



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

MARIANA ZANCHETTA E GAVA

**INFECÇÃO PELO *TOXOPLASMA GONDII* EM PACIENTES
VIVENDO COM HIV/AIDS: SORORREATIVIDADE E PERFIL
CLÍNICO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre(a) em Doenças Tropicais.

Orientador(a): Prof. Dr. Helio Langoni
Coorientador(a): Prof. Dr. Alexandre Naime Barbosa

**Botucatu
2022**

Mariana Zanchetta e Gava

Infecção pelo Toxoplasma Gondii em Pessoas
Vivendo com HIV/Aids: Sororreatividade e Perfil Clínico

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestre(a) em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. Helio Langoni
Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Naime Barbosa

Botucatu

2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Gava, Mariana Zanchetta e.

Infecção pelo *Toxoplasma Gondii* em pacientes vivendo com HIV/AIDS : sororreatividade e perfil clínico / Mariana Zanchetta e Gava. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Helio Langoni

Coorientador: Alexandre Naime Barbosa

Capes: 40101096

1. Toxoplasma. 2. Zoonoses. 3. HIV. 4. Síndrome de imunodeficiência adquirida. 5. Testes imunológicos. 6. Biologia molecular.

Palavras-chave: Biologia molecular; Imunodiagnóstico; PVHA; *T.gondii*; Zoonoses.

Mariana Zanchetta e Gava

Infecção pelo *Toxoplasma Gondii* em Pessoas Vivendo com HIV/Aids:
Sororreatividade e Perfil Clínico

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais

Orientador: Prof. Dr. Helio Langoni

Comissão examinadora

Prof. Fernando Luiz Tobias
Laboratório de Microbiologia e Imunologia Veterinária
Universidade Vila Velha-Vila Velha-ES

Profª. Lenice do Rosario de Souza
Departamento de Infectologia, Dermatologia, Diagnóstico por Imagem e Radioterapia
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu

Botucatu, 30 de março de 2022.

Dedico a todos os
pacientes, sem eles essa
pesquisa não seria possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a Nossa Senhora da Penha, por não me abandonarem nos momentos de frustração e angústia, pelo discernimento, força e sabedoria para entender e aceitar cada momento vivido.

Agradeço ao meu pai, (in memoriam), por todo amor e dedicação para que esse momento acontecesse, por ser minha maior inspiração na vida. Te amo pra sempre.

Agradeço a minha amada mãe, minha melhor amiga e incentivadora, por sempre estar ao meu lado e não medir esforços pra me ver feliz. Obrigada mãe, por sempre estar presente, por todo carinho, amor, conselhos e acolhimento nos momentos mais difíceis. Dedico esse trabalho a você.

Agradeço imensamente ao meu orientador e amigo, Prof. Helio Langoni, por todo carinho, incentivo, conselhos e oportunidades durante os anos de pós-graduação. Obrigada por sempre acreditar em mim, e não medir esforços pro meu sucesso e felicidade.

Agradeço ao meu coorientador, Prof. Alexandre Naime Barbosa por todo apoio, carinho, disponibilidade, boa vontade, ensinamentos e dedicação durante a realização da pesquisa.

Agradeço a Fatinha, minha segunda mãe, por sempre cuidar de mim com tanto amor e carinho, por estar ao meu lado, durante toda minha vida.

Agradeço ao meu irmão, pelos conselhos, carinho e amor durante toda minha vida.

Agradeço aos meus irmãos de coração Natalia Conti e Felipe, por serem os melhores amigos que eu poderia ter, por sempre me entenderem, incentivarem e me acalmarem em todos os momentos da minha vida.

Agradeço aos meus tios Juarez e Marilza Vieira, por todo apoio e amor. Também agradeço as minhas primas Marina, Juana e Carolina, por toda amizade, torcida, companheirismo e apoio.

Agradeço aos meus filhos pets, Rebeca, Hamtaro (in memoriam) e Frida, por todos os momentos vividos, e por tornarem a minha vida mais leve, e me ensinarem o real significado de cuidado, amor, confiança e responsabilidade.

Agradeço aos meus amigos, Noelle, Bruna, Bruna Cury, Paulinha, Nassarah, Mayara, Juliana, Milena, Sâmea, Jonas e Diana pela amizade, risadas, ombro amigo e todo amor durante essa fase.

Agradeço a os funcionários do Laboratório de Sorologia e Endocrinologia que me ensinaram com toda paciência, todas as técnicas realizadas durante o estágio. Em especial ao Dr. Alessandro, Dra. Rita Borges e Dra. Thaianne por toda ajuda e ensinamentos durante a realização da pesquisa.

Agradeço a todos os funcionários do Serviço de Infectologia do Hospital das Clínicas e Serviço de Ambulatórios Especializados de Infectologia “Domingos Alves Meira”, por todo auxílio e paciência. Em especial a Dr^a. Elisa Ige Kusabara, Dr. Eliaquim Ribeiro e Dra. Karina Alves de Oliveira por todo cuidado e carinho.

Agradeço aos residentes/técnico do Laboratório de Diagnóstico de Zoonoses, pela ajuda, risadas e auxílio na realização das análises. Em especial, ao Benedito Menozzi, Dayane e Caroline pela amizade.

Agradeço aos professores e funcionários da FMVZ e da FMB, pela possibilidade de realizar minhas análises e pelos anos de convivência e amizade.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida desde março de 2019 a setembro de 2021.

Agradeço ao programa de pós-graduação em Doenças Tropicais pelas prorrogações de prazo, e apoio para finalização dessa pesquisa, em especial ao Prof. Carlos Magno Fortaleza pela empatia.

Agradeço ao Escritório de Apoio à Pesquisa (EAP) da FMB/UNESP pelas análises estatísticas, em especial ao Prof. José Corrente pelos ensinamentos e análises realizadas.

RESUMO

GAVA, M.Z.E. **Infecção pelo *Toxoplasma Gondii* em Pessoas Vivendo com HIV/Aids: Sororreatividade e Perfil Clínico.** 2022. 64 f. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, 2022.

A toxoplasmose é uma das principais infecções oportunistas que afetam as pessoas vivendo com HIV/Aids (PVHA), levando a alta taxa de morbidade e mortalidade. Diante da importância da toxoplasmose, tornou-se imprescindível o levantamento de dados epidemiológicos referentes à infecção pelo *T. gondii*, principalmente, em relação ao impacto para saúde pública. O presente estudo objetivou avaliar a prevalência de exposição e a presença de doença ativa por *T. gondii* em PVHA, atendidos no Serviço de Infectologia do Hospital das Clínicas (HC-FMBUnesp) e Serviço de Ambulatórios Especializados de Infectologia “Domingos Alves Meira” (SAEI-DAM), unidade do complexo médico-hospitalar da Faculdade de Medicina de Botucatu, no período março de 2020 a janeiro de 2022. Foi realizado um estudo de coorte prospectivo, no qual uma amostragem de conveniência foi estudada, baseando-se no fluxo histórico do Serviço de Infectologia do Hospital das Clínicas, onde os critérios históricos de inclusão foram categorizados por dois grupos, sendo eles: Grupo 01 sintomático para neurotoxoplasmose (NTX) e Grupo 02 Controle e sem sintomatologia para NTX. Foram coletadas amostras de soro, que posteriormente foram encaminhadas ao Laboratório de Diagnóstico de Zoonoses (FMVZ-UNESP), para realização do exame de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). A Quimioluminescência foi realizada no Laboratório de Sorologia e Endocrinologia do Hospital das Clínicas (HC-FMB-Unesp). A Reação em Cadeia da Polimerase Convencional foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada a Zoonoses (FMVZ-UNESP). Dos 10 pacientes, três (30%) não foram sororreagentes para pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii*, tanto na RIFI quanto na quimioluminescência. Adicionalmente, 7 (70%) pacientes dos dois grupos (1 e 2), apresentaram anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii* na primeira coleta em ambas as técnicas sorológicas, e seis (60%) foram sororreagentes nas duas técnicas no momento da segunda coleta. No momento da terceira coleta, 3 (30%) reagiram para os dois exames, e mantiveram-se sororreagentes para os dois exames sorológicos na quarta coleta. Na pesquisa de anticorpos IgG anti-*T.gondii* pela RIFI, o título prevalente foi 4096 (50%), seguido por 1024 (30%), e 64 (20%), enquanto que para os anticorpos IgM anti-*T.gondii* foi 1024 (50%), seguido por 4096 (20%), 64 (10%) e 256 (10%). E na pesquisa de anticorpos IgG anti-*T.gondii* pela quimioluminescência, o título prevalente foi $\geq 3,0$ (40%), seguido por 2,90 (30%), 1,60 (10%), 1,50 (10%) e 1 (10%). E para os anticorpos IgM anti-*T.gondii* foi 0,60 (20%), seguido por 70 (10%), 80 (10%) e 90 (10%). Das 10 amostras de sangue analisadas pela Reação em Cadeia da Polimerase convencional, todas mostraram-se negativas. A realização deste estudo permitiu a determinação do perfil clínico da neurotoxoplasmose em PVHA, podendo contribuir na implementação de estratégias em saúde pública, com a finalidade de prevenir a morbidade e mortalidade associada a essa enfermidade.

Palavras chaves: Neurotoxoplasmose, HIV, Reação em Cadeia da Polimerase, Reação de Imunofluorescência Indireta.

ABSTRACT

GAVA, M.Z.E. ***Toxoplasma Gondii* Infection in People Living with HIV/AIDS: Seroreactivity and Clinical Profile.** 2022. 64 f. Dissertation (Master's in Tropical Diseases) - Botucatu School of Medicine, São Paulo State University "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu Campus, 2022.

Toxoplasmosis has the opportunity to increase the birth rate of people living with HIV/PLHA. Given the importance, it became necessary to survey epidemiological data related to *T. gondii* infection, mainly in relation to the impact on public health. The present study aimed to evaluate the prevalence of exposure and presence of active disease by *T. gondii* in PLWHA, treated at the Infectious Diseases Service of Hospital das Clínicas (HC-FMBUnesptórios) and Specialized Infectology Outpatient Service "Domingos Alves Meira" (SAEI DAM medical-hospital unit of the Faculty of Medicine of Bot, in the period of March 202020202. Service of Infectious Diseases Hospital das Clínicas, where the two historical symptoms of inclusion were categorized into two groups, namely: Symptomatic Group 01 (NTX) and Group 02 Control and semtology for NTX. Serum samples were collected, which were later sent to the Zoonoses Laboratory (FMVZ-UNESP), for the Indirect Immunofluorescence (IRFI) test. Chemiluminescence was performed at the Hospital's Serology and Endocrinology Laboratory das Clínicas (HC-FMB-Unesp) The Conventional Polymerase Chain Reaction was performed at the Laboratory of Molecular Biology Applied to Zoo noses (FMVZ-UNESP). Of the 10 patients, three (30%) were not tested for anti-*T. gondii*, both in IFAT and in chemiluminescence. Additionally, 7 (70%) patients in both groups (1 and 2) had IgG and IgM anti-*T. gondii* in the first collection in both serological techniques, and six (60%) were seroreactive in both techniques at the time of the second collection. At the time of collection, 3 (30%) reacted to both tests, and remained seroreactive for both serological tests in the fourth collection. In the search for IgG anti-*T.gondii* by the IFAT, the prevalent titer was 4096 (50%), followed by 1024 (30%), and 64 (20%), and while for IgM anti-*T.gondii* it was 1024 (50%), followed by 4096 (20%), 64 (10%) and 256 (10%). And in the search for IgG anti-*T.gondii* by chemiluminescence, the titer was ≥ 3.0 (40%), followed by 2.90 (30%), 1.60 (10%), 1.50 (100%) % and 1 (10%). And for anti-*T.gondii* IgM it was 0.60 (20%), followed by 70 (10%), 80 (10%) and 90 (10%). Conventional polymerases, all of them conventional polymerases. The implementation of this metamorphosis study to determine the clinical profile of PLWHA can contribute to the implementation of strategies in public health, in order to prevent morbidity associated with this disease.

Keywords: Neurotoxoplasmosis, HIV, Polymerase Chain Reaction, Indirect Immunofluorescence Reaction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) reagente.....	28
Figura 2- Equipamento ARCHITECT i2000SR®.....	30
Figura 3- Reagentes, diluentes e conjugados utilizados realização de sorologia para toxoplasmose ARCHITECT i2000SR®.....	31
Figura 4- Resultado Reação em Cadeia da Polimerase da 1º coleta, de todos os pacientes do grupo 1 e 2.....	32
Figura 5- Resultado Reação em Cadeia da Polimerase da 1º coleta, de todos os pacientes do grupo 1 e 2.....	33
Figura 6- Resultado Reação em Cadeia da Polimerase da 1º coleta, de todos os pacientes do grupo 1 e 2.....	34
Figura 7- Resultado Reação em Cadeia da Polimerase da 1º coleta, de todos os pacientes do grupo 1 e 2.....	36
Figura 8- Folder informativo utilizado na atividade de Educação em Saúde sobre Infecção pelo <i>T.gondii</i> em PVHA.....	37
Figura 9- Paciente participante do projeto de pesquisa, durante a realização da atividade de Educação em Saúde.....	38
Figura 10- Boxsplot da distribuição de CD4 inicial para os grupos sintomático (1) e controle (2).....	46
Figura 11- Curva sorológica de anticorpos IgG anti- <i>T.gondii</i> pela Reação de Imunofluorescência Indireta para o grupo sintomático (1) e controle (2).....	48

Figura 12- Curva sorológica de anticorpos IgM anti-*T.gondii* pela Reação de Imunofluorescência Indireta para o grupo sintomático (1) e controle (2).....48

Figura 13- Curva sorológica de anticorpos IgG anti-*T.gondii* pela Quimiluminescência para o grupo sintomático (1) e controle (2).....49

Figura 14- Curva sorológica de anticorpos IgM anti-*T.gondii* pela Quimiluminescência para o grupo sintomático (1) e controle (2).....49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Analise descritiva das variáveis avaliadas, para grupo sintomático (1) e comparação de médias para variáveis contínuas.....	40
Tabela 2. Analise descritiva das variáveis avaliadas para o do grupo controle (2) e comparação de médias para variáveis contínuas.....	41

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana/ Imunodeficiência Adquirida (Aids) .	18
2.2 Neurotoxoplasmose em Pessoas Vivendo com HIV/Aids.....	21
3 JUSTIFICATIVA.....	24
4 OBJETIVOS.....	24
4.1 Objetivo Geral.....	24
4.2 Objetivos específicos.....	25
5 METODOLOGIA	25
5.1 Local do Estudo.....	25
5.2 Delineamento do Projeto e Inclusão de Pacientes	25
6 EXAMES LABORATORIAIS	27
6.1 Coleta das Amostras	27
6.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI):	27
6.3 Imunoensaio Quimioluminescente de Micropartículas (CMIA):	31
6.4 Extração de DNA.....	34
6.5 Reação em Cadeia da Polimerase Convencional:.....	34
7 ATIVIDADE EDUCAÇÃO EM SAÚDE	39
8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	45
9 ASPECTOS ÉTICOS	45
10 RESULTADOS.....	45
11 DISCUSSÃO	52
12 CONCLUSÕES	56
13 REFERÊNCIAS.....	56
14 ANEXOS	61
14.1 Parecer Consubstanciado do CEP.....	61
14.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	66

1 INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma zoonose causada pelo *Toxoplasma gondii* (*T.gondii*), protozoário intracelular obrigatório, de ciclo de vida facultativamente heteróxico. É uma das enfermidades mais comuns existentes, e afeta todos os animais homeotérmicos, incluindo humanos. A infecção aguda por *T.gondii* é geralmente subclínica na maioria dos indivíduos imunocompetentes, e raramente está associada a manifestações clínicas graves. Entretanto, a neurotoxoplasmose (NTX) é causada quase que exclusivamente pela reativação de cistos cerebrais latentes e pode causar consequências graves em pacientes imunossuprimidos, especialmente em Pessoas Vivendo com HIV/Aids (PVHA) (KODYM, et. al., 2015; DUNAY, et al., 2018; VIDAL, 2019).

Considerada uma das principais infecções oportunistas do Sistema Nervoso Central (SNC) em indivíduos com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Aids), sendo responsável por 50% a 70% de todas as lesões cerebrais focais ou disseminadas, podendo levar ao déficit neurológico, coma e morte. A encefalite por *T. gondii* geralmente manifesta-se nos estágios finais da AIDS, quando as contagens de CD4 estão abaixo de 200 células/mm³, e os pacientes com contagens de CD4 abaixo de 50 células / mm³ apresentam maior risco (CDC, 2018; FARD, et al., 2020).

As manifestações clínicas variam de acordo com a topografia e quantidade de lesões cerebrais, bem como com a presença de hipertensão intracraniana. Sendo assim, pacientes com NTX apresentam cefaleia e evolução insidiosa de sinais focais, geralmente dias ou semanas, tais como, febre, convulsões e alteração do estado mental. Sinais focais como hemiparesia, disfasia e outras alterações motoras são comuns, uma vez que as lesões envolvem tipicamente gânglios da base (BRASIL, 2013).

