marrow transplantation : a report of two cases and systematic review of the literature. Bone Marrow Transplant. 2002 Apr;29(8):691-8.

41. Remington JS, Klein JO. Infections diseases of the fetus and newborn infant. 4^oed. W B Saunders Company; 1995. p.140-268.
42. Copeland R, Phillpotts BA. Ocular manifestations of HIV. eMedicine 2006; 1-46.
43. Glasner PD, Silveira C, Kruszon-Moran D, Martins MC, Burnier Jr M, Silveira S, *et al.* An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. Am J Ophthalmol. 1992 Aug 15;114(2):136-44.
44. Montoya JG, Remington JS. Studies on the serodiagnosis of toxoplasmic lymphadenitis. Clin Infect Dis. 1995 Abr; 20 (4): 781-789.
45. Amato Neto V, Medeiros EAS, Levi GC, Duarte MIS. Toxoplasmose. 4^oed. São Paulo: Sarvier; 1995. p.154.
46. 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 Sep 15;331(11):695-9.
47. Gilbert R. Screening option in the manegement of congenital toxoplasmosis. Clinical Laboratory International. 2004 Jun; 28:8-12.
48. Carruthers, VB. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. Acta Trop. 2002 Feb;81(2):111-22.
49. Petersen E. Prevention and treatment of congenital toxoplasmosis. Expert Rev Anti Infect Ther 2007; 5: 285-93.
50. Burg JL, Perelman D, Kasper LH, Ware PL, Boothroyd JC. Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. J Immunol. 1988 Nov 15;141(10):3584-91.
51. Ferreira MS. Infections by protozoa in immunocompromised hosts. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000 Sep; 95(1 suppl):159-62.

52. 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 Microbiol. 1997 Oct;35(10):2639-41.
53. Luft BJ, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. Clin Infect Dis. 1992 Ago;15 (2): 211-222.
54. Potergies 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 May 11(5):297-304.
55. Centers for Disease Control and Prevention. 1993 Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. JAMA. 1993 Feb 10;269(6):729-30.
56. Medeiros BC, Medeiros CR, Werner B, Lodo G, Pasquini R, Biegi- Torres LF. Disseminated toxoplasmosis after bone marrow transplantation: report of 9 cases. Transpl Infect Dis. 2001 Mar;3(1):24-8.
57. Saadatnia G, Golkar M. A review on human toxoplasmosis. Scand J Infect Dis. 2012; 44:1–10.
58. Barbosa CJ, Molina RJ, de Souza MB, Silva AC, Micheletti AR, dos Reis MA, *et al.* Disseminated toxoplasmosis presenting a sepsis in two AIDS patients. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2007 Mar-Apr;49(2):113-6.
59. Schmidt M, Sonnevile R, Schnell D, Bigé N, Hamidfar R, Mongardon N, *et al.* Clinical features and outcomes in patients with disseminated toxoplasmosis admitted to intensive care: a multicenter study. Clin Infect Dis. 2013 Dec;57(11):1535-41.
60. Botterel F, Ichai P, Feray C, Bouree P, Saliba F, Tur Raspa R, *et al.* Disseminated Toxoplasmosis, resulting from Infection of Allograft after Orthotopic Liver Transplantation: Usefulness of Quantitative PCR. J Clin Microbiol. 2002 May;40(5):1648-50.
61. Weiss LM, Dubey JP. Toxoplasmosis: a history of clinical observations. Int J Parasitol. 2009 Jul 1;39(8):895-901

62. Bossi P, Paris L, Caumes E, Katlama C, Danis M, Bricaire F. Severe acute disseminated toxoplasmosis acquired by an immunocompetent patient in French Guiana. *Scand J Infect Dis.* 2002; 34:311-14.
63. Pomares C, Montoya JG. Laboratory diagnosis of congenital toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 2016 Oct;54(10):2448-54.
64. Teixeira LE, Kanunfre KA, Shimokawa PT, Targa LS, Rodrigues JC, Domingues W, *et al.* The performance of four molecular methods for the laboratory diagnosis of congenital toxoplasmosis in amniotic fluid samples. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2013 Sep-Oct;46(5):584-8.
65. Gilbert RE, Freeman K, Lago EG, Bahia-Oliveira LM, Tan HK, Wallon M, *et al.* Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008 Aug 13;2(8):e277.
66. Vidal JE, Hernandez AV, de Oliveira AC, Dauar RF, Barbosa SP Jr, Focaccia R. Cerebral toxoplasmosis in HIV-positive patients in Brazil: clinical features and predictors of treatment response in the HAART era. *AIDS Patient Care STDS.* 2005 Oct;19(10):626-34.
67. Contreras MC, Sandoval L, Salinas P, Muñoz P, Vargas S. Utilidad diagnóstica de ELISA IgG, IgM, IgA y ELISA avidéz de IgG em toxoplasmosis reciente y crónica. *Bol Chil Parasitol.* 2000; 55 (1-2):1-10.
68. Shaapan RM, El-Nawawi FA, Tawfik MA. Sensivity and specificity of various serological tests for the detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected sheep. *Vet Parasitol.* 2008 May 31;153(3-4):359-62.
69. Sanchez MCA. Testes Sorológicos. In: Ferreira AW, Ávila SLM, editores. *Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes.* Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2001. p. 9-44.
70. Camargo ME. Toxoplasmosis. In: Ferreira AW, Ávila SLM, editores. *Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes.* Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2001. p. 65-174.

