



**Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto**  
**Programa de Pós-graduação em Ciências da**  
**Saúde**

---

Fabiana Nakashima

**Investigação Sorológica e Molecular de**  
***Toxoplasma gondii* em Doadores de Sangue**

São José do Rio Preto  
2015

Fabiana Nakashima

Investigação Sorológica e Molecular de  
*Toxoplasma gondii* em Doadores de Sangue

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina de São José do Rio Preto  
para obtenção do Título de Doutor no  
Curso de Pós-Graduação em Ciências  
da Saúde, Eixo Temático: Medicina e  
Ciências Correlatas.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos

São José do Rio Preto  
2015

Nakashima, Fabiana

Investigação sorológica e molecular de *Toxoplasma gondii* em doadores de sangue / Fabiana Nakashima

São José do Rio Preto, 2015

118 p.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos

1. *Toxoplasma gondii*; 2. Toxoplasmose; 3. Técnicas de Diagnóstico Molecular; 4. Sorologia.

Fabiana Nakashima

Investigação Sorológica e Molecular de  
*Toxoplasma gondii* em Doadores de Sangue

BANCA EXAMINADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos

2º Examinador: Profa. Dra. Lilian Castiglioni

3º Examinador: Prof. Dr. Octávio Ricci Junior

4º Examinador: Profa. Dra. Ana Iara Costa Ferreira

5º Examinador: Profa. Dra. Natália Martin

Suplentes: Prof. Dr. Cícero Meneguette

Profa. Dra. Ana Livia Galbiattii Dias

São José do Rio Preto, 14/12/2015.

## SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimentos .....	ii
Epígrafe .....	v
Lista de Figuras.....	vi
Lista de Tabelas.....	vii
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	viii
Resumo.....	x
Abstract.....	xii
1.Introdução .....	1
1.1 <i>Toxoplasma gondii</i> .....	2
1.2 Infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> e Toxoplasmose humana .....	5
1.3 Diagnóstico de infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> .....	7
1.4 Transfusão de sangue .....	8
1.5 Transmissão do <i>Toxoplasma gondii</i> via transfusional.....	10
1.6 Objetivo geral .....	11
1.7 Objetivos específicos .....	11
2. Resultados .....	12
2.1 Manuscrito 1.....	15
2.2 Manuscrito 2.....	35
2.3 Manuscrito 3.....	60
3 Conclusões .....	82
4. Referências da Introdução .....	84

5. Anexos .....	93
Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa .....	94
Anexo 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido .....	95
Anexo 3 – Ficha de dados Epidemiológicos .....	97



*Dedicatória*

*Dedico este trabalho aos meus pais; Etsuo Nakashima e Maria  
Célia Narciso, aos irmãos; Fabio Nakashima e Fabrícia  
Nakashima, e também à minha filha Ana Lara Nakashima.*

*Obrigada!*



## *Agradecimentos*

Desejo expressar os meus sinceros agradecimentos:

A Deus,

À Diretoria Geral da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, FAMERP, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde,

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pela bolsa e o auxílio concedidos (processos: 2012/07750-2 e 2012/07716-9),

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos; pela orientação, paciência, ensinamentos e oportunidade,

À Professora Dra. Cinara de Cássia Brandão de Mattos; pelos ensinamentos e paciência,

À Dra. Hilda Pena pelo apoio e ensinamentos,

Ao Diretor Dr. Octávio Ricci Junior e aos funcionários e a Hemocentro de São José do Rio Preto pelo apoio durante a seleção e coleta do material biológico dos participantes desta pesquisa,

Aos doadores de sangue que participaram desta pesquisa,

Aos Docentes e funcionários do Departamento de Biologia Molecular da FAMERP, pelo apoio e solidariedade,

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, por todos os esclarecimentos e suporte,

Aos membros da banca de qualificação e defesa pelas considerações,

Aos amigos do Laboratório de Imunogenética da FAMERP: Marcio, Cássia, Ana Vitória, Amanda, Christiane, Fernando, Karina, Mariana, Ulisses, Valquíria, Natália, Mirele, Alessandro, Vinicius, Luiz, Ricardo, Cidinha e Regina pelos ensinamentos, colaboração, amizade, carinho, confiança e respeito,

À minha amiga Ana lara por toda paciência, ensinamentos, companheirismo e amizade; "Você é, e sempre será muito importante para nós!",

À minha família que sempre me apoiou e incentivou em momentos difíceis,

À minha irmã pela paciência e amor. "Te amo, Fabrícia!",

À minha tia Gilselena que me apoiou em todos os momentos difíceis desta trajetória,

Aos docentes, funcionários e alunos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia na USP de São Paulo,

Aos amigos Solange, Herbert e Marcos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia na USP de São Paulo que me acolheram e me apoiaram em momentos difíceis,

Enfim, a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para o desenvolvimento deste trabalho. **Muito Obrigada!**

*Epígrafe*

*Eu tentei 99 vezes e falhei, mas na centésima tentativa eu consegui,  
nunca desista de seus objetivos mesmo que esses pareçam  
impossíveis, a próxima tentativa pode ser a vitoriosa.*