Embora o diagnóstico definitivo da NTX envolva a detecção do agente tecidual em biópsia cerebral, esta fica restrita aos casos que não apresentaram melhora clínica com tratamento empírico, ou melhora em exame de imagem, como por exemplo, a tomografia computadorizada (TC) ou a ressonância nuclear magnética (RNM). Recomenda-se, portanto, que todas as PVHA que apresentem sinais clínicos compatíveis, sorologia reagente e exame de imagem sugestivo de NTX sejam tratadas empiricamente para essa infecção (BRASIL, 2013; FARD, et al., 2020).

A TC de crânio com e sem contraste endovenoso é o exame de imagem preferencial para o diagnóstico de NTX, em razão da sua maior disponibilidade na prática clínica. Entretanto, a RNM é mais sensível para identificar lesões, especialmente quando localizadas em fossa posterior. Sua utilização para diagnóstico de NTX é reservada para casos que apresentem manifestações clínicas de lesões focais, porém com TC de crânio normal. Sendo assim, o diagnóstico de NTX é um desafio na prática clínica (BRASIL, 2016; VIDAL, 2019).

2. REVISÃO DE LITERATURA

T. gondii pertence ao filo *Apicomplexa*, classe *Sporozoa*, subclasse *Coccidia*, família *Sarcocystidae*, gênero *Toxoplasma*. Pode parasitar qualquer célula nucleada, contudo, apresenta predileção por macrófagos e monócitos. Apresenta morfologia em forma de arco, como uma meia-lua (OLIVEIRA, 2016; SILVA; SILVA, 2016). Evidências epidemiológicas mostram que um terço da população mundial esteve em contato com o parasita (SHEN, et al., 2016).

Em seu ciclo de vida são identificados dois hospedeiros: os felídeos, que são os hospedeiros definitivos, que apresentam papel epidemiológico de extrema importância, e os humanos, demais mamíferos e aves, que são hospedeiros intermediários. Seu ciclo inclui a fase sexuada do parasita, que ocorre no trato gastrointestinal dos felídeos, e a fase assexuada, nos hospedeiros intermediários. A fase sexuada origina oocistos infectantes, enquanto a assexuada produz taquizoítos (fase proliferativa) e, eventualmente, bradizoítos (forma latente) (FONTOURA, et al., 2016).

Há três diferentes fases infecciosas no ciclo de vida do parasita, sendo elas: taquizoítos, que são encontrados em células nervosas, musculares, pulmonares, hepáticas e sistema fagocítico mononuclear, além de líquidos e excreções. Os bradizoítos são encontrados durante a fase crônica da infecção dentro do vacúolo citoplasmático da célula, cuja membrana configura uma capsula do cisto tecidual. Os cistos teciduais são localizados predominantemente no sistema nervoso central (SNC). Esporozoítos são encontrados dentro dos oocistos esporulados, que são a forma de resistência e de disseminação do parasita para humanos, aves, animais domésticos e selvagens. Os oocistos são produzidos nas células intestinais de

felídeos não imunes e eliminados imaturos junto com as fezes. (FOROUTAN-RAD, et al., 2016; SILVA; SILVA, 2016).

Toxoplasma gondii, induz uma resposta imune consistente e duradoura que busca o controle da proliferação dos taquizoítos. A resposta imune inata, representada por macrófagos, células “natural killer” (NK) e células polimorfonucleares atuam na primeira linha de defesa do organismo. A imunidade celular, mediada pelos linfócitos T, atua como mecanismo de defesa contra micro-organismos que sobrevivem dentro de fagócitos ou células não-fagocíticas infectadas, onde estão protegidas da ação de anticorpos. Por ser um parasita intracelular obrigatório, a imunidade adquirida humoral mediada por células é a principal defesa do hospedeiro contra a infecção pelo *T. gondii*. Dessa maneira, a infecção estimula também a produção de anticorpos IgG, IgM, IgA e IgE que, além de serem utilizados para o diagnóstico da infecção pelo parasita, parecem contribuir na primeira barreira de defesa (CORDEIRO, et al., 2010).

A infecção é adquirida principalmente pela ingestão de carne suína e ovina crua ou mal cozida, contendo cistos teciduais, ou pela ingestão de alimentos e água contaminados, manipulação de carne crua, ingestão de leite cru, jardinagem sem uso de luvas, exposição ao solo contaminado, contato com fezes de felídeos contaminadas, e infecção vertical. O curso da infecção primária é geralmente subclínico. A grande maioria da população humana infectada permanece assintomática e alguns pacientes apresentam sintomas leves. No entanto, a infecção pode causar morbidade e mortalidade significativas. A reativação da infecção latente ocorre em pacientes imunocomprometidos, causando doença fatal, especialmente encefalite (COLOMBO, et al., 2010; OLIVEIRA, 2016).

O diagnóstico da infecção aguda ou da exposição previa, pode ser estabelecido por exames sorológicos, uma vez que a produção de anticorpos pelo organismo infectado é intensa e precoce, e estão disponíveis testes de boa sensibilidade e especificidade. Diversas provas sorológicas têm sido preconizadas para o diagnóstico da toxoplasmose, sendo elas: Reação de Sabin-Feldman (SF), reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio imunoenzimático (ELISA), método de aglutinação direta modificada (MAT), reação de fixação de complemento (FC) e reação de hemaglutinação indireta (HI) (SILVA; SILVA, 2016). Modernamente podem ser utilizados os testes de quimioluminescência de alta sensibilidade, que detecta anticorpos anti-*T. gondii* por meio de imunoglobulinas anti-IgG ou anti-IgM marcadas com composto luminescente (MARQUES, et al., 2015).

Na toxoplasmose aguda em pacientes imunocompetentes o diagnóstico é realizado pela detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii*, sendo que nesses pacientes a manifestação clínica predominante é da Síndrome da Mononucleose Infecciosa símile (Mono-like), caracterizada por adenomegalia generalizada de caráter agudo ou subagudo, febre, faringite e rash cutâneo (TAMEGA, et al., 2016).

Atualmente, a principal população vulnerável à reativação da infecção latente pelo *Toxoplasma gondii* são as pessoas vivendo com HIV/Aids (PVHA), pelo risco de imunossupressão celular causada pela enfermidade. Nessa população a maior parte dos pacientes que recidiva apresenta-se sororreagente a anticorpos da classe IgG anti-*T. gondii*, sendo assim na suspeita clínica de reativação da doença é necessário a investigação sorológica (ANARADHA; PREETHI, 2014).

O tratamento recomendado pelo Ministério da Saúde (2019) é a associação de antimicrobianos, sendo a primeira opção a sulfadiazina e pirimetamina ou alternativamente sulfametoxazol + trimetoprima. No caso de gestantes, usa-se espiramicina ou clindamicina, e na forma ocular da doença, e utiliza-se prednisolona em associação aos antimicrobianos para reduzir a necrose e a inflamação.

2.1 Infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana/ Imunodeficiência Adquirida (Aids)

Os primeiros relatos da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Aids) foram publicados em meados de 1981 na Califórnia-Estados Unidos, quando foram notificados ao Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) pacientes adultos do sexo masculino, homossexuais que apresentavam sarcoma de Kaposi, pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* e comprometimento do sistema imune, o que levou à conclusão de que se tratava de uma nova doença, ainda não classificada, de etiologia provavelmente infecciosa e transmissível (GOTTLIEB, et al., 1981; COCK, et al., 2012).

Em 1983, o agente etiológico da imunodeficiência humana (HIV) foi identificado como uma partícula esférica, de 100 a 120 nm de diâmetro, pertencente ao gênero *Lentivirinae* e família *Retroviridae*, apresentando em seu núcleo duas cópias de RNA de cadeia simples, encapsuladas por uma camada proteica ou núcleo-capsídeo, capsídeo e um envelope externo composto por uma bicamada fosfolipídica. O genoma do HIV inclui três principais genes que codificam as proteínas estruturais e enzimas

virais: *gag*, *env* e *pol* (GALLO, et al., 1984; BRASIL, 2016; RACHID; SCHECHTER, 2017).

A maioria das infecções pelo HIV-1 ocorre a partir das mucosas do trato genital ou retal durante a relação sexual. Nas primeiras horas após a infecção pela via sexual, o HIV e células infectadas atravessam a barreira da mucosa, permitindo que o vírus se estabeleça no local de entrada e continue infectando linfócitos T CD4+, além de macrófagos e células dendríticas. Após a transmissão do vírus, há um período de aproximadamente 10 dias, denominado de fase eclipse, antes que o RNA viral seja detectável no plasma (BRASIL, 2016).

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde - OMS (2020) até fim de 2019 haviam 37,9 milhões de pessoas vivendo com o HIV em todo o mundo. Além disto, verificou-se 1,7 milhões de novas infecções até o fim de 2018 (Unaid, 2020). Já em relação ao impacto mundial das doenças oportunistas nessas pessoas por ela acometidas, elas foram responsáveis por um total de 32 milhões de mortes desde o início da epidemia, até o fim do ano de 2018 (MELO, et al., 2020). No Brasil, acomete cerca de 966.058 pessoas, sendo que só no ano de 2018 foram diagnosticados 43.941 novos casos da doença (BRASIL, 2019).

Pessoas com infecção pelo HIV sem tratamento podem apresentar um estado de imunodeficiência progressiva que propicia o acometimento por doenças oportunistas indicadoras da Aids. A duração dessa latência é variável, porém, em média, varia entre 8 a 12 anos (BRASIL, 2019; MELO, et al., 2020).

No que diz respeito ao acometimento clínico pela imunossupressão celular, o Sistema Nervoso Central é o segundo local com maior número de manifestações clínicas, atrás apenas do sistema respiratório. Assim é que cerca de 46 % dos pacientes internados com HIV podem apresentar doença neurológica de diferentes etiologias (CHRISTO, 2010). O aspecto epidemiológico das infecções neurológicas no SNC, bem como o das demais afecções oportunistas, está diretamente relacionado com a contagem de linfócitos TCD4 (TAN, et al., 2012).

O HIV desencadeia uma grave disfunção do sistema imunológico, à medida que vão sendo destruídos os linfócitos T CD4+, uma das principais células alvo do vírus. A contagem de linfócitos T CD4+ é um importante marcador dessa imunodeficiência, sendo utilizada tanto para estimar o prognóstico e avaliar a indicação de início de terapia antirretroviral (BRASIL, 2019).

As principais formas de transmissão do HIV são: sexual, transfusão sanguínea ou hemoderivados, usuários de drogas injetáveis, e vertical. Além dessas formas, também pode ocorrer à transmissão ocupacional, ocasionada por acidente de trabalho, em profissionais da área da saúde que sofrem ferimentos com instrumentos pérfuro cortantes contaminados com sangue de PVHA (BRASIL, 2019).

A infecção pelo HIV pode ser diagnosticada por meio da detecção direta de componentes do vírus, como o antígeno p24 ou com testes moleculares que detectam RNA ou DNA pró-viral. A detecção do antígeno p24 do HIV-1, de RNA ou DNA desempenha um papel importante quando a detecção de anticorpos não é possível. São especialmente úteis para o diagnóstico em crianças com idade inferior a 18 meses e na infecção aguda em adultos. É importante ressaltar que a maioria das pessoas com infecção aguda apresenta carga viral elevada e, conseqüentemente, maior risco de transmitir a infecção aos seus parceiros. (BRASIL, 2016).

O diagnóstico sorológico do HIV é amplamente utilizado, pois observa-se que quase a totalidade dos indivíduos infectados desenvolvem anticorpos de seis a doze semanas após a exposição ao vírus. Os testes sorológicos rotineiramente utilizados são: ensaios imunoenzimáticos (ELISA), Western blot, Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e de quimioluminescência. O diagnóstico também pode ser realizado por exames moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (RACHID; SCHECHTER, 2017).

O tratamento atual do HIV é a terapia antirretroviral (TARV), que com o passar dos anos vem obtendo cada vez mais eficácia em termos de supressão virológica sustentada, com a carga viral do HIV consistentemente indetectável, existe na maioria dos pacientes um aumento linear de recuperação imunológica, com a estimulação de desenvolvimento e proliferação de linfócitos T CD4+, com isso, observa-se uma redução importante na incidência de doenças oportunistas concomitantes ao HIV. Devido a esse fato, pode-se considerar que hoje em dia, que uma PVHA com carga viral indetectável, tem uma expectativa de vida muito semelhante a uma pessoa sem essa enfermidade, entretanto, caso o paciente não tenha uma adesão adequada a TARV a resistência pode levar a uma falha na resposta virológica e conseqüentemente a uma falha na recuperação da resposta imunológica, promovendo a recidiva de infecções oportunistas, como a neurotoxoplasmose (LUNDGREN, et al., 2015).

2.2 Neurotoxoplasmose em Pessoas Vivendo com HIV/Aids

A neurotoxoplasmose (NTX) é uma das principais doenças oportunistas em PVHA, cujo CD4 está menor que 200 céls /mm³, principalmente nos pacientes sem o uso da TARV e sem a quimioprofilaxia adequada. A doença promove lesões cerebrais focais com efeito de massa no sistema nervoso central (SNC), tendo como lesão predominante a encefalite necrosante multifocal. Consequentemente acarretando uma variedade de sequelas capazes de comprometer a realização das atividades cotidianas (ARAUJO, et al., 2019; VIDAL, 2019).

Os primeiros relatos de neurotoxoplasmose foram descritos no início da epidemia de Aids entre 1982 e 1983. À medida que o número de PVHA aumentou, ela tornou-se uma das infecções oportunistas mais frequentes e a causa mais comum de lesões cerebrais focais nesta população (VIDAL, 2019).

A prevalência e a taxa de infecção por *T.gondii* em PVHA mostra variabilidade geográfica e geralmente segue a prevalência do *T. gondii* na população em geral. A prevalência de coinfeção em países em desenvolvimento e países desenvolvidos varia entre de 55% e 26%, respectivamente. Existem focos de alta prevalência na América Latina, partes da Europa Oriental / Central, Oriente Médio, partes do Sudeste Asiático e África. Atualmente, NTX relacionada ao HIV continua a ser a causa mais comum de lesão cerebral focal, e uma importante causa de morbidade e mortalidade em PVHA em vários países em desenvolvimento (AYOADE; CHANDRANESAN, 2021).

A disponibilidade do TARV reduziu significativamente a incidência de toxoplasmose cerebral em PVHA em países de alta e média renda. No Brasil, onde a prevalência de HIV na população em geral era de 0,4% em 2014, houve uma queda acentuada nas taxas de incidência de toxoplasmose cerebral (43,6/1000 pessoas-ano). Entretanto, as taxas de incidência de toxoplasmose cerebral observadas no Brasil são superiores às observadas em outros estudos, tanto de outros países de renda média como alta, que pode ser relacionadas ao diagnóstico tardio de HIV, não adesão à TARV, falha na retenção no atendimento e resistência aos medicamentos antirretrovirais (AYOADE; CHANDRANESAN, 2021).

A disseminação e persistência do parasita estão intimamente ligadas a uma resposta imune subsequente, que não apenas limita o dano induzido pelo parasita, mas também pode facilitar a disseminação e induzir imunopatologia associada ao parasita (SCHLUTER; BARRAGAN, 2019).

Após a ingestão das formas infectantes, o *T. gondii* invade o epitélio intestinal e posteriormente se dissemina por todo o corpo, principalmente para o SNC. As manifestações clínicas em PVHA são devido a reativação da infecção latente à medida que ocorre a imunossupressão. A toxoplasmose primária costuma ser subclínica, mas raramente pode se manifestar sintomaticamente em uma pessoa imunocomprometida que foi recentemente exposta às formas infecciosas (AYOADE; CHANDRANESAN, 2021; SCHLUTER; BARRAGAN, 2019).

Os distúrbios neurológicos em PVHA podem estar ligados a vários fatores, tendo em vista que o próprio parasita é capaz de danificar o tecido cerebral. O tempo para o envolvimento do cérebro depende do sistema imunológico, e outros fatores sociais, como por exemplo, dependência de drogas e abuso de álcool. O *T. gondii* também pode se disseminar causando danos não apenas ao cérebro, mas também aos pulmões, olhos, nódulos linfáticos e ao trato gastrointestinal (AZOVTSEVA, et al., 2020).

As manifestações clínicas da doença dependem principalmente da topografia e do número de lesões. Os sinais e sintomas mais comuns são dor de cabeça (38% - 93%), déficit neurológico focal (22% - 80%), febre (35% - 88%), confusão mental (15% - 52%), convulsões (19% - 58%), alterações psicomotoras ou comportamentais (37% - 42%), paralisia dos nervos cranianos (12% - 28%), ataxia (2% - 30%) e anormalidades visuais (8% - 19%). Os pacientes também podem apresentar síndrome de hipertensão intracraniana e movimentos involuntários (AZOVTSEVA, et al., 2020; AUN, 2019).

Também se verifica nesses pacientes, alterações sensório motoras e comprometimento do equilíbrio postural que prejudicam a deambulação. A perda da função física após longo período de internação hospitalar tem sido relatada na literatura, principalmente quando há desordens neurológicas associadas (ARAUJO, 2019).