71. Camargo ME, da Silva SM, Leser PG, Granato CH. Avidity of specific IgG antibodies as markers of recent primary infection caused by *Toxoplasma gondii*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1991; 33: 213-218.
72. Lappalainen M, Hedman K. Serodiagnosis of toxoplasmosis. The impact of measurement of IgG avidity. Ann Ist Super Sanita. 2004; 40:81-88.
73. Bertozzi LC, Suzuki LA, Rossi CL. Serological diagnosis of toxoplasmosis: usefulness of IgA detection and IgG avidity determination in a patient with a persistent IgM antibody response to *Toxoplasma gondii*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1999; 41: 175-177.
74. Joseph P, Calderón MM, Gilman RH, Quispe ML, Cok J, Ticona E, *et al*. Optimization and evaluation of a PCR assay for detecting toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. J Clin Microbiol. 2002 Dec;40(12):4499-503.
75. Navia BA, Petito CK, Gold JW, Cho ES, Jordan BD, Price RW. Cerebral toxoplasmosis complicating the acquired immune deficiency syndrome: clinical and neuropathological findings in 27 patients. Ann Neurol. 1986 Mar;19(3):224-38.
76. Bishburg E, Eng RH, Slim J, Perez G, Johnson E. Brain lesions in patients with acquired immunodeficiency syndrome. Arch Intern Med. 1989 Apr; 149(4):941-3.
77. Grant IH, Gold JW, Rosenblum M, Niedzwiecki D, Armstrong D. *Toxoplasma gondii* serology in HIV-infected patients: the development of central nervous system toxoplasmosis in AIDS. AIDS. 1990 Jun;4(6):519-21.
78. 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 Sep 30;329(14):995-1000.
79. Aarons E, Hawkins D, Nelson M, Gazzard B. Testing and management of *Toxoplasma* serology in HIV-seropositive patients. AIDS. 1996 Apr; 10(4):443-4.

80. Raffi F, Franck J, Pelloux H, Derouin F, Reliquet V, Ambroise-Thomas P, *et al.* Specific anti-toxoplasmic IgG antibody immunoblot profiles in patients with AIDS-associated *Toxoplasma* encephalitis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1999 May; 34(1):51-6.

81. 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 Diagn Lab Immunol.* 2001 May;8(3):579-84.

82. 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 Microbiol.* 2005 Oct;43(10):5044-7.

83. Bruce A, Bray D, Johnson A, Lewis J, Rass M, Roberts K, *et al.* Fundamentos da biologia celular: Uma introdução da biologia molecular da célula. Porto Alegre: Artes médicas sul, 1999. p. 864.

84. Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect.* 2004 Mar;10(3):190-212.

85. Silva L, Passos, Soares N. DNA Forensce- Coleta de amostras biológicas em locais de crime para estudo do DNA. Maceio: edUFAL; 2002. 84 p

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

87. 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 Microbiol.* 1993 Jul;31(7):1866-9.

88. Montoya JG. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. *J Infect Dis.* 2002 Feb;185 Suppl 1:s73-82.

89. 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 Jul;172(1):319-22.