*Albert Einstein*

**Lista de Figuras**

Figura 1. Estrutura do <i>Toxoplasma gondii</i> .....	2
Figura 2. Estágios evolutivos do <i>Toxoplasma gondii</i> . .....	3
Figura 3. Ciclo biológico do <i>Toxoplasma gondii</i> .....	5
Figura 4. Perfil eletroforético da cPCR referente ao gene <i>B1</i> do <i>Toxoplasma gondii</i> . .....	55
Figura 5. Perfil eletroforético da Nested PCR referente ao gene <i>B1</i> do <i>Toxoplasma gondii</i> . .....	56
Figura 6. Perfil eletroforético da Nested PCR realizada para amplificar o marcador GRA6 do <i>Toxoplasma gondii</i> . .....	57
Figura 7. Gráfico de amplificação por qPCR. ....	58

**Lista de Tabelas**

Tabela 1. Dados epidemiológicos dos 750 doadores aptos à doação de sangue selecionados do Hemocentro de São José do Rio Preto-SP .....	32
Tabela 2. Análise univariável entre as variáveis de risco e o resultado sorológico reagente e não reagente para anticorpos anti- <i>T. gondii</i> da classe IgG .....	33
Tabela 3. Características da casuística e resultados sorológicos para pesquisa de anticorpos anti- <i>T. gondii</i> das classes IgM e IgG .....	53
Tabela 4. Resultados das análises moleculares das 362 amostras com evidências sorológicas de infecção.....	54
Tabela 5. Resultados da sorologia, qPCR e genotipagem das 34 amostras Nested positiva para o gene <i>B1</i> do <i>T. gondii</i> .....	79
Tabela 6. Resultados das análises moleculares e sorológicas das amostras de receptores que foram transfundidos por hemocomponentes com suspeitas de parasitemia .....	80
Tabela 7. Avaliação dos quatros casos de receptores que receberam hemocomponentes com resultado Nested PCR positivo .....	81

**Lista de Abreviaturas e Símbolos**

$\bar{x}$	Média de idade
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
µl	Microlitro
µm	Micrômetro
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
cPCR	Reação em Cadeia da Polimerase convencional
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
FUNFARME	Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José Rio Preto
<i>FUT2</i>	Gene Secretor
HCV	Vírus da Hepatite C
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HTLV	Vírus T-linfotrópico Humano
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDT	<i>Integrated DNA Technologies</i>

IFI	Imunofluorescência indireta
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgM	Imunoglobulina da classe M
M	Marcador de pares de base
N	Número
nPCR	Reação em Cadeia da Polimerase tipo Nested
P	Valor de p
Pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCR-RFLP	Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição
PS	Perfil Sorológico
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa ou tempo real
RNAse	Enzima que degrada RNA
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência adquirida
SP	São Paulo
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
USP	Universidade de São Paulo
X	Veze
X <sup>2</sup>	Qui-quadrado



## Resumo

**Introdução:** *Toxoplasma gondii*, causador da toxoplasmose, é um protozoário intracelular que apresenta várias vias de transmissão, dentre elas a transfusional. **Objetivo:** Investigar por métodos sorológicos e moleculares, a infecção por *T. gondii* em doadores de sangue para avaliar o risco de transmissão via transfusional. **Casuística e métodos:** Foram selecionados 750 indivíduos aptos à doação de sangue. Estes indivíduos foram submetidos a uma entrevista sobre seus hábitos de vida e a uma coleta de sangue periférico. Com o ensaio imunoenzimático (ELISA) foi investigada a presença de anticorpos anti-*T. gondii* das classes IgM e IgG, e por Nested PCR e qPCR a parasitemia. As amostras positivas nos métodos moleculares foram submetidas à genotipagem pelo método Multilocus Nested PCR RFLP. Os doadores com resultados moleculares positivos e sorologias não reagentes foram reconvocados para investigar a soroconversão por ELISA e imunofluorescência indireta (IFI). Além destes, os receptores dos hemocomponentes com suspeita molecular de parasitemia foram rastreados. Destes, foram separadas alíquotas de sangue periférico, antes da transfusão e após a transfusão ( $\pm 20$  dias), as quais também foram analisadas pelos métodos sorológicos (ELISA e IFI) e moleculares (Nested PCR, qPCR e Multiplex Nested PCR RFLP). **Resultados:** Trezentos e cinquenta e sete (47,6%) doadores apresentaram resultado reagente e 393 (52,4%) apresentaram resultado não reagente para a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* da classe IgG. Vinte e sete (3,6%) apresentaram resultado reagente para IgM e 723 (96,4%) não reagente. As variáveis