Não existem testes laboratoriais específicos para o diagnóstico na rotina clínica para a NTX., por conta disso o diagnóstico presuntivo é o padrão ouro, o manejo clínico desses pacientes devendo ser realizado da seguinte forma: Inicialmente pela confirmação da infecção pelo HIV, quadro clínico compatível, tomografia computadorizada com lesões sugestivas, de forma auxiliar, o diagnóstico presuntivo também pode levar em consideração a contagem de CD4 inferior a 200 cels/mm³, anticorpo IgG anti-*T. gondii* reagente nos exames sorológicos para toxoplasmose. Geralmente os anticorpos IgM anti-*T. gondii* estão ausentes, exceto raramente em

casos de infecção primária. A ausência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* torna o diagnóstico de toxoplasmose improvável, mas não impossível. O diagnóstico por imagem, seja por Tomografia Computadorizada (TC), ou pela ressonância magnética que demonstrem achados compatíveis a doença, são úteis e recomendados (AYOADE; CHANDRANESAN, 2021; CDC, 2021).

O diagnóstico definitivo pode ser realizado por biópsia cerebral, mas devido a ser uma técnica invasiva, o diagnóstico presuntivo é utilizado na maioria dos casos na prática clínica (CDC, 2021). A punção lombar pode auxiliar no diagnóstico, com análise do líquido cefalorraquidiano (LCR), que frequentemente mostra pleocitose mononuclear, proteína elevada e, às vezes, glicose no LCR reduzida. O teste de reação em cadeia da polimerase (PCR) para *T. gondii* no LCR é 100% específico, mas apenas 44% a 65% sensível. Isso sugere que um resultado positivo da PCR do LCR estabelece o diagnóstico de toxoplasmose cerebral, mas um resultado negativo não descarta a enfermidade. Entretanto, nem sempre será possível realizar a punção do LCR na fase aguda da doença, pela existência de lesões expansivas e sinais de hipertensão intracraniana (CDC, 2019).

A demonstração do agente etiológico não é realizada na rotina, visto que o parasito se desenvolve somente em culturas celulares, e os métodos sorológicos são de difícil interpretação, por se tratar de reativação de infecção em indivíduo imunossuprimido, tendo valor limitado, pois a positividade não torna o diagnóstico mais provável. Além disso, a biópsia cerebral, para demonstração histológica do parasita, é um procedimento invasivo e pouco disponível na prática clínica. Com isso, alguns critérios clínicos, laboratoriais e radiológicos são utilizados para definição do diagnóstico (ARAÚJO, et al., 2019; VIDAL, 2019; AUNG, 2019).

Os principais diagnósticos diferenciais da toxoplasmose cerebral, são o linfoma primário do SNC (não-Hodgkin), leucoencefalopatia multifocal progressiva (LEMP) e demência associada à aids, tuberculose, doença de Chagas, criptococose, histoplasmose, coccidioidomicose, aspergilose, herpes e cisticercose (ARAÚJO, et al., 2019; VIDAL, 2019; AUNG, 2019).

O tratamento da neurotoxoplasmose em PVHA, consiste em: terapia antiparasitária e TARV. A pirimetamina e a sulfadiazina são mais comumente empregadas como primeira opção no tratamento, bloqueando sinergicamente e sequencialmente o metabolismo do ácido fólico, que é necessário para o desenvolvimento do parasita. O ácido folínico é frequentemente adicionado, e o

tratamento inicial dura normalmente seis semanas. Alternativamente pode ser utilizada a associação de trimetoprim-sulfametoxazol (AYOADE; CHANDRANESAN, 2021).

3 JUSTIFICATIVA

A toxoplasmose é uma das principais infecções oportunistas que afetam as PVHA, levando a altas taxas de morbidade e mortalidade. Diante da importância da toxoplasmose, torna-se imprescindível o levantamento de dados epidemiológicos e perfil clínico referentes à infecção pelo *T. gondii*, principalmente, em relação ao impacto para saúde pública.

Em estudo realizado por Oliveira (2016), observou-se alta prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em PVHA. Sendo assim, é de suma importância a determinação sorológica quanto à toxoplasmose em PVHA, para que seja determinada a população em risco para o desenvolvimento de neurotoxoplasmose, uma vez que mais de 95% dos casos ocorrem devido à reativação da infecção latente.

Sabe-se que a neurotoxoplasmose consiste em lesão cerebral focal, forma predominante em PVHA no Brasil, tornando-se pertinente a avaliação deste aspecto clínico no presente estudo, já que o diagnóstico e tratamento eficazes podem proporcionar redução de morbidade e de sequelas neurológicas.

Deste modo, considerando que dados referentes a esta abordagem são escassos na região de Botucatu, São Paulo, a realização deste estudo tornou-se relevante, para determinação do perfil clínico da neurotoxoplasmose em PVHA, podendo contribuir na implementação de estratégias em saúde pública, com a finalidade de prevenir a morbimortalidade associada a essa enfermidade.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo foi avaliar, prospectivamente, a prevalência de exposição e a presença de doença ativa por *Toxoplasma gondii* em PVHA, atendidos no Serviço de Infectologia do Hospital das Clínicas (HC-FMBUnesp) e Serviço de Ambulatórios Especializados de Infectologia “Domingos Alves Meira” (SAEI-DAM),

unidade do complexo médico-hospitalar da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB-Unesp), no período entre março de 2020 a janeiro de 2022.

4.2 Objetivos específicos

- Determinação da presença de anticorpos das classes IgG e IgM anti-*T. gondii* em amostras de soro de PVHA pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Imunoensaio Quimioluminescente de Micropartículas;
- Detecção de *Toxoplasma gondii* em amostras de sangue e líquido cefalorraquidiano (quando possível) pela Reação em Cadeia da Polimerase Convencional (PCR);
- Caracterização do perfil clínico dos pacientes, e sua relação com a sorologia para *T. gondii*, e investigar diagnóstico prévio para neurotoxoplasmose;
- Comparação entre os resultados da análise do sangue pelos três métodos: RIFI, Imunoensaio Quimioluminescente de Micropartículas e PCR, correlacionando-os com o perfil clínico e diagnóstico por imagem (TC).
- Realização de Atividade de Educação em Saúde, com a criação de folder informativo para os pacientes, contendo orientações sobre a profilaxia e controle da toxoplasmose, importância da adesão ao tratamento com terapia antirretroviral, visando promover conhecimento sobre os fatores de risco da doença, profilaxia e controle.

5 METODOLOGIA

5.1 Local do Estudo

O estudo foi realizado no Serviço de Infectologia do Hospital das Clínicas (HC-FMBUnesp) e Serviço de Ambulatórios Especializados de Infectologia “Domingos Alves Meira” (SAEI-DAM), unidade do Complexo médico-hospitalar da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB-Unesp), considerado centro de referência estadual para atendimento de PVHA e pesquisas relacionadas ao tema.

5.2 Delineamento do Projeto e Inclusão de Pacientes

Foi realizado um estudo de coorte prospectivo com amostragem de conveniência, baseando-se no fluxo histórico do Serviço de Infectologia do Hospital

das Clínicas (HC-FMB-Unesp), onde os critérios de inclusão foram categorizados em dois grupos:

- Grupo sintomático (1): PVHA internados/hospitalizados com diagnóstico recente (entre 24 horas e 72 horas) de reativação de infecção latente por *T. gondii*, com diagnóstico presuntivo para neurotoxoplasmose, provenientes do Serviço de Infectologia do HC-FMB-Unesp, com um número de 07 pacientes.

- Grupo controle (2): Pacientes com diagnóstico recente para HIV/AIDS, diagnosticados no período de 30 dias, sem sintomatologia de infecção latente e recente por *T. gondii*, provenientes do Serviço de Ambulatórios Especializados de Infectologia “Domingos Alves Meira” (SAEI-DAM), seguindo os seguintes critérios: $CD4+ \leq 200$ cels/mm³, sem tratamento com terapia antirretroviral, e sem sintomatologia neurológica, com número de 06 pacientes.

- Foram utilizados os seguintes critérios de exclusão de pacientes: indivíduos menores de 18 anos, gestantes e aqueles que não concordassem em assinar o termo de consentimento livre esclarecido. Os critérios de inclusão foram caracterizados da seguinte maneira: PVHA, $CD4+ \leq 200$ cels/mm³, indivíduos maiores de 18 anos provenientes do Serviço de Ambulatórios Especializados de Infectologia “Domingos Alves Meira” (SAEI-DAM) e/ou Serviço de Infectologia do HC-FMB-Unesp, e aqueles que concordassem em participar da pesquisa e assinar o termo de consentimento livre esclarecido.

Os pacientes foram acompanhados e avaliados prospectivamente no início do tratamento para neurotoxoplasmose e diagnóstico de HIV, após retorno em 60 dias, 6 meses e, posteriormente, após 1 ano do início do tratamento com TARV, no período entre março de 2020 a janeiro de 2022.

O diagnóstico de neurotoxoplasmose na prática clínica foi realizado por achados médicos compatíveis com a doença, achados nos exames de imagem, como por exemplo, lesões de efeito de massa, causando convulsão, hemiplegias, desvio de rima, confusão mental e coma, sendo que esse algoritmo foi realizado na rotina do Hospital das Clínicas (HC-FMB-Unesp).

Desta maneira, foi realizado de forma prospectiva a coleta na base de dados do Serviço de Ambulatórios Especializados de Infectologia “Domingos Alves Meira” (SAEI-DAM) e Serviço de Infectologia do HC-FMB-Unesp, das seguintes variáveis clínicas: sexo, idade, município de procedência, data do diagnóstico do HIV, data do diagnóstico de neurotoxoplasmose (NTX), uso de TARV no momento do diagnóstico

de NTX, uso de profilaxia para NTX, 1º episódio de NTX, CD4 inicial do paciente, data do CD4 inicial, CD4 no momento do diagnóstico de NTX, data do CD4 no momento de NTX, além de carga viral inicial do paciente, data da carga viral, carga viral no momento da NTX, manifestações clínicas da NTX, achados de TC de NTX, resultados de PCR no sangue, resultados da sorologia para NTX, tratamento de NTX e desfecho clínico.

6 EXAMES LABORATORIAIS

6.1 Coleta das Amostras

Amostras de sangue foram coletadas por meio de punção venosa, utilizando um tubo coletor (*vacutainer*®), onde foram coletados 4 mL de sangue (2 mL em tubos com EDTA para obtenção de sangue total e 2 mL em tubos secos para obtenção de soro). A coleta de líquido cefalorraquidiano foi realizada pela técnica de punção lombar, utilizando tubo coletor de líquor. Posteriormente a coleta, as amostras de sangue e soro foram encaminhadas ao Laboratório de Diagnóstico de Zoonoses do Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Câmpus de Botucatu, onde foram centrifugadas a 3000g durante 10 minutos para obtenção do soro. Após centrifugação, as mesmas foram alíquotadas em microtubos e estocadas a -18°C até a realização dos exames sorológicos. As amostras de sangue total foram imediatamente armazenadas em gelo em caixas isotérmicas (4°C a 8°C), e posteriormente, foram encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular Aplicada a Zoonoses (FMVZ-UNESP). Em seguida, foram alíquotadas em microtubos e estocadas em freezer -80°C para evitar degradação do material genético, até a realização da extração do DNA e provas moleculares.

6.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI):

Cepa de *Toxoplasma gondii*: Foi utilizada a cepa RH, genótipo tipo I, isolada por Sabin em 1939 de uma criança nos Estados Unidos (SABIN, 1941), para a produção de antígeno para as provas sorológicas, e como controle na prova de biologia molecular. A cepa RH foi mantida por inoculação intraperitoneal semanal de camundongos Swiss (*Mus musculus*), albinos, com 30 dias de idade, pesando de 30 a 40g. A solução antigênica foi obtida a partir de lavados peritoneais de camundongos

previamente inoculados intraperitonealmente, com 1 mL de suspensão rica em taquizoítos de *Toxoplasma gondii* (DUBEY, 1990). Todos os camundongos utilizados neste projeto foram obtidos no Biotério Central da UNESP.

Produção de antígeno: Foram inoculados 5 camundongos Swiss (*Mus musculus*) albinos, via intraperitoneal, com 1mL das suspensões da cepa RH, previamente selecionadas. Após três dias, os animais foram eutanasiados e foi colhido o exsudato peritoneal, inoculando-se 5 mL de solução fisiológica 0,9% estéril, por animal, e aspirando-se em seguida. Posteriormente, foi realizada leitura microscópica e, àqueles ricos em parasitos foram transferidos para tubo de centrífuga (50 ml), procedendo-se a seguir a centrifugação em diferentes rotações, e em seguida foram acondicionados a 4°C até o processamento, conforme protocolo estabelecido por Silva et.al (2009).

Inativação e sensibilização de lâminas para a reação de imunofluorescência indireta (RIFI): Ao exsudato peritoneal rico em taquizoítos misturou-se igual volume de solução formalina 2%, obtendo-se uma suspensão de exsudato-formol a 1%. Transferiu-se para um tubo de centrífuga e incubou-se em estufa bacteriológica a 37°C por 30 minutos, agitando-a por inversão delicada do tubo, a cada 10 minutos. Em seguida, centrifugou-se a 3000g por 10 minutos, desprezando-se o sobrenadante. Ao pellet, ou sedimento, acrescentou-se 2 a 3 ml de solução salina tamponada de fosfatos (SST), 0,01M, pH 7,2. Posteriormente, homogeneizou-se em vórtex e centrifugou-se novamente a 3000g por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e, ao sedimento, adicionou-se 1 a 2 ml de SST pH 7,2, observando-se a sua concentração em lâmina, de tal forma que a solução contivesse de 30 a 40 taquizoítos por campo, pipetando-se 50 µl em uma lâmina, cobrindo-se com lamínula 24 x 60 mm para proceder a avaliação microscópica dos taquizoítos.

As lâminas, utilizadas na RIFI, foram compostas de duas fileiras de seis poços, fixados previamente com o antígeno, procedendo-se a adição, em cada um dos poços de 10 µl da solução antigênica, aguardando-se 2 a 3 minutos para ocorrer a fixação dos taquizoítos na lâmina. A seguir, retirou-se o excesso por aspiração, restando uma fina película em cada poço. Depois de secas a temperatura ambiente, as lâminas foram estocadas em caixa de madeira ou laminários sendo mantidas sob temperatura de congelamento a -18°C, por período não superior a dois meses.

Reação de imunofluorescência indireta (RIFI): Foi realizada segundo Camargo (1974), utilizando-se conjugado comercial anti-IgG e anti-IgM humano, para

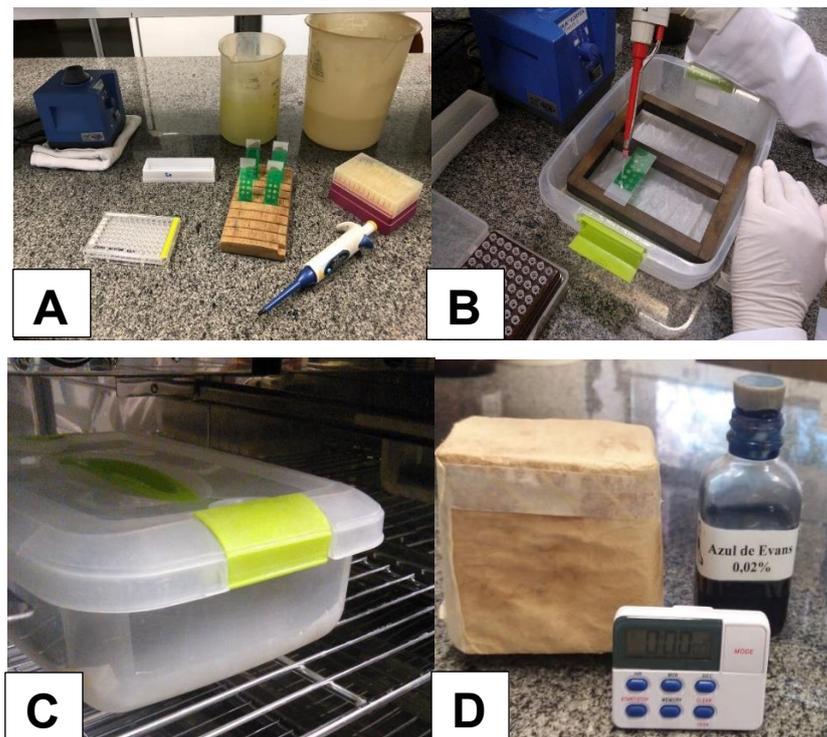
detecção de anticorpos para *T. gondii*. Os soros foram diluídos em PBS pH 7,2, a partir da diluição 1:16, duplicando-se até a obtenção do título final. Em microplaca de poliestireno com 96 orifícios devidamente identificada, pipetou-se 150 microlitros de PBS pH 7,2 nos seus orifícios. Adicionou-se ao primeiro orifício respectivo ao soro teste, 10 µl do mesmo, obtendo-se a diluição 1:16. Após homogeneização, transferiu-se 50 microlitros dessa primeira diluição para o segundo orifício, obtendo-se a diluição 1:64. Foi repetido o procedimento da mesma forma para as demais perfurações obtendo-se diluições em quadruplicada. Após a homogeneização, desprezou-se os 50 microlitros, referentes à última diluição testada. Na mesma microplaca, procedeu-se igualmente para os soros controles positivo e negativo, pipetando-se 10 microlitros de soro sabidamente positivo e 10 µl de soro sabidamente negativo, respectivamente. Na lâmina fixada previamente com o antígeno (taquizoítos), distribuiu-se 10 microlitros de cada diluição do soro em cada orifício, em fileira, ordenados em forma crescente de diluição, pipetando-se inversamente, ou seja, da maior diluição para a menor, protocolando-se o esquema adotado. Da mesma forma procedeu-se com o controle positivo e o negativo.