90. Pelloux H, Guy E, Angelici MC, Aspoëck H, Bessieères MH, Blatz R , *et al.* A second European collaborative study on polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii*, involving 15 teams. FEMS Microbiol Lett. 1998 Aug 15;165(2):231-7.
91. Vidal JE, Colombo FA, de Oliveira AC, Focaccia R, Pereira-Chiocola VL. PCR assay using cerebrospinal fluid for diagnosis of cerebral toxoplasmosis in Brazilian AIDS patients. J Clin Microbiol. 2004 Oct; 42(10):4765-8.
92. 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 Jan 1;40(1):79-81.
93. Mesquita RT, Ziegler AP, Hiramoto RM, Vidal JE, Pereira-Chiocola VL. Real-time quantitative PCR in cerebral toxoplasmosis diagnosis of Brazilian human immunodeficiency virus-infected patients. J Med Microbiol. 2010 Jun;59(Pt 6):641-7.
94. Burg JL, Grover CM, Pouletty P, Boothroyd JC. Directed and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 1989 Aug; 27(8):1787–92.
95. 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 Mar;48(3):447-56.
96. 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 Microbiol. 2003 Oct;41(10):4826-8.
97. 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 Microbiol. 2004 Apr;42(4):1719-22.
98. Okay TS, Yamamoto L, Oliveira LC, Manuli ER, Andrade Junior HF, Del Negro GM. Significant performance variation among PCR systems in diagnosing congenital toxoplasmosis in São Paulo, Brazil: Analysis of 467 amniotic fluid samples. Clinics (São Paulo). 2009;64(3):171-6.

99. Boothroyd JC, Nagel SD, Burg JL, Perelman D. Molecular Approaches to the Study of *Toxoplasma gondii*. In: Sande MA, Leech JH, Root RK, editores. Contemporary Issues in Infectious Diseases. New York: Churchill-Livingston; 1987.
100. Kompalic-Cristo A, Nogueira SA, Guedes AL, Frota C, González LF, Brandão A, *et al.* Lack of technical specificity in the molecular diagnosis of toxoplasmosis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2004 Feb;98(2):92-5.
101. 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. Int J Parasitol. 2000 Jan;30(1):69-75.
102. 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 Microbiol. 2004 Jul;53(Pt 7):629-32.
103. Calderaro A, Piccolo G, Gorrini C, Peruzzi S, Zerbini L, Bommezzadri S, *et al.* Comparison between two Real-time PCR assays and a nested-PCR for the detection of *Toxoplasma gondii*. Acta Biomed. 2006 Aug;77(2):75-80.
104. Cassaing S, Bessières MH, Berry A, Berrebi A, Fabre R, Magnaval JF. Comparison between Two Amplification Sets for Molecular Diagnosis of Toxoplasmosis by Real-Time PCR. J Clin Microbiol. 2006 Mar;44(3):720-4.
105. Edvinsson B, Lappalainen M, Evengård B; ESCMID Study Group for Toxoplasmosis. Real-time PCR targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis. Clin Microbiol Infect. 2006 Feb;12(2):131-6.
106. Mesquita RT, Vidal JE, Pereira-Chioccia VL. Molecular diagnosis of cerebral toxoplasmosis: comparing markers that determine *Toxoplasma gondii* by PCR in peripheral blood from HIV-infected patients. Braz J Infect Dis. 2010 Jul-Aug;14(4):346-50.
107. Sambrook, J Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press. 1989.

108. Novais CM, Pires-Alves M. PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase (PCR). *Rev Biotecnol Cienc Desenvol*. 2004;33:10:3.
109. Remington JS, Thulliez P, Montoya JG. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*. 2004 Mar; 42(3):941-45.
110. 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*. *Am J Obstet Gynecol*. 2004 Mar;190(3):797-802.
111. 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 Microbiol*. 2000 Aug;38(8):2929-32.
112. Teixeira LE, Kanunfre KA, Shimokawa PT, Targa LS, Rodrigues JC, Domingues W, *et al*. The performance of four molecular methods for the laboratory diagnosis of congenital toxoplasmosis in amniotic fluid samples. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013 Sep-Oct;46(5):584-8.
113. Ajzenberg D, Lamaury I, Demar M, Vautrin C, Cabié A, Simon S, *et al*. Performance testing of PCR assay in blood samples for the diagnosis of toxoplasmic encephalitis in AIDS patients from the French Departments of America and genetic diversity of *Toxoplasma gondii*: A prospective and multicentric study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 Jun 29;10(6):e0004790.
114. Gonçalves MA, Mattos CC, Spegiorin LC, Olini DC, Olini AH, Mattos LC. Seropositivity rates for toxoplasmosis, rubella, syphilis, cytomegalovirus, hepatitis and HIV among pregnant women receiving care at a public health service, São Paulo state, Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2010 Nov-Dec;14(6):601-5.
115. Murata FHA, Ferreira MN, Camargo NS, Santos GS, Spegiorin LCJF, Silveira-Carvalho AP, *et al*. Frequency of the anti-*Toxoplasma gondii* antibodies class IgA, IgM and IgG in high-risk pregnancy women, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016 Jul-Aug; 49(4):512-4.