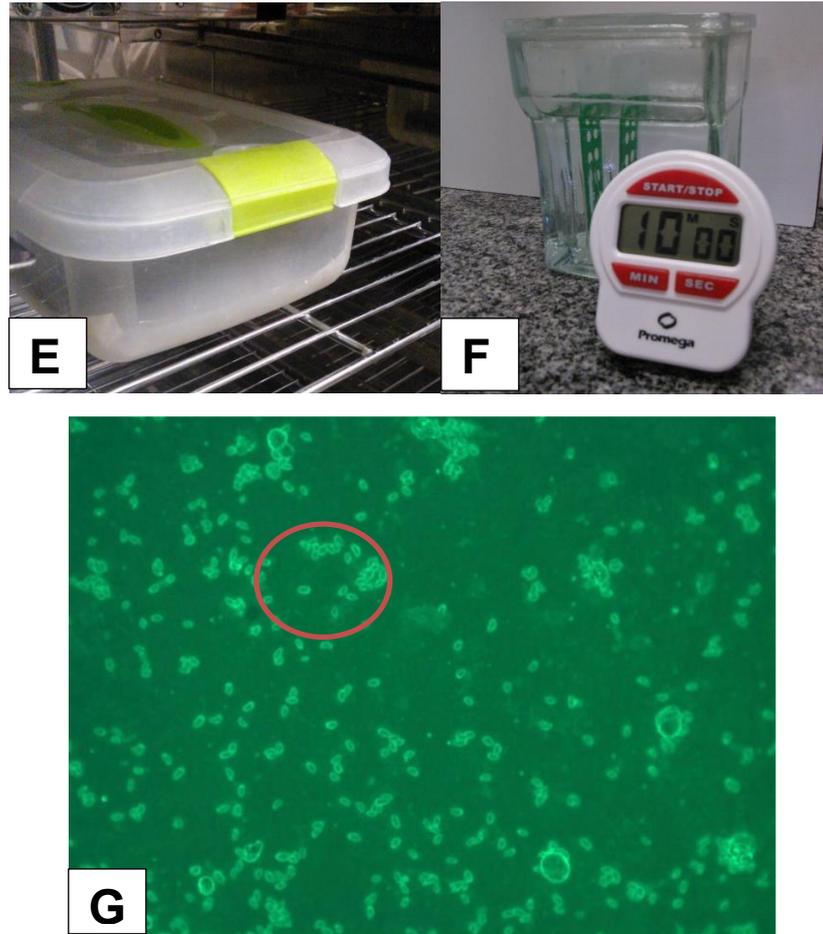
A seguir, realizou-se duas lavagens em PBS pH 7,2 por 10 minutos cada. Inicialmente, deixou-se escorrer a lâmina com a solução, a seguir colocou-se em um coplin contendo a solução de PBS pH7,2, mantendo-se por 10 minutos. Desprezou-se a solução, preenchendo-se novamente com o PBS pH7,2, como anteriormente. Em seguida, acrescentou-se à reação o conjugado, anticorpo anti-IgG e anti-IgM específica para a espécie humana, conjugado com o fluorocromo isotiocianato de fluoresceína. O conjugado foi diluído de acordo com o seu título, previamente estabelecido pelo fabricante (Sigma-Aldrich®), em solução de azul de Evans a 20 mg%, preparada previamente, que no momento de uso foi diluída a 1:5 ou seja 1 ml de azul de Evans, e 4 ml de PBS pH7,2. As lâminas foram então incubadas à 37°C, em câmara úmida por 30 minutos, para a ocorrência da reação antígeno-anticorpo, e a seguir lavadas em PBS pH 7,2 duas vezes durante 10 minutos cada, adotando-se o mesmo procedimento descrito anteriormente. Após a secagem das lâminas em estufa bacteriológica a 37°C, pipetou-se duas gotas de solução glicerinada pH 8,5 sobre a lâmina, cobrindo-se com lamínula.

A leitura foi realizada em microscópio de imunofluorescência (Zeiss®), com objetiva de 40X e ocular de 10X. Após a leitura dos controles, sem discordância com o resultado, procedeu-se à leitura das amostras em teste, considerando-se como

ponto final da reação a maior diluição do soro, em que houve fluorescência completa e intensa na borda de pelo menos 50% dos taquizoítos, sendo este então o título de anticorpos, obtido para cada amostra de soro. Considerando-se como sororreagentes para RIFI o título de corte 64 UI tanto para anticorpos da classe IgG como para IgM, conforme ilustrado na figura 1.

Figura 1- Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI): **a)** Diluição do soro em placa; **b)** Adição do soro diluído da placa para a lâmina sensibilizada com *T. gondii*; **c)** Amostras na estufa bacteriológica em câmara úmida por 30 minutos; **d)** Adição do conjugado espece-específico; **e)** Amostras em estufa bacteriológica em câmara úmida por 30 minutos; **f)** lavagens das lâminas; **g)** Reação de Imunofluorescência Indireta reagente. Leitura em microscópio de imunofluorescência (Zeiss®), com objetiva de 40X e ocular de 10X.





Fonte: Serviço de Diagnóstico de Zoonoses, FMVZ- UNESP, 2022.

6.3 Imunoensaio Quimioluminescente de Micropartículas (CMIA):

Para realização do teste sorológico de Quimioluminescência, as amostras de soro foram processadas no Laboratório de Sorologia e Endocrinologia, Seção Técnica de Laboratórios de Análises Clínicas, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” (UNESP), campus Botucatu, pelo equipamento ARCHITECT® Toxo IgG e IgM. A pesquisa de anticorpos das classes IgG e IgM anti-*Toxoplasma gondii* foi realizada por meio de imunoensaio com reação quimioluminescente culminando na determinação quantitativa para estes anticorpos. O teste foi realizado em duas etapas.

Na primeira etapa, as micropartículas paramagnéticas revestidas com amostra pré-diluída, diluente de ensaio e antígeno *Toxoplasma gondii* recombinante (contendo antígenos recombinantes P30 (SAG1) e P35 (GRA8)) foram combinadas. Deste modo, os anticorpos específicos de *T. gondii* presentes na amostra se ligaram às micropartículas revestidas de antígeno recombinante de *T. gondii*. Posteriormente a

lavagem, o conjugado IgG anti-humano marcado com acridínio murino foi adicionado para criar uma reação na segunda etapa.

Nesta etapa, foi realizado outro ciclo de lavagem. Em seguida, soluções pré-ativadoras e ativadoras foram adicionadas à de reação. A reação quimioluminescente resultante foi medida como unidades de luz relativa (RLUs), que estavam diretamente relacionadas com a quantidade de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* na amostra, sendo as RLUs detectadas por sistema ótico do ARCHITECT, de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante (ABBOTTY, 2009).

A pesquisa de IgM anti-*Toxoplasma gondii* também consistiu em um Imunoensaio com Quimioluminescência de duas etapas, com posterior determinação qualitativa destes anticorpos. Inicialmente, a amostra foi pré-diluída e as micropartículas paramagnéticas revestidas com anti-IgM humana (de camundongos monoclonais) foram recombinadas. Os anticorpos IgM anti-*Toxoplasma gondii* presentes na amostra, ligaram-se às micropartículas revestidas de anticorpos anti-IgM humana (de camundongos monoclonais), formando um complexo anticorpo-anticorpo. A seguir, foi realizada a lavagem.

Posteriormente, o complexo de conjugado composto de um fragmento F(ab')₂ de anticorpo contra antígeno *Toxoplasma gondii* p30 (de camundongo monoclonal) marcado com acridínio murino foi adicionado. Esse complexo de conjugado ligou-se aos anticorpos IgM anti-*Toxoplasma gondii* que foram capturados pelas micropartículas revestidas de anti-IgM humana (de camundongo monoclonal) na primeira etapa do teste, formando um complexo anticorpo-anticorpo-conjugado.

Após, realizou-se nova lavagem, e em seguida, foram adicionadas as soluções pré-ativadoras e ativadoras. A reação de quimioluminescência foi medida em unidades de luz reativa (RLUs), diretamente relacionadas com a quantidade de anticorpos IgM anti-*Toxoplasma gondii* na amostra, sendo as RLUs detectadas por sistema ótico do ARCHITECT®, de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante (ABBOTT, 2009). Considerando-se como sororreagentes para quimioluminescência o título de corte de 0,60 U para anticorpos IgM, e de 3,0 U para anticorpos IgG.

Figura 2- Equipamento ARCHITECT i2000SR®, utilizado para realização de sorologia para toxoplasmose.



Fonte: Laboratório de Sorologia e Endocrinologia, FMB-UNESP, 2022.

Figura 3- Reagentes, diluentes e conjugados utilizados realização de sorologia para toxoplasmose ARCHITECT i2000SR®.



Fonte: Laboratório de Sorologia e Endocrinologia, FMB-UNESP, 2022.

6.4 Extração de DNA:

Para a realização da PCR, as amostras de sangue foram previamente submetidas à extração de DNA utilizando o kit Illustra™ Blood Genomic Prep Mini Spin Kit (GE Healthcare®). Inicialmente aliquotou-se 200 µL de sangue em microtubo de 1,5 mL (DNAse-free) devidamente identificado, e posteriormente adicionou-se 20 µL de Proteinase K (20 mg/mL), e em seguida, homogeneizou-se em vórtex durante 10 segundos. Posteriormente, adicionou-se 400µL de tampão de extração, e novamente as amostras foram homogeneizadas no vórtex por mais 15 segundos. Em seguida, as amostras permaneceram em temperatura ambiente por um período de 10 minutos, e depois transferiu-se o conteúdo para um tubo coletor junto à uma coluna. Centrifugou-se à 11000g por um minuto, e em seguida, descartou-se o sobrenadante. Acrescentou-se 500µL de solução de Lise à coluna, e posteriormente centrifugou-se à 11000 g por três minutos. Depois, desprezou-se o tubo coletor e o sobrenadante, e o material foi aliquotado para um microtubo de 1,5mL (DNAse-free). Em seguida, adicionou-se 100µL de solução de eluição que estava previamente aquecida à 70°C. Incubou-se por um minuto. Depois, centrifugou-se os microtubos à 11000g por um minuto. Após, as amostras foram armazenadas em freezer -80°C até o seu processamento.

6.5 Reação em Cadeia da Polimerase Convencional:

As amostras foram submetidas ao gene de repetição utilizando-se os oligonucleotídeos TOX4 (5'CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG3') e TOX5 (5CGCTGCAGACACGTGCATCTGGATT3'), segundo descrito por Homan et al. (2000), amplificando uma região de 529 pares de base (pb). Cada microtubo de reação de 0,2mL recebeu 2,5µL tampão de PCR 10x, sem magnésio (50mM KCl, 10mM Tris-HCl), 0,75µL MgCl₂ (1,5mM), 0,25µL de solução de deoxinucleotídeos (1,25mM), *Taq* DNA polimerase (0,15U), 5µL de cada oligonucleotídeo (10µM), 10µL de amostra, e 17,35µL água ultrapura (q.s.p.). Todas as amplificações foram realizadas em termociclador MasterCycler EP gradient, utilizando-se uma incubação inicial de 7 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C e 1 minuto a 72°C, com incubação final de 10 minutos a 72°C. A corrida do gel de agarose foi realizada inicialmente a 80V durante 5 minutos, seguida de 100V por 60 minutos. Após a corrida, o produto da amplificação foi visualizado em sistema de fotodocumentação

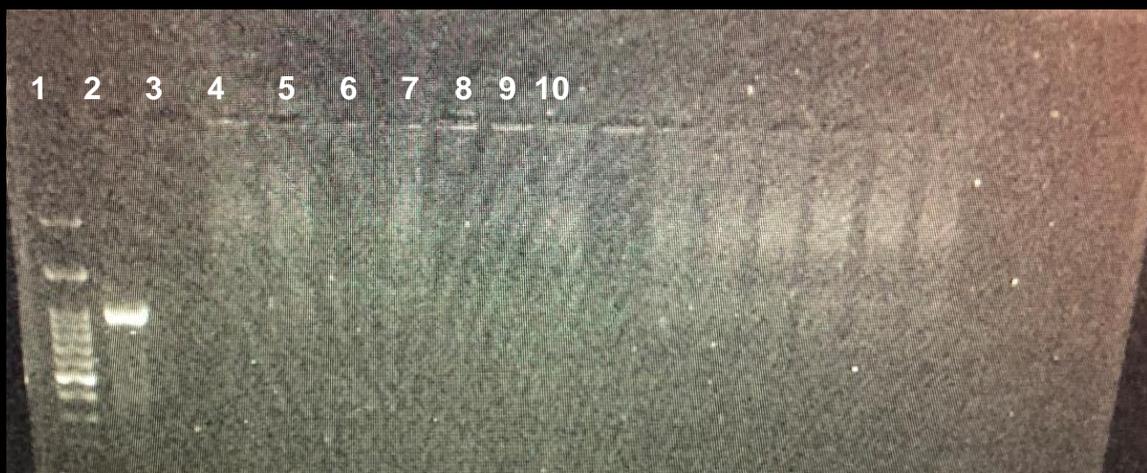
digital, Sistema Gel-Doc it18, sob luz ultravioleta, e em seguida, fotografado, conforme ilustrado nas figuras 4,5,6 e 7.

Figura 4- Resultado Reação em Cadeia da Polimerase da 1º coleta, de todos os pacientes do grupo 1 e 2.

AMOSTRAS DA 1º COLETA DOS PACIENTES DOS GRUPOS 1 E 2

Primer: Tox4/Tox5

Agarose 2%: 90v-110 minutos



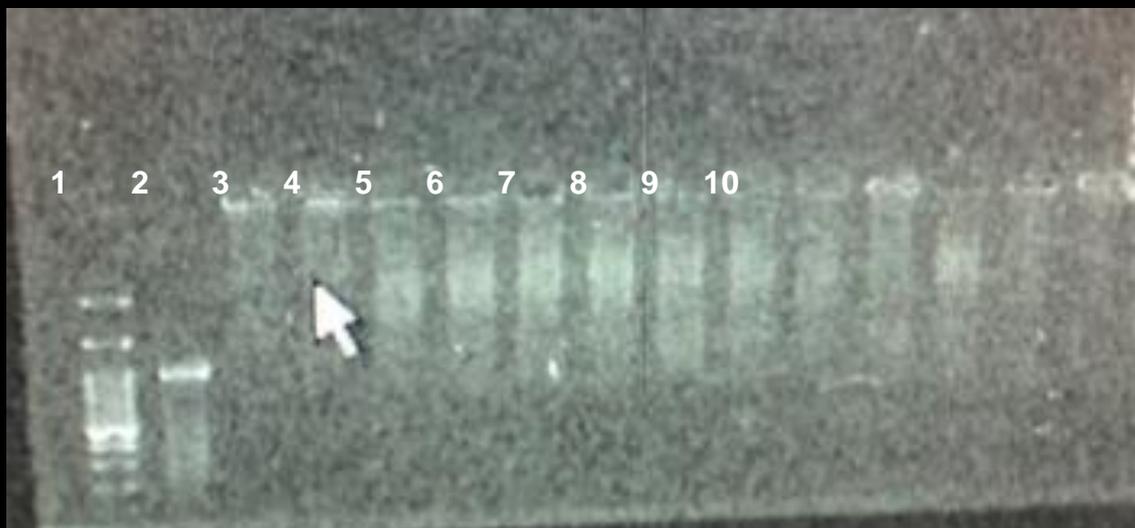
1. Marcador 529pb
2. Controle Positivo
3. Controle Negativo

Figura 5- Resultado Reação em Cadeia da Polimerase da 2^o coleta, de todos os pacientes do grupo 1 e 2.

AMOSTRAS DA 2^o COLETA DOS PACIENTES DOS GRUPOS 1 E 2

Primer: Tox4/Tox5

Agarose 2%: 90v-110 minutos



- 1. Marcador 529pb**
- 2. Controle Positivo**
- 3. Controle Negativo**

Figura 6- Resultado Reação em Cadeia da Polimerase da 3^o coleta, de todos os pacientes do grupo 1 e 2.

AMOSTRAS DA 3^o COLETA DOS PACIENTES DOS GRUPOS 1 E 2

Primer: Tox4/Tox5

Agarose 2%: 90v-110 minutos



- 1. Marcador 529pb**
- 2. Controle Positivo**
- 3. Controle Negativo**

Figura 7. Resultado Reação em Cadeia da Polimerase da 4^o coleta, de todos os pacientes do grupo 1 e 2.

AMOSTRAS DA 4^o COLETA DOS PACIENTES DOS GRUPOS 1 E 2

Primer: Tox4/Tox5

Agarose 2%: 90v-110 minutos



- 1. Marcador 529pb**
- 2. Controle Positivo**
- 3. Controle Negativo**

7 ATIVIDADE EDUCAÇÃO EM SAÚDE

Considerando-se a comunicação como instrumento de fundamental importância para o papel do médico veterinário nas ações de educação em saúde, destaca-se que esta pode ser compreendida como um conjunto de sinais verbais e não-verbais emitidos e percebidos com a intenção de expor ideias e torná-las comuns em um processo de compreender. A comunicação representa a base de sustentação das ações de educação em saúde em medicina veterinária, e em qualquer área em geral, tendo-se em vista que, ao informar o paciente sobre os fatores de risco da enfermidade, precisa-se interagir e, portanto, deve ser considerada como capacidade ou competência interpessoal a ser adquirida pelo profissional, sendo essa capacidade importantíssima no contexto da saúde única onde o presente projeto de pesquisa se insere (BROCA; FERREIRA, 2014).

A partir dessa necessidade elaborou-se folder informativo destinado aos pacientes, contendo orientações sobre a profilaxia e controle da doença, visando promover conhecimento sobre os fatores de risco, boa adesão a TARV, educação sanitária, possibilitando assim, aumentar o conhecimento sobre a doença, conseqüentemente a realização de escolhas e hábitos de higiene saudáveis e prevenção da enfermidade (figuras 8 e 9).

O conteúdo foi organizado tendo como base a literatura científica sobre o assunto, para ser usado no momento das orientações fornecidas no início do tratamento, quando os pacientes estão em atendimento no Serviço de Ambulatórios Especializados de Infectologia “Domingos Alves Meira” (SAEI-DAM) e Serviço de Infectologia do HC-FMB-Unesp. Percebeu-se que neste momento há maior dificuldade em assimilar de maneira eficiente as informações transmitidas verbalmente e com esse material os pacientes demonstraram interesse na pesquisa. O material impresso inclui orientações e textos com linguagem simples sobre toxoplasmose, fatores de risco, profilaxia e controle, possibilitando o entendimento dos pacientes.

Qualificar o conteúdo de material informativo como folhetos, folders etc, com pacientes e familiares que já vivenciaram de alguma forma o tema nele abordado, é uma atitude importante para todos, inclusive para os pesquisadores. É um momento no qual se têm condições de avaliar o que realmente está faltando ou não foi compreendido e da distância existente entre o que se escreve e o que é entendido e

como é entendido; das fantasias, dos tabus, das dificuldades em relação ao paciente ou familiar e estar doente. É a oportunidade de se validar as informações fornecidas, bem como o processo de comunicação, tomando-se o cuidado em utilizar este recurso de comunicação de modo dialógico, sem mensagens fragmentadas, sem ser unidirecional, tecnicista, linear e limitado (BROCA; FERREIRA, 2014).

O processo educativo proposto é considerado uma importante ferramenta para fornecer informações sobre neurotoxoplasmose em PVHA, favorecendo a adesão a TARV pela possibilidade de compreender o porquê de todas as ações e procedimentos. Promove mudanças na forma de sentir, pensar e atuar desses indivíduos em relação a seus filhos e si mesmos, proporcionando um significativo apoio nesse momento do impacto da doença.

Vale ressaltar que devido a pandemia por Covid-19, ao longo do desenvolvimento da pesquisa, não foi possível avaliar a ausência de informações, desinformações e a avaliação da aquisição de conhecimento, pois os pacientes encontravam-se em isolamento, com mínimo de contato possível com os pesquisadores. Pode-se considerar este aspecto como um fator limitante desta atividade na pesquisa, da mesma forma que para a pesquisa como um todo, que previa originalmente trabalhar com um número de pacientes maior, o que foi impossível pela pandemia.

Figura 8- Folder informativo utilizado na atividade de Educação em Saúde sobre Infecção pelo *T.gondii* em PVHA.



O QUE É TOXOPLASMOSE ?

- Doença causada pelo protozoário "Toxoplasma gondii", que acomete todos os animais, inclusive humanos.
- É uma das zoonoses (doença transmitidas por animais) mais comuns mundialmente, sendo a principal infecção oportunista em Pessoas Vivendo com HIV/Aids (PVHA).
- PVHA são suscetíveis à forma mais grave da doença, chamada Neurotoxoplasmose, quando não ocorre a adesão à terapia antirretroviral (TARV), e consequentemente ocorre a imunossupressão e o aparecimento da doença.



COMO SE TRANSMITE ???

- Ingestão de alimentos e água contaminados.
- Transmissão de mãe para filho durante a gestação (transplacentária).
- Contato com fezes de gatos infectados.
- De forma mais rara: por inalação de aerossóis contaminados, inoculação acidental, transfusão sanguínea e transplante de órgãos.

REALIZAÇÃO

*Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais- Faculdade de Medicina de Botucatu- Unesp.

*Projeto de Pesquisa: "Infecção pelo T. gondii em pacientes vivendo com HIV/Aids: Sororreatividade e perfil clínico".

*Serviço de Diagnóstico de Zoonoses Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- Unesp Botucatu.

*Pesquisadores Responsáveis:
M.V Mariana Zanchetta e Gava

 (27) 997953421

 Marianazgava@gmail.com

Orientador: Prof. Titular Helio Langoni
Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Naime



INFECÇÃO PELO TOXOPLASMA GONDII EM PACIENTES VIVENDO COM HIV/AIDS

CONHECER PARA PREVENIR!



COMO ME PREVENIR ??

*Consuma apenas carnes bem cozidas, leite pasteurizado ou fervido, e de boa procedência.

*Consuma apenas água filtrada.

*Frutas, verduras e legumes crus devem ser cuidadosamente higienizados antes do consumo.

*Sempre lavar bem as mãos com água e sabão, e os utensílios em contato com a carne e hortaliças.

COMO ME PREVENIR ??

*Use luvas ao manejar terra, jardins e caixas de areia. Sempre higienizar as mãos após o manuseio.

Não alimentar os animais de estimação com carne crua ou mal-cozida.

*Faça o controle de moscas, baratas e formigas.

 A principal medida de prevenção para toxoplasmose é a boa adesão ao tratamento antirretroviral!



QUAIS SÃO OS SINTOMAS ?

- Os sintomas aparecem entre o 5° e o 23° dia de exposição.
- Sendo os principais sintomas de Neurotoxoplasmose em PVHA:



Febre alta



Dor de cabeça intensa



Confusão mental

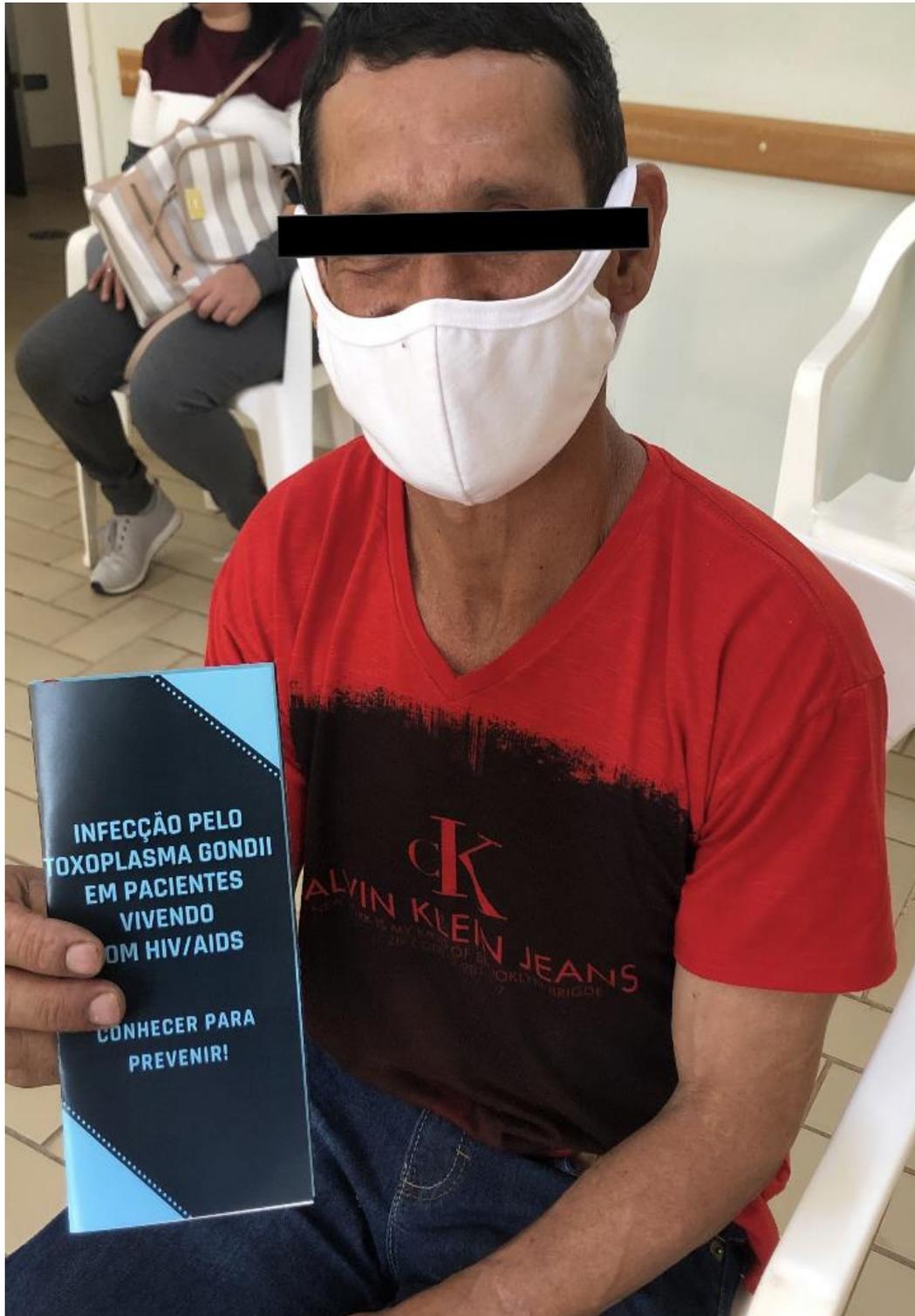


Falta de coordenação motora



Convulsões

Figura 9- Paciente participante do projeto de pesquisa, durante a realização da atividade de Educação em Saúde. Foto autorizada pelo paciente em 01/09/21.



Fonte: Serviço de Diagnóstico de Zoonoses, FMVZ- UNESP, 2022.

8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Foi realizada uma estatística descritiva por grupo, para variáveis contínuas, como, carga viral inicial, CD4 inicial, com o cálculo de média, mediana, desvio padrão, valores de mínimo e máximo, p-valor realizado pela Distribuição Binomial Negativa. Para o cálculo de idade por grupos, foi realizado o teste t de Student.

Para a análise das variáveis como, o gênero, procedência e resultados dos exames sorológicos, foi realizada análise descritiva em porcentagem (%) e teste Qui-quadrado. Todas as análises foram realizadas pelo programa SAS for Windows, v.9.4, com auxílio de profissionais do Escritório de Apoio à Pesquisa (EAP) da FMB/UNESP". Nível significância 5%.

9 ASPECTOS ÉTICOS

Os aspectos éticos referentes à pesquisa seguiram as recomendações da Resolução 466/12, a qual dispõe sobre as normas e diretrizes de pesquisa envolvendo seres humanos. Desse modo, o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FMB-UNESP, parecer n°. 3.721.608. Os pacientes incluídos no estudo aceitaram participar da pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXOS 1 e 2).

10 RESULTADOS

Dos 10 pacientes envolvidos no estudo, sete (70%) eram provenientes do Grupo 1 (sintomático), três (30%) do Grupo 2 (controle). Em relação ao gênero, seis (60%) pacientes eram do sexo masculino, e quatro (40%) do sexo feminino, sendo que no grupo sintomático 33,3% eram do sexo feminino e 66,7% do sexo masculino. No grupo controle, 50 % dos pacientes eram do sexo feminino e 50% do masculino. Todos os pacientes tinham idade superior a 18 anos, com idade média no grupo controle de 36,75 anos, e média de 40,33 anos para grupo sintomático.

Tabela 1. Análise descritiva das variáveis avaliadas, para grupo sintomático (1) e comparação de médias para variáveis contínuas.

Variáveis	Média	DP	Min	Máx	Mediana	p-valor
Idade (anos)	40,33	14,12	26	61	40	0,6611
CD4 no momento do diag. HIV	61,5	73,19	4	200	44	0,9816
CD4 no momento do diag. NTX*	32,83	27,54	4	71	28	-
Carga viral no momento do diag. HIV	2254851	3079631	463	6762877	582890	0,2612
Carga viral no momento do diag. NTX**	2254851	3079631	463	6762877	582890	0,3927

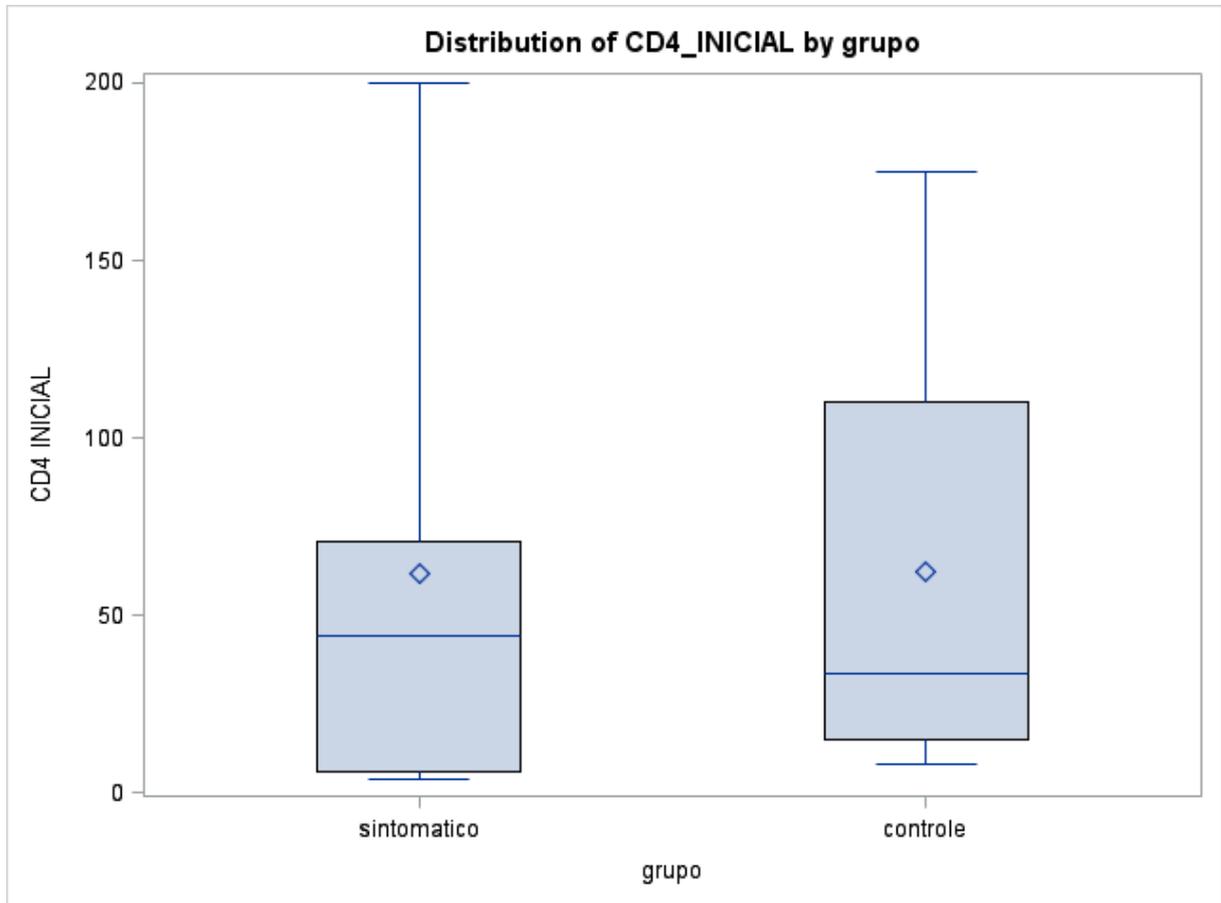
*CD4 no momento do diagnóstico NTX= Valores inferiores a 500 células/mm³ (ou < 24-28%), foram considerados alterados; **Carga viral no momento da diagnóstico NTX= Valores superiores a 10.000-30.000 cópias de RNA/ml foram considerados alterados.

Tabela 2. Análise descritiva das variáveis avaliadas para o do grupo controle (2) e comparação de médias para variáveis contínuas.

Variáveis	Média	DP	Min	Máx.	Mediana	p-valor
Idade (anos)	36,75	8,02	29	47	35,5	0,6611
CD4 no momento do diag. HIV	62,5	76,54	8	175	33,5	0,9816
CD4 no momento do diag. NTX*	62,5	76,54	8	175	33,5	0,9816
Carga viral no momento do diag. HIV	681965,75	729822,6	306973	1776642	322124	0,2612
Carga viral no momento do diag. NTX**	800988,33	844963,5	306973	1776642	319350	0,3927

*CD4 no momento do diagnóstico NTX= Valores inferiores a 500 células/mm³ (ou < 24-28%), foram considerados alterados; **Carga viral no momento da diagnóstico NTX= Valores superiores a 10.000-30.000 cópias de RNA/ml foram considerados alterados.