116. Meira CS, Costa-Silva TA, Vidal JE, Ferreira IM, 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 Microbiol. 2008 Jul;57(Pt 7):845-50.
117. da Costa-Silva TA, da Silva Meira C, Frazzatti-Gallina N, Pereira-Chiocola VL. *Toxoplasma gondii* antigens: recovery analysis of tachyzoites cultivated in Vero cell maintained in serum free medium. Exp Parasitol. 2012 Apr; 130(4):463-9.
118. Bastos da Silva I, Batista TP, Martines RB, Kanamura CT, Ferreira IM, Vidal JE, et al. Genotyping of *Toxoplasma gondii*: DNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded autopsy tissues from AIDS patients who died by severe disseminated toxoplasmosis. Exp Parasitol. 2016; 165:16-21.
119. Lee CN, Cavanagh HM, Lo ST, Ng CS. Human papillomavirus infection in non-neoplastic uterine cervical disease in Hong Kong. Brit J of Biomed Science. 2001; 58:85-91.
120. Belaz S, Gangneux JP, Dupretz P, Guiguen C, Robert-Gangneux F. A 10-year retrospective comparison of two target sequences, REP-529 and B1, for *Toxoplasma gondii* detection by quantitative PCR. J Clin Microbiol. 2015 Apr;53(4):1294-300.
121. Fekkar A, Bodaghi B, Touafek F, Le Hoang P, Mazier D, Paris L. Comparison of immunoblotting, calculation of the Goldmann-Witmer coefficient, and real-time PCR using aqueous humor samples for diagnosis of ocular toxoplasmosis. J Clin Microbiol. 2008 Jun;46(6):1965-7.
122. Robert-Gangneux F, Dupretz P, Yvenou C, Quinio D, Poulain P, Guiguen C, et al. Clinical relevance of placenta examination for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. Pediatr Infect Dis J. 2010 Jan;29(1):33-8.
123. Lee CN, Cavanagh HM, Lo ST, Ng CS. Human papillomavirus infection in non-neoplastic uterine cervical disease in Hong Kong. Brit J of Biomed Science. 2001; 58: 85-91.

124. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009 Apr;55(4):611-22.
125. Broeders S, Huber I, Grohmann L, Berben G, Taverniers I, Mazzara M, *et al.* Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. *Trends Food SciTech.* 2014 Jun; 37(2):115–26.
126. Mattos CC, Meira CS, Ferreira AI, Frederico FB, Hiramoto RM, Almeida GD Jr, *et al.* Contribution of laboratory methods in diagnosing clinically suspected ocular toxoplasmosis in Brazilian patients. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011 Jul;70(3):362-6.
127. 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*. *APMIS.* 2004 Jun;112(6):342-8.
128. Lin MH, Chen TC, Kuo TT, Tseng CC, Tseng CP. Real time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microb.* 2000 Nov; 38 (11):4121-25.
129. Jones CD, Okhravi N, Adamson P, Tasker S, Lightman S. Comparison of PCR detection methods for B1, P30, and 18S rDNA genes of *Toxoplasma gondii* in aqueous humor. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000 Mar;41(3):634-44.
130. Abu Al-Soud W, Rådström P. Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. *Appl Environ Microbiol.* 1998 Oct;64(10):3748-53.
131. Wahab T, Edvinsson B, Palm D, Lindh J. Comparison of the AF146527 and B1 repeated elements, two real-time PCR targets used for detection of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol.* 2010 Feb;48(2):591-2.
132. Robert-Gangneux F, Belaz S. Molecular diagnosis of toxoplasmosis in immunocompromised patients. *Curr Opin Infect Dis.* 2016 Aug;29(4):330-9.

133. Ferreira IM, Vidal JE, de Mattos Cde C, de Mattos LC, Qu D, Su C, *et al.* *Toxoplasma gondii* isolates: multilocus RFLP-PCR genotyping from human patients in Sao Paulo State, Brazil identified distinct genotypes. *Exp Parasitol.* 2011 Oct;129(2):190-5.
134. Carneiro AC, Andrade GM, Costa JG, Pinheiro BV, Vasconcelos-Santos DV, Ferreira AM, *et al.* Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* revealed highly diverse genotypes for isolates from newborns with congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil. *J Clin Microbiol.* 2013 Mar;51(3):901-7.
135. 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.* 2003 May 2;3:7

ANEXO A - Aprovação no Comitê de Ética Humana CONEP-IAL/SES, número 815489 sob título “Otimização e validação do diagnóstico molecular da toxoplasmose em um laboratório de Saúde Pública”

ANEXO B – Artigo científico: Molecular diagnosis of symptomatic toxoplasmosis: a 9-year retrospective and prospective study in a referral laboratory in São Paulo, Brazil.