Figura 10- Boxplot da distribuição de CD4 inicial para os grupos sintomático (1) e controle (2).



Legenda: A mediana é maior para grupo sintomático, porém não atinge diferença significativa em medianas ($p=0,9$).

Em relação aos municípios de procedência dos pacientes, dois (20%) eram provenientes de Cerqueira Cesar. Os outros oito (80%) eram provenientes de Agudos (10%), Avaré (10%), Arandu (10%), Fartura (10%), Laranjal Paulista (10%), Manduri (10%), Piraju (10%), e Taquarituba (10%).

Dos 10 pacientes avaliados, nove (90%) tinham as contagens de linfócitos T CD4+ abaixo de 200 células/mm³, e oito (80%) abaixo de 100 células/mm³. As cargas virais plasmáticas do HIV encontravam-se acima do limite de detecção em todos os pacientes no momento da primeira coleta para os exames, sendo o limite mínimo estabelecido como aceitável de 40 cópias de RNA/mL, sendo que os valores observados de carga viral apresentaram média de 2254851 cópias no grupo 1 (sintomático) e de 800988,33 cópias no grupo 2 (controle).

Dos sete (100%) pacientes do grupo sintomático, as manifestações clínicas de toxoplasmose cerebral no momento da internação, também surgiram como primeira manifestação clínica de Aids, mesmo já possuindo diagnóstico anterior para HIV. Um paciente (25%) do grupo 2 manifestou sintomatologia presuntiva de NTX durante o desenvolvimento da pesquisa, sendo automaticamente transferido do grupo controle (1) para grupo sintomático (2).

Em relação às manifestações clínicas, sete (100%) dos pacientes do grupo 01 queixavam-se de cefaleia, quatro (57,14%) apresentavam confusão mental, cinco (71,42%) manifestavam hemiparesia dos membros, quatro (57,14%) manifestavam déficit cognitivo, três (42,85%) perda de função motora, três (42,85%) crises convulsivas, e cinco (71,42%) apresentavam mais de uma manifestação clínica.

Dos 10 pacientes, três (30%) não foram sororreagentes para pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii*, tanto na RIFI quanto na quimiluminescência. Adicionalmente, 7 (70%) pacientes dos dois grupos (1 e 2), apresentaram anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii* na primeira coleta em ambas as técnicas sorológicas, e seis (60%) foram sororreagentes nas duas técnicas no momento da segunda coleta. No momento da terceira coleta, 3 (30%) reagiram para os dois exames, e mantiveram-se sororreagentes para os dois exames sorológicos na quarta coleta.

Na pesquisa de anticorpos IgG anti-*T.gondii* pela RIFI, o título prevalente foi 4096 (50%), seguido por 1024 (30%), e 64 (20%), enquanto que para os anticorpos IgM anti-*T.gondii* foi 1024 (50%), seguido por 4096 (20%), 64 (10%) e 256 (10%). E na pesquisa de anticorpos IgG anti-*T.gondii* pela quimiluminescência, o título prevalente foi $\geq 3,0$ (40%), seguido por 2,90 (30%), 1,60 (10%), 1,50 (10%) e 1 (10%). E para os anticorpos IgM anti-*T.gondii* foi 0,60 (20%), seguido por 70 (10%), 80 (10%) e 90 (10%).

Figura 11- Curva sorológica de anticorpos IgG anti-*T.gondii* pela Reação de Imunofluorescência Indireta para o grupo sintomático (1) e controle (2).

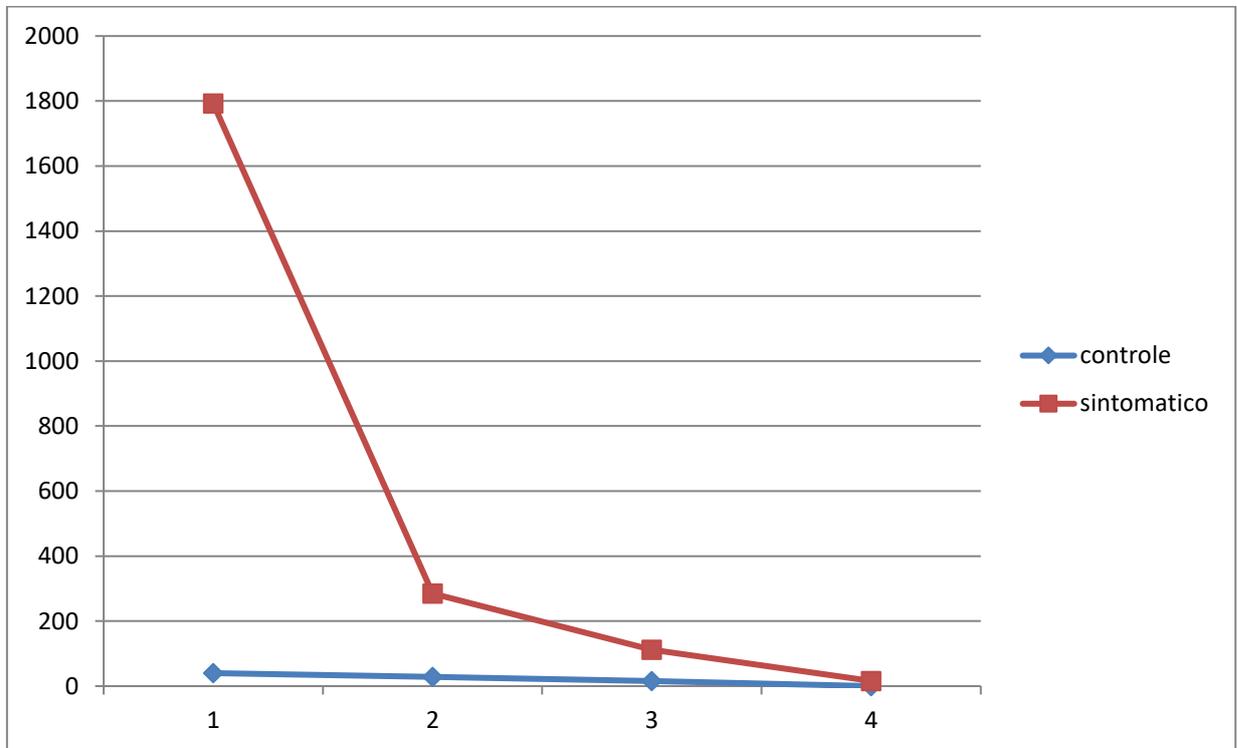


Figura 12- Curva sorológica de anticorpos IgM anti-*T.gondii* pela Reação de Imunofluorescência Indireta para o grupo sintomático (1) e controle (2).

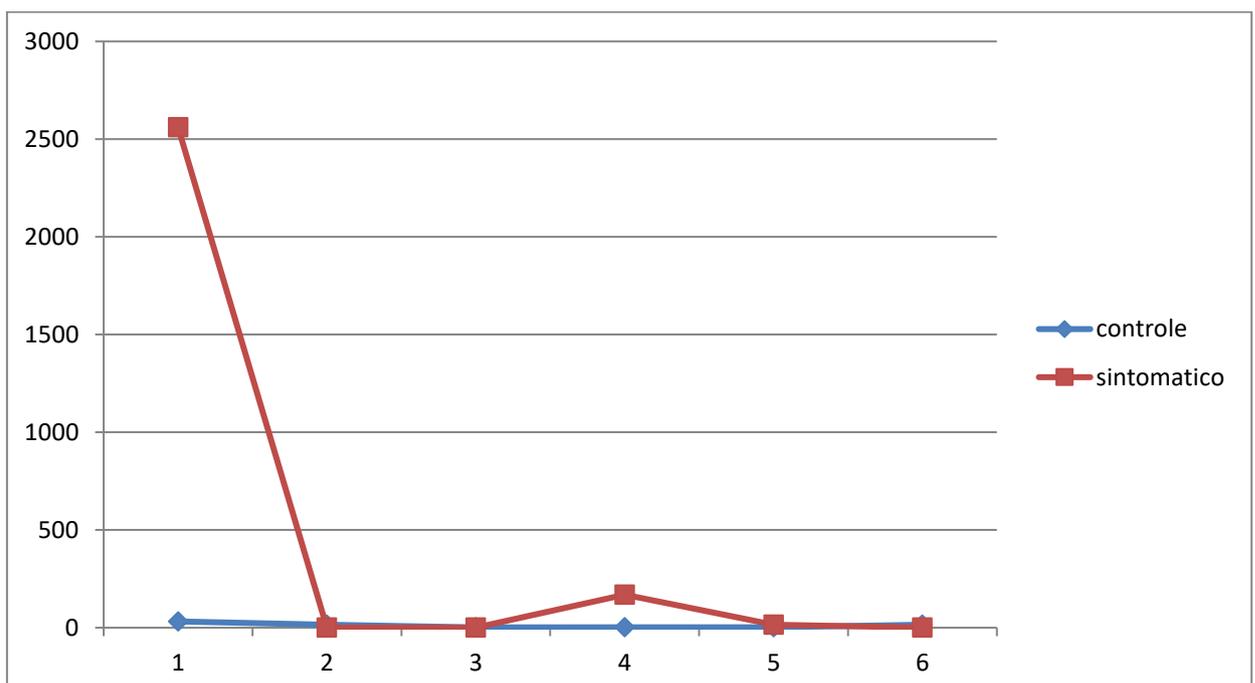


Figura 13- Curva sorológica de anticorpos IgG anti-*T.gondii* pela Quimiluminescência para o grupo sintomático (1) e controle (2).

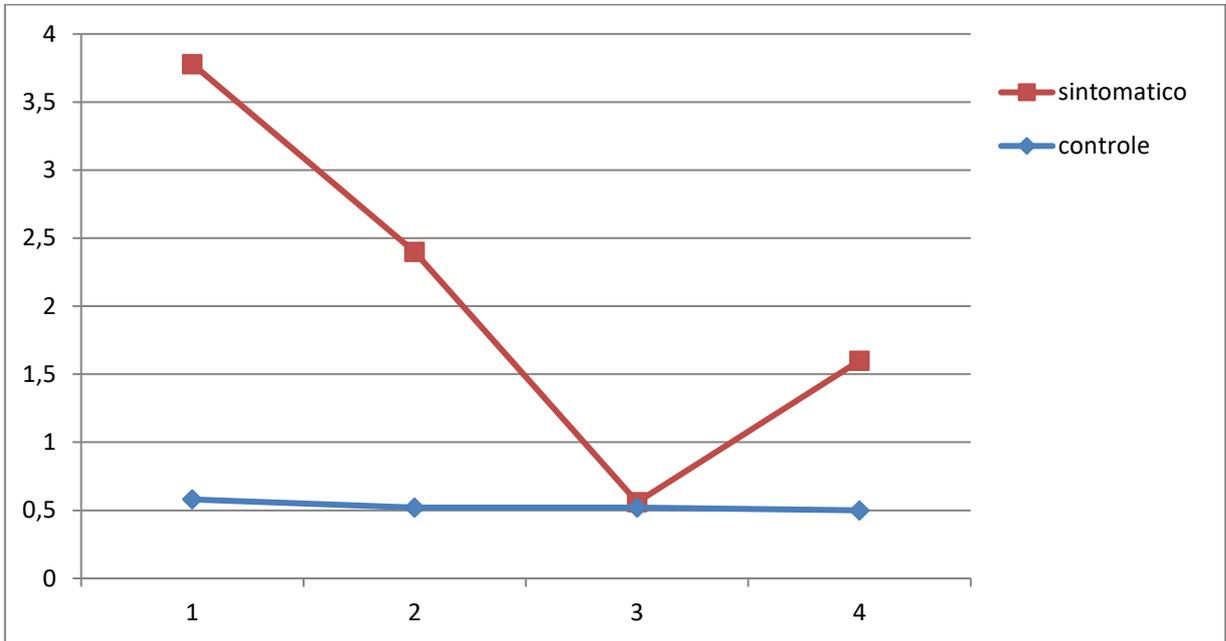
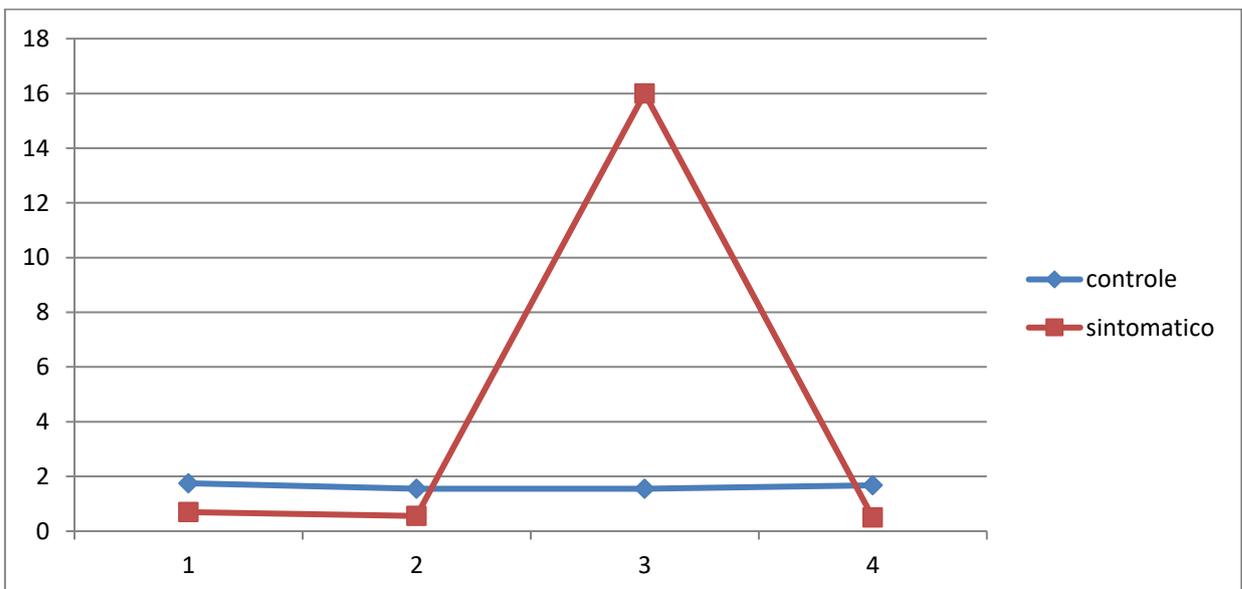


Figura 14- Curva sorológica de anticorpos IgM anti-*T.gondii* pela Quimiluminescência para o grupo sintomático (1) e controle (2).



Das 10 amostras de sangue analisadas pela Reação em Cadeia da Polimerase convencional, todas mostraram-se negativas.

Os sete pacientes do grupo sintomático foram submetidos a TC de crânio no momento do diagnóstico de toxoplasmose cerebral, e nos 7 (100%) foi utilizado contraste intravenoso. Dois (28,57%) realizaram a TC somente na fase sem contraste, provavelmente, por ter sido a toxoplasmose a principal hipótese diagnóstica, optando-se por considerar apenas as lesões hipodensas nas imagens.

Em todos os casos em que o contraste foi utilizado houve realce anelar e edema perilesional. Foram encontradas, também, hidrocefalia em cinco (71,42%), calcificações patológicas em dois (28,57%) e atrofia córtico-subcortical em três (42,85%) pacientes. Em três pacientes do grupo controle não foi realizada a TC de crânio durante o desenvolvimento e desfecho da pesquisa.

O tratamento da toxoplasmose cerebral foi realizado com antimicrobianos, sendo que os sete pacientes receberam sulfametoxazol + trimetoprim, protocolo terapêutico estabelecido pelo SAE-DAM, e todos realizaram tratamento de ataque por seis semanas. Durante o tratamento para NTX, três (42,85%) foram a óbito, um (14,28%) abandonou o tratamento para NTX e o tratamento com TARV, e seis (60%) tiveram boa adesão a TARV e continuaram até o fim da pesquisa, em tratamento.

Salienta-se que, em função da pandemia do Covid- 19 com medidas de isolamento social, o número de pacientes que efetivamente participaram da pesquisa foi menor que o estabelecido inicialmente, mesmo se tratando de uma amostragem de conveniência, baseando-se no fluxo histórico de atendimento no Serviço de Ambulatórios Especializados de Infectologia “Domingos Alves Meira” (SAEI-DAM) e Serviço de Infectologia do HC-FMB-Unesp. Considerando-se o não comparecimento de alguns pacientes nos momentos agendados para a avaliação e coleta das amostras, participaram do projeto 13 pacientes, aos quais somos gratos por podermos concluir a pesquisa com êxito, apesar de que um N amostral maior, poderia contribuir para uma melhor compreensão dos resultados.

11 DISCUSSÃO

A TARV reduziu significativamente a incidência, prevalência e taxas de letalidade da NTX em PVHA mundialmente. O tratamento da toxoplasmose cerebral tem sido relativamente bem-sucedido em comparação com outras infecções oportunistas. No entanto, esta manifestação ainda representa um determinante de mau prognóstico em pacientes com doença avançada e imunodeficiência grave no

Brasil (HERNANDEZ, et al., 2017). Pode-se ressaltar que no Brasil, comparativamente aos programas de controle da AIDS, adotados em outros países pode ser considerado como modelo, colocando o país em evidência.

Segundo Araújo (2019), as doenças oportunistas em PVHA são relacionadas sobretudo com a falta de adesão a TARV, e falta de conhecimento sobre os fatores de risco das enfermidades. Os resultados deste estudo sugerem que a falta de conhecimento sobre os fatores preditivos da doença, falta de adesão à TARV, e o abandono do mesmo são fatores determinantes para o mau prognóstico, reforçando a ideia de que uma boa educação em saúde pode ser uma excelente aliada na prevenção da NTX nesses pacientes. Sabe-se que os aspectos educacionais e o nível socioeconômico dos pacientes exercem papel relevante no controle da doença, principalmente no caso de doenças negligenciadas, que não é o caso da Aids no Brasil.

A NTX tem ocorrido em 25% dos indivíduos com Aids, sendo a infecção oportunista mais frequente do SNC no Brasil, estando diretamente relacionada à redução dos linfócitos T CD4⁺. Além disso, possuir carga viral superior a 10 mil cópias aumenta a chance em 90% de desenvolver a doença. No presente estudo, também foram encontrados baixos níveis de linfócitos T CD4⁺ e altas contagens de carga viral, em pacientes com diagnóstico presuntivo de NTX (ARAUJO, et al., 2019).

No Brasil, no período de 2007 a 2018, a taxa de detecção de HIV/aids foi de 48,9% entre os homens na faixa etária de 20 a 39 anos, corroborando com os resultados do presente estudo (AUN, 2019).

Ainda no presente estudo, a NTX foi a primeira manifestação da Aids em mais de 50% dos casos, dado semelhante aos de Oliveira (2015) que realizaram estudo em Pernambuco, no período de 2013 a 2015, e também observaram que mais da metade dos pacientes apresentaram esta infecção como primeira manifestação da Aids, contribuindo com o conceito de que a neurotoxoplasmose é um indicador de Aids em PVHA.

Todos os pacientes apresentaram anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii* sororeagentes, nos exames de RIFI e quimioluminescência, o que corrobora com os resultados de Correia (2013), reforçando que os exames sorológicos são uma boa opção no diagnóstico de NTX na rotina clínica.

O diagnóstico laboratorial na toxoplasmose baseia-se na detecção de anticorpos das classes IgM e IgG anti-*Toxoplasma gondii* e na presença de baixa

avidez de IgG. No entanto, esses exames apresentam limitações e, portanto, a PCR tem sido sugerida como uma ferramenta diagnóstica alternativa. No presente estudo todas as amostras de sangue dos pacientes apresentaram-se negativas para toxoplasmose pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase convencional, corroborando com resultado apresentado por Neves et al. (2021) que também não detectaram resultados positivos na PCR convencional, a partir do sangue.

Nenhum dos pacientes teve DNA parasitário de *T. gondii* detectado por PCR, mesmo nos casos mais graves, ou quando o sangue foi coletado logo após o início da doença. Esses resultados negativos indicam que a cinética da parasitemia necessita de investigação para determinar o melhor momento para a coleta de sangue, principalmente em indivíduos imunocompetentes. Assim, ressaltamos que um resultado negativo de PCR não exclui infecção recente por *T. gondii*, e os critérios sorológicos ainda são decisivos para o diagnóstico laboratorial de NTX.

Uma hipótese para os achados negativos de PCR convencional no presente estudo seria a baixa parasitemia associada aos casos de NTX em PVHA. Em estudos da Guiana Francesa, o diagnóstico molecular foi realizado com sucesso em casos com maior gravidade, o que pode ser atribuído a altas cargas parasitárias e cepas mais virulentas (DEMAR, et al., 2007, 2012). Portanto, é possível que a fase de parasitemia tenha sido muito curta ou tenha precedido os sintomas em nossa coorte de estudo.

O DNA parasitário indetectável também pode estar relacionado ao uso de sangue total para esse fim. Em um modelo murino, a sensibilidade de detecção foi maior ao usar uma camada leucocitária isolada de grandes volumes de sangue do que ao usar uma única amostra de sangue total (BRENEIR-PINCHART, et al., 2015). Esta é uma hipótese que deverá ser avaliada, considerando-se maior número de células neste tipo de material.

Os resultados negativos indicam que embora muitos aspectos do ciclo evolutivo do *T. gondii* estejam bem descritos, alguns detalhes do curso da infecção ainda são desconhecidos, como a cinética da parasitemia, principalmente em indivíduos imunocompetentes levando em consideração as características genéticas do parasita. Portanto, resalta-se que um resultado negativo da PCR não exclui infecção recente por *T. gondii* em PVHA, e os critérios sorológicos ainda são decisivos para o diagnóstico laboratorial de NTX em PVHA.

A TC foi o exame utilizado para colaborar com o diagnóstico presuntivo da toxoplasmose cerebral no presente estudo, sendo que a grande maioria foi realizada com contraste, cujo realce melhora muito a visualização das lesões, facilitando sua caracterização e interpretação dos resultados (BRASIL,2018).

De acordo com o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos, do Ministério da Saúde, de 2018, a TC é o exame de imagem mais frequentemente indicado, em razão da sua maior disponibilidade na rede pública. No Brasil, de acordo com dados de janeiro de 2019, do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), do Ministério da Saúde, no estado de São Paulo, existem 1.155 tomógrafos contra 651 aparelhos de RNM. Embora menos disponível, a RNM é mais sensível na identificação de lesões pequenas ou localizadas em fossa posterior, especialmente, quando o exame tomográfico apresenta-se normal (BRASIL,2018).

No que se refere às manifestações neurológicas, alguns autores descrevem como principais, a cefaleia, hemiparesia, déficit cognitivo, perda de função motora e crises convulsivas, o que está de acordo com o presente estudo. A toxoplasmose cerebral baseia-se no diagnóstico presuntivo, considerando-se sinais e sintomas clínicos, exames sorológicos e de líquido e, também, na neuroimagem, que a cada dia se faz mais presente, tornando-se uma ferramenta imprescindível na prática clínica (CDC, 2022; VIDAL, 2019; FARD, et al., 2020).

Devido ao caráter prospectivo observacional do presente estudo, observou-se dificuldade de incluir novos pacientes para dar seguimento a pesquisa, pois a mesma foi realizada durante a pandemia de Covid-19, como comentado em fatores limitantes da pesquisa. O Projeto de pesquisa necessitou de visitas dos pacientes egressos atendidos no Serviço de Infectologia do Hospital das Clínicas (HC-FMB- Unesp) e Serviço de Ambulatórios Especializados de Infectologia “Domingos Alves Meira” (SAEI- DAM), unidade do complexo médico-hospitalar da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB-Unesp), ao longo de um ano (12 meses) de acompanhamento, com desenvolvimento de atividades de Educação em Saúde, as quais foram severamente prejudicadas pela pandemia, pois muitos dos pacientes encontravam-se em isolamento social, e não podiam comparecer as consultas de retorno, durante a fase emergencial, afetando diretamente a continuidade do projeto. Seria imprescindível para a evolução da pesquisa o acompanhamento dos pacientes

durante o período de um ano, minimizando assim, possíveis vieses, garantindo-se avaliar com maior segurança os resultados obtidos.

12 CONCLUSÕES

- A maioria dos pacientes integrantes do estudo eram homens (60%), todos com idade superior a 18 anos, residentes no estado de São Paulo.
- A prevalência de exposição e presença de doença ativa pelo *T. gondii*, foi de 70%.
- Dos sete pacientes do grupo sintomático, três tiveram uma boa adesão a TARV e ao tratamento para NTX, apresentando melhora clínica dos sintomas após início dos mesmos, reforçando a importância desta prática no tratamento de NTX.
- Os sete pacientes do grupo sintomático, apresentaram manifestações clínicas sugestivas de NTX, como: cefaleia, confusão mental, hemiparesia dos membros, déficit cognitivo, perda da função motora e crises convulsivas.
- Dos sete pacientes do grupo sintomático, três pacientes (23,07%) não aderiram a TARV, tiveram infecção latente por *T.gondii* e foram a óbito.
- Os sete pacientes com NTX foram tratados com a associação de sulfametoxazol/trimetoprim, e os que se comprometeram com o tratamento da enfermidade e TARV apresentam melhoras significativas quanto as sequelas da doença e em sua vida pessoal, reforçando que a adesão a TARV proporciona melhor qualidade de vida e maior longevidade.
- Os exames sorológicos, como por exemplo, a RIFI e a Quimiluminescência são uma boa opção no diagnóstico da NTX na prática clínica.

13 REFERÊNCIAS

ABNT. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. 2.ed. Rio de Janeiro: ABNT, 2018

ANARADHA, B.; PREETHI, C. Seroprevalence of Toxoplasma IgG Antibodies in HIV Positive Patients in and Around Khammam, Telangana State. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v.8, n. 9, p. 01-02, 2014.

ANTINORI, A. et al. Prevalence, Associated Factors, and Prognostic Determinants of AIDS-Related Toxoplasmic Encephalitis in the Era of Advanced Highly Active Antiretroviral Therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, p.1681–91, 2004.

ARAUJO, I. R. et al. Déficits motores e preditores de perda de mobilidade ao final da internação em indivíduos com neurotoxoplasmose. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 26, n. 4, p.360 – 365, 2019.

AUN, F.G. **Toxoplasmose cerebral em pessoas que vivem com HIV/aids: perfis epidemiológico, clínico, terapêutico e de neuroimagem**. 2019. Dissertação de Mestrado em Doenças Tropicais-“Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu,2019.

AYOADE, F.; CHANDRANESAN, A.S.J. Toxoplasmose associada ao HIV-1. [Atualizado em 18 de setembro de 2021]. In: StatPearls. **Treasure Island (FL): StatPearls**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441877/>. Acesso em 4 de dez. de 2021.

AZOVTSOVA, O.V. et al. Cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients over 2015-2018 (a case study of Russia). **Epidemiol Infect.** v. 4, p. 148-142, 2020.

BOTTEREL, F. et al. Disseminated Toxoplasmosis, Resulting from Infection of Allograft, after Orthotopic Liver Transplantation: Usefulness of Quantitative PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 5, p. 1648–1650, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças Infecciosas e Parasitárias: Guia de bolso**. Brasília, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Manual Técnico para o Diagnóstico de Infecção pelo HIV**. Brasília, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de IST, HIV/AIDS e Hepatites Virais. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos**. Brasília,2017.

BRASIL. Ministério da Saúde - Secretaria em Vigilância em Saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos**, 2018.

BRETAGNE, S. Molecular diagnosis in clinical parasitology and mycology: limits of the current polymerase chain reaction (PCR) assays and interest of the real-time PCR assays. **Clin Microbiol Infect**, v. 9, n. 6, p. 505-511, 2003.

CAMARGO, M.E., 1964. Introdução as técnicas de imunofluorescencia. *Rev. Bras. Patol. Clin.* 10, 143–171.

CDC, 2022. Panel on Opportunistic Infections in Adults and Adolescents with HIV. **Guidelines for the prevention and treatment of opportunistic infections in adults and adolescents with HIV: recommendations from the Centers for Disease**

Control and Prevention, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. Disponível em: <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/guidelines/adult-and-adolescent-opportunistic-infection/>. Acesso em 20 de jan de 2022.

CHRISTO, P. P. Alterações cognitivas na infecção pelo HIV e AIDS. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v.56, n.2, p.242-247, 2010.

COCK, K. M. D. et al. The evolving epidemiology of HIV/AIDS. **AIDS**, v. 26, p. 1205–1213, 2012.

COLOMBO, F. A. et al. Diagnosis of Cerebral Toxoplasmosis in AIDS Patients in Brazil: Importance of Molecular and Immunological Methods Using Peripheral Blood Samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 10, p. 5044–5047, 2005.

CORDEIRO, C. A. et al. Immunology of the toxoplasmic retinochoroiditis. **Arq Bras Oftalmol**, v.73, n. 6, p.548-51, 2010.

CORREIA, C.C. et al. Features to validate cerebral toxoplasmosis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**. V. 46, n. 3, p. 373-376, 2013.

DUBEY, J.P., 1990. Neospora caninum: a look at a new Toxoplasma-like parasite of dogs and other animals. **Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.**12, 653–663

DUNAY, I.R. et al. Tratamento da toxoplasmose: perspectiva histórica, modelos animais e prática clínica atual. **Clin Microbiol Ver**, v.31, p. 4, 2018.

FARD, S. A. et al. Fulminant and Diffuse Cerebral Toxoplasmosis as the First Manifestation of HIV Infection: A Case Presentation and Review of the Literature. **Am J Case Rep** v. 26, n. 21, p.919624, 2020.

FONTOURA, J. et al. Soroprevalência da toxoplasmose em pacientes HIV reagentes atendidos pelo SAE/CTA. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, 2016.

FOROUTAN-RAD, M. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in the Iranian pregnant women: A systematic review and meta-analysis. **Acta Tropica**, v.158, p. 160–169, 2016.

GALLO, R. et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. **Science**, v. 224, p. 500-503, 1984.

GOTTLIEB, M. et al. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: Evidence for a new severe acquired cellular immunodeficiency syndrome. **The New England Journal of Medicine**, p. 1425–1431, 1981.

KODYM, P. et al. Incidence, immunological and clinical characteristics of reactivation of latent *Toxoplasma gondii* infection in HIV-infected patients. **Epidemiol. Infect**, v. 143, n.3, p. 600–607, 2015.

LUFT, B. J; CHUA, A. Central Nervous System Toxoplasmosis in HIV Pathogenesis, Diagnosis, and Therapy. **Curr Infect Dis Rep**, v. 2, n. 4, p. 358-362, 2000.

LUNDGREN, J. et al. Initiation of Antiretroviral Therapy in Early Asymptomatic HIV Infection. **n engl j med nejm.org**, 2015.

MARQUES, B. A, et al. Systematic review of serological methods used in prenatal screening of toxoplasmosis in pregnant women. **Rev Med Minas Gerais**, v. 25, n. 6, p. S68-S81, 2015.

MECHAIN, B. et al. Lack of utility of specific immunoglobulin G antibody avidity for serodiagnosis of reactivated toxoplasmosis in immunocompromised patients. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 7. N. 4, p. 703-705, 2000.

MEIRA, C. S. et al. Use of serum reactivity against *Toxoplasma gondii* excreted-secreted antigens in cerebral toxoplasmosis diagnosis in human immunodeficiency virus-infected patients. **J Med Microbiol**, v. 57, n. 7, p. 845-850, 2008.

MELO, L.M. et al. Neurotoxoplasmose em pacientes portadores de Imunodeficiência Humana e suas sequelas: Uma revisão narrativa. **Braz. J. of Develop.**, Curitiba, v. 6, n. 10, p. 81527-81538,2020.

MESQUITA, R, T. et al. Molecular diagnosis of cerebral toxoplasmosis: comparing markers that determine *Toxoplasma gondii* by PCR in peripheral blood from HIV-infected patients. **Braz J Infect Dis**, v.14, n.4, p.346-350, 2010.

Neves ES, Espíndola OM, Curi A, Amendoeira MR, Rocha DN, Gomes LHF, Guida LC. PCR-based diagnosis is not always useful in the acute acquired toxoplasmosis in immunocompetent individuals. **Parasitol Res**. 2021 Feb;120(2):763-767. doi: 10.1007/s00436-020-07022-6. Epub 2021 Jan 8. PMID: 33415403.

OLIVEIRA, G.B. et al. Cerebral toxoplasmosis in patients with acquired immune deficiency syndrome in the neurological emergency department of tertiary hospital. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, 2016.

OLIVEIRA, M.G. **Estudo de fatores de risco, sororreatividade e perfil clínico de pacientes HIV/Aids co-infectados com Toxoplasma gondii em Natal, Rio Grande do Norte**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte-UFRN, Natal, 2016.

PEREIRA-CHIACCOLA, V. L. et al. *Toxoplasma gondii* infection and cerebral toxoplasmosis in HIV-Infected patients. **Future Microbiol**, v. 4, n. 10, p. 1363-1379, 2009.

ROBERT-GANGNEUX, F; BELAZ, S. Molecular diagnosis of toxoplasmosis in immunocompromised patients. **Curr Opin Infect Dis**, v. 29, n. 4, p. 330–339, 2016.
ROMAND, S. et al. Usefulness of quantitative polymerase chain reaction in amniotic fluid as early prognostic marker of fetal infection with *Toxoplasma gondii*. **AJOG**, v. 190, n. 3, p. 797–802, 2004.

ROSTAMI, A. et al. Frequency of *Toxoplasma gondii* in HIV Positive Patients from West of Iran by ELISA and PCR. **Iranian J Parasitol**, v. 9, n. 4, p.474-48, 2014.

SCHLUTER, D; BARRAGAN, A. Advances and challenges in understanding cerebral toxoplasmosis. **Front Immunol**, v.10, p. 242, 2019.

TAN, I. L. et al. HIV-associated opportunistic infections of the CNS. **The Lancet Neurology**, 2012.

SHEN, G.; WANG, X.; GAO, Y. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* Infection among HIV/AIDS Patients in Eastern China. **Korean J Parasitol**, v. 54, n.1, p. 93-96, 2016.

SILVA, R.C. et al. First identification of *Sarcocystis tenella* (Railliet, 1886) Moule´, 1886 (Protozoa: Apicomplexa) by PCR in naturally infected sheep from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 165, p. 332–336, 2009.

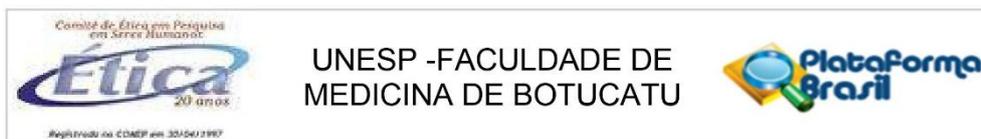
SILVA, R.C; SILVA, A. V. **Toxoplasmose em animais domésticos**. Em: MEGID, J. et al. Doenças Infecciosas em animais de produção e de companhia. 1ª edição, Rio de Janeiro, Rocca, p.1040- 1054, 2016.

VIDAL, J.E. et al. Cerebral toxoplasmosis in HIV-positive patients in Brazil: clinical features and predictors of treatment response in the HAART era. **AIDS Patient Care STDS**, v 19, n.10, p. 626-634, 2005.

VIDAL, J.E. HIV-Related Cerebral Toxoplasmosis Revisited: Current Concepts and Controversies of an Old Disease. **J Int Assoc Provid AIDS Care**, v. 18, 2019.

14 ANEXOS

14.1 Parecer Consubstanciado do CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: "Infecção pelo *Toxoplasma gondii* em Pacientes vivendo com HIV-Aids: Sororreatividade e Perfil Clínico"

Pesquisador: MARIANA ZANCHETTA E GAVA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 20496019.0.0000.5411

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.721.608

Apresentação do Projeto:

A toxoplasmose é uma das principais infecções oportunistas que afetam as pessoas vivendo com HIV/Aids (PVHA), levando a alta taxa de morbidade e mortalidade. Diante da importância da toxoplasmose, torna-se imprescindível o levantamento de dados epidemiológicos referentes à infecção pelo *T. gondii*, principalmente, em relação ao impacto para saúde pública.

Hipótese:

Existe alta prevalência de exposição de anticorpos anti- *T. gondii* em PVHA, e presença de doença ativa.

Crítérios de inclusão (categorizados em 2 grupos):

Grupo 1: PVHA com diagnóstico recente de reativação de infecção latente por *T. gondii*, com diagnóstico presuntivo para neurotoxoplasmose, provenientes do Serviço de Infectologia do HC-FMB-Unesp, com um número de participantes estimados em 20 pacientes.

Grupo 2: PVHA diagnosticadas no mês anterior, provenientes do Serviço de Ambulatórios Especializados de Infectologia "Domingos Alves Meira" (SAEI-DAM), seguindo os seguintes critérios: CD4+ 200, sem tratamento com terapia antirretroviral, e sem sintomatologia neurológica, com número de participantes definido em 10 pacientes.

Crítérios de exclusão

Indivíduos menores de 18 anos, gestantes e aqueles que não concordarem em assinar o termo de consentimento livre esclarecido.

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

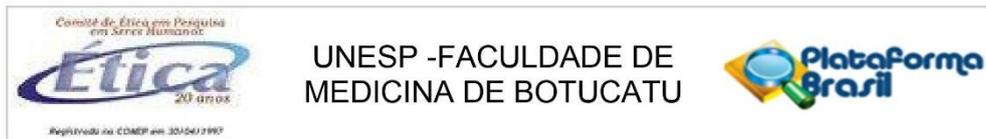
Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-970

UF: SP **Município:** BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1609

E-mail: cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 3.721.608

Nº total de pacientes: 30 (20 e 10)

Os pacientes serão acompanhados e avaliados prospectivamente no início do tratamento para neurotoxoplasmose, após retorno em 60 dias, 6 meses e posteriormente após 1 ano do início do tratamento, no período entre junho de 2019 a maio de 2020.

o diagnóstico da doença se dá por achados clínicos compatíveis, e achados nos exames de imagem, sendo que esse algoritmo é realizado na rotina do HC-FMB-Unesp.

Variáveis

variáveis clínicas: sexo, idade, município de procedência, data do diagnóstico do HIV, data do diagnóstico de neurotoxoplasmose (NTX), uso de TARV no momento do diagnóstico de NTX, uso de profilaxia para NTX, 1º episódio de NTX CD4 inicial do paciente, data do CD4 inicial, CD4 no momento do diagnóstico de NTX, data do CD4 no momento de NTX.

Carga viral inicial do paciente, data da carga viral, carga viral no momento de NTX

Amostras de sangue serão coletadas por meio de punção venosa, e coleta de líquido cefalorraquidiano será realizada pela técnica de punção lombar.

As amostras serão encaminhadas ao Laboratório de Diagnóstico Zoonoses, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, onde será realizado a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Reação em Cadeia da Polimerase convencional e nested-PCR.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a prevalência de exposição e a presença de doença ativa por *Toxoplasma gondii* em PVHA, atendidos no Serviço de Infectologia do HC FMB UNESP e Serviço de Ambulatórios Especializados de Infectologia "Domingos Alves Meira" (SAEI-DAM), unidade do complexo médico-hospitalar da FMB UNESP.

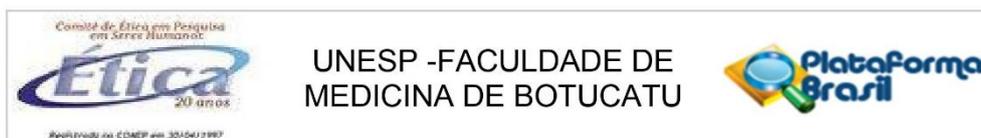
Objetivos específicos

Determinar a presença de anticorpos anti-*T. gondii* IgG e IgM em amostras de sangue de PVHA pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI);

Detectar *Toxoplasma gondii* em amostras de sangue e líquido cefalorraquidiano (LCR) pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR);

Caracterizar perfil clínico dos pacientes e sua relação com a sorologia para *T. gondii*, e investigar diagnóstico prévio para neurotoxoplasmose.

Endereço: Chácara Butignolli, s/n	CEP: 18.618-970
Bairro: Rubião Junior	Município: BOTUCATU
UF: SP	E-mail: cep@fmb.unesp.br
Telefone: (14)3880-1609	



Continuação do Parecer: 3.721.608

Comparar os resultados da análise do sangue pelos dois métodos: RIFI e PCR.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Risco de transmissão ocupacional.

Benefícios:

Importância dos métodos diagnósticos realizados por biologia molecular na investigação de quadros clínicos compatíveis com neurotoxoplasmose em PVHA

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de projeto de mestrado no programa de PG de Doenças Tropicais, orientado por Helio Langoni e coorientado por Alexandre Barbosa. Estudo prospectivo observacional, com amostra de conveniência baseando-se no fluxo histórico do Serviço de Infectologia do HC FMB UNESP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória foram anexados

- Projeto
- TCLE
- Anuência Institucional HC e FMB
- Cronograma
- Folha de rosto
- Biorrepositório.

Recomendações:

-

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após análise em REUNIÃO EXTRAORDINÁRIA, o Colegiado deliberou APROVADO o projeto de pesquisa apresentado.

Considerações Finais a critério do CEP:

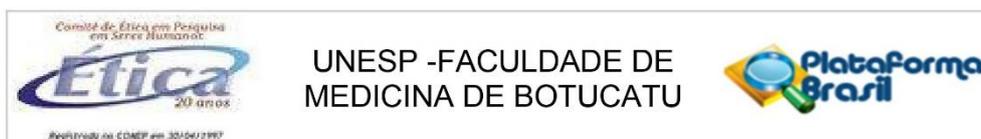
Conforme deliberação do Colegiado, em REUNIÃO EXTRAORDINÁRIA do Comitê de Ética em Pesquisa FMB/UNESP, realizada em 19/11/2019, o Projeto de Pesquisa encontra-se APROVADO.

O pesquisador deverá iniciar a coleta de dados após aprovação do CEP.

Após finalização da pesquisa, o pesquisador deverá apresentar relatório final de atividades.

Att CEP - FMB

Endereço: Chácara Butignolli, s/n	CEP: 18.618-970
Bairro: Rubião Junior	Município: BOTUCATU
UF: SP	E-mail: cep@fmb.unesp.br
Telefone: (14)3880-1609	



Continuação do Parecer: 3.721.608

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1385335.pdf	08/11/2019 16:59:29		Aceito
Outros	Carta_Resposta.pdf	08/11/2019 16:57:40	MARIANA ZANCHETTA E GAVA	Aceito
Outros	TERMO_ANUENCIA_ATUALIZADO.pdf	08/11/2019 16:54:33	MARIANA ZANCHETTA E GAVA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_MESTRADO_ATUALIZADO.pdf	08/11/2019 16:33:57	MARIANA ZANCHETTA E GAVA	Aceito
Parecer Anterior	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_3631564.pdf	08/11/2019 16:26:48	MARIANA ZANCHETTA E GAVA	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA_ATUALIZADO.pdf	08/11/2019 16:25:53	MARIANA ZANCHETTA E GAVA	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Termo_Biorrepositorio.pdf	08/11/2019 16:25:30	MARIANA ZANCHETTA E GAVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_ATUALIZADO.pdf	08/11/2019 16:24:24	MARIANA ZANCHETTA E GAVA	Aceito
Outros	DeclaracaoFMB.pdf	19/08/2019 11:03:35	MARIANA ZANCHETTA E GAVA	Aceito
Folha de Rosto	New_Blank_Document.pdf	19/08/2019 10:45:55	MARIANA ZANCHETTA E GAVA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Chácara Butignolli, s/n
 Bairro: Rubião Junior CEP: 18.618-970
 UF: SP Município: BOTUCATU
 Telefone: (14)3880-1609 E-mail: cep@fmb.unesp.br

14.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

RESOLUÇÃO 466/2012

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : RG HC UNESP:.....

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :..... SEXO:

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

II - DADOS REFERENTES À PESQUISA CIENTÍFICA

Prezado (a) Senhor (a)

Convido, o Senhor (a) para participar do Projeto de Pesquisa intitulada "Infecção pelo *Toxoplasma gondii* em pacientes vivendo com HIV/Aids: Sororreatividade e perfil clínico", que será desenvolvido por mim Mariana Zanchetta e Gava, aluna da Pós-graduação em Doenças Tropicais da Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho" Faculdade de Medicina de Botucatu- Unesp, com orientação do profissional de Médicos infectologistas, enfermeiros, e Professor Dr. Hélio Langoni e Professor Dr. Alexandre Naime Barbosa.

Estamos estudando a doença toxoplasmose em pacientes vivendo com HIV/Aids (PVHA). A toxoplasmose é uma zoonose, ou seja, uma doença naturalmente transmitida entre animais e humanos, sendo adquirida principalmente pela ingestão de carne suína e ovina crua ou mal cozida, ou pela ingestão de alimentos e água contaminados, manipulação de carne crua, ingestão de leite cru, jardinagem sem uso de luvas, exposição ao solo contaminado, contato com fezes de felídeos contaminadas, e infecção de mão para filho, sendo que a principal manifestação dessa doença em PVHA é a Neurotoxoplasmose, ou seja, acometimento do cérebro ou outras estruturas do Sistema Nervoso Central pelo protozoário.

Para pacientes sem manifestação da clínica da doença Toxoplasmose, serão coletados 4 mL do seu sangue, 4 vezes ao longo de 1 ano, sendo a primeira coleta no início do acompanhamento (1), após retorno em 60 dias (2), 6 meses (3) e posteriormente após 1 ano do início do tratamento (4). Essas coletas já fazem parte do calendário de rotina das PVHA em início de seguimento no Serviço de Ambulatórios Especializados de Infectologia "Domingos Alves Meira" - SAEI-DAM, não sendo necessário, portanto, coletas adicionais por conta dessa pesquisa. Além dos exames de rotina, será acrescido nessas análises de sangue alguns exames mais específicos no diagnóstico de toxoplasmose em pessoas assintomáticas (Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) Convencional e Nested-PCR).

Para pacientes com Neurotoxoplasmose, além dos exames de sangue descritos acima, será realizada única punção lombar para análise de líquido cefalorraquidiano (LCR), coleta essa já estabelecida na rotina de pacientes atendidos pelo Serviço de Infectologia do HC FMB UNESP, no momento do diagnóstico. Dessa amostra, será utilizado 4 mL para exames mais específicos para confirmar a infecção por *Toxoplasma* (PCR).

Durante a realização da coleta de sangue, o risco que senhor (a) corre será a dor da picada da agulha e uma mancha roxa que desaparecerá bem rapidamente. Quando for necessário do ponto de vista médico (diagnóstico de Neurotoxoplasmose), também iremos coletar LCR, que será realizada pela técnica de punção lombar. Nesse procedimento, pode ocorrer dor no local durante a punção lombar que será minimizado por meio de anestesia, e você

terá como benefício de uma avaliação mais específica para o diagnóstico da neurotoxoplasmose que ainda não está incorporada na rotina do SUS, recebendo posteriormente o tratamento específico de acordo com o resultado.

Os objetivos do estudo são avaliar a prevalência de exposição e a presença de doença ativa por *Toxoplasma gondii* em pacientes vivendo com HIV/Aids, e comparar os resultados da análise do sangue, soro e líquido pelas três métodos: RIFI, Quimioluminescência e PCR e determinar qual será o mais eficiente para diagnosticar a doença.

Tendo em vista que a toxoplasmose é uma das enfermidades oportunistas mais comuns em pessoas vivendo com HIV/Aids, causando sérios danos ao organismo, dentre eles alterações neurológicas. Sendo assim, torna-se imprescindível o levantamento de dados epidemiológicos referentes à infecção pelo *T. gondii*, principalmente, em relação ao impacto para saúde pública.

Informamos que o material biológico colhido do Senhor (a), não será utilizado em sua totalidade e parte dele será armazenada no Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu. Após a finalização da pesquisa, o material será devidamente descartado. Para reutilização desse material será escrito um novo projeto de pesquisa, com um novo termo de consentimento para que o Senhor (a) assine nova autorização para utilização desse material.

Solicitamos seu consentimento para consultar seu prontuário médico para coletar outras informações lá contidas como, nome completo, endereço, telefone, documento de identidade e data de nascimento e resultados de exames, referentes a consultas feitas anteriormente pelo (a) senhor (a). Também solicitamos sua autorização para apresentar os resultados deste estudo em eventos da área de saúde e publicar em revista científica nacional e/ou internacional. Por ocasião da publicação dos resultados, seu nome será mantido em sigilo absoluto.

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será elaborado em 2 vias de igual teor, o qual 1 via será entregue ao senhor (a) devidamente rubricada, e a outra via será arquivada e mantida pelos pesquisadores por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Contato com os Pesquisadores Responsáveis:

Caso necessite de maiores informações sobre o presente estudo, favor ligar para os pesquisadores: Mariana Zanchetta e Gava. Telefone: (27) 997953421. Endereço: Rua Prof. Dr. Walter Mauricio Correa, s/n, 18618-681 - Botucatu, SP. E-mail: marianazgava@gmail.com.

Prof. Dr. Alexandre Naime Barbosa. Telefone: (14) 38801282. Endereço: Avenida Professor Mário Rubens Guimarães Montenegro, s/n, 18618687 - Botucatu, SP. E-mail: barbosa.an@ymail.com.

Prof. Dr. Hélio Langoni. Telefone: (14) 38116270. Endereço: Rua Prof. Dr. Walter Mauricio Correa, s/n, 18618-681 - Botucatu, SP. E-mail: helio.langoni@unesp.br

Qualquer dúvida adicional você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa através dos telefones (14) 3880-1608 ou 3880-1609 que funciona de 2ª a 6ª feira das 8:00 às 12.00 e das 13.30 às 17horas, na Chácara Butignolli s/nº em Rubião Júnior – Botucatu - São Paulo. Os dados de localização dos pesquisadores estão abaixo descritos:

Esclarecemos que sua participação no estudo é voluntária e, portanto, o (a) senhor(a) não é obrigado(a) a fornecer as informações e/ou colaborar com as atividades solicitadas pelos pesquisadores citados anteriormente. Caso decida não participar do estudo, ou resolver a qualquer momento desistir do mesmo, não sofrerá nenhum dano, nem haverá modificação na assistência que vem recebendo na Instituição. Os pesquisadores estarão a sua disposição para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa.

Assinatura da pesquisadora responsável

Considerando, que fui informado (a) dos objetivos e da relevância do estudo proposto, de como será minha participação, dos procedimentos e riscos decorrentes deste estudo, declaro o meu consentimento em participar da pesquisa de forma voluntária, estando ciente que todos os meus dados estarão resguardados através do sigilo que os pesquisadores se comprometeram. Estou ciente que os resultados desse estudo poderão ser publicados e revistas científicas.

Botucatu, ____ de _____ de _____

Assinatura do participante ou responsável legal