associadas a infecção por *T. gondii* foram: média de idade avançada ( $P < 0,0001$ ), consumo de leite cru ( $P = 0,001$ ), consumo de carne crua e mal passada de bovino e suíno ( $P = 0,003$ ), residir na zona rural ( $P = 0,004$ ), presença frequente de vetores mecânicos na residência (barata, rato e mosca  $P = 0,02$ ; ratos,  $P = 0,03$ ), menor grau de escolaridade (1º grau incompleto,  $P < 0,0001$  e 1º grau completo,  $P = 0,002$ ) e a baixa renda familiar ( $P = 0,002$ ). Nenhuma amostra foi positiva pela qPCR, mas 40 (11%) apresentaram resultado positivo pela Nested PCR e sorologia reagente. Entretanto, estas amostras ao serem submetidas a genotipagem, não apresentaram amplificações. Os quatro casos rastreados também não apresentaram resultados positivos nas análises moleculares e nenhum doador reconvocado apresentou soroconversão. **Conclusão:** Concluimos que a população de doadores de sangue estudada está exposta a vários fatores de riscos associados a infecção por *T. gondii* e, é provável que a elevada frequência de anticorpos anti-*T. gondii* da classe IgG encontrada neste trabalho esteja relacionada a esta exposição. Os resultados demonstram que não há evidências moleculares de parasitemia nos doadores estudados, portanto o risco de transmissão desta infecção via transfusional é baixo ou nulo para esta região. Além disto, o insucesso da genotipagem e a não ocorrência de soroconversão dos doadores reanalisados sugerem que a positividade, encontrada em algumas amostras analisadas por Nested PCR, tratavam-se de resultados falso-positivos.

**Palavras-chave:** *Toxoplasma gondii*, Toxoplasmose, Técnicas de Diagnóstico Moleculares, Sorologia.

## Abstract

**Introduction:** *Toxoplasma gondii*, which causes toxoplasmosis, is an intracellular protozoan that has several transmission routes, among them the transfusion. **Objective:** To investigate by serological and molecular methods the *T. gondii* infection in blood donors to assess the risk of transmission via transfusion. **Methods:** We selected 750 individuals able to donate blood. These individuals were submitted to an interview about their lifestyle habits and a collection of peripheral blood. The immunosorbent assay (ELISA) was used to investigate the presence of anti-*T. gondii* IgM and IgG classes, and the Nested PCR and qPCR, the parasitaemia. Positive samples in the molecular methods were submitted for genotyping by the Multilocus Nested PCR RFLP method. Donors with positive molecular result and no positive serology were recalled to investigate seroconversion by ELISA and Indirect Immunofluorescence (IIF). In addition, recipients of blood components with molecular suspected parasitemia were screened. Of these, aliquots were separated from peripheral blood prior to transfusion and after transfusion ( $\pm$  20 days), which were also analyzed by serological methods (ELISA and IIF) and molecular (PCR, qPCR Multiplex nested PCR and RFLP). **Results:** Three hundred and fifty-seven (47.6%) donors had positive result and 393 (52.4%) showed no positive result for the presence of anti-*T. gondii* IgG class. Twenty-seven (3,6%) showed positive result for IgM and 723 (96.4%) non-reactive. The variables associated with infection by *T. gondii* were: advanced age ( $P < 0.0001$ ), consumption of raw milk ( $P = 0.001$ ), consumption of raw and underare beef and pork meat ( $P = 0.003$ ), to reside in the countryside ( $P = 0.004$ ), frequent presence of

mechanical vectors in the residence (cockroach, mouse and fly  $P = 0.02$ ; mice,  $P = 0.03$ ), lower education (1st grade incomplete,  $P < 0.0001$  and 1<sup>st</sup> grade complete,  $P = 0.002$ ) and low family income ( $P = 0.002$ ). No sample was positive by qPCR, but 40 (11%) were positive by Nested PCR and positive serology. However, these samples did not show amplification when undergoing to genotyping. The four cases screened did not show positive results to molecular analysis and no recalled donor presented seroconversion.

**Conclusion:** We concluded that the studied population of blood donors is exposed to various risk factors associated with infection by *T. gondii*, and it is likely that the high frequency of anti-*T. gondii* IgG class found in this study is related to this exposure. The results show that there is no molecular evidence of parasitaemia in the studied donors, thus the risk of transmission of this infection via blood transfusion is low or zero in this region. In addition, the failure of genotyping and the non-occurrence of seroconversion of reanalyzed donors suggest that the positivity found in some samples analyzed by Nested PCR, were related to false-positive results.

**Keywords:** *Toxoplasma gondii*, Toxoplasmosis, Technical Molecular Diagnostics, Serology.



# *1. Introdução*

---

### 1.1 *Toxoplasma gondii*

*Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), causador da toxoplasmose, foi descrito, pela primeira vez, em 1908 por Splendore no Brasil e pelos pesquisadores Nicolle e Manceaux no Norte da África.<sup>(1,2)</sup> Trata-se de um protozoário, intracelular obrigatório que possui estágios evolutivos em forma de arco, a qual foi responsável pela atribuição do nome *Toxoplasma*.<sup>(2)</sup>

*T. gondii* é um parasito oportunista que pertence ao filo Apicomplexa.<sup>(3)</sup> É um organismo eucarionte composto pelas seguintes estruturas: conóide, micronemas, roptrias, acidocalcisome, membrana interna, aparelho de Golgi, vacúolos, núcleo, mitocôndria, complexo basal, retículo endoplasmático, grânulos densos, apicoplasma e endossomo,<sup>(4)</sup> como ilustrado na figura 1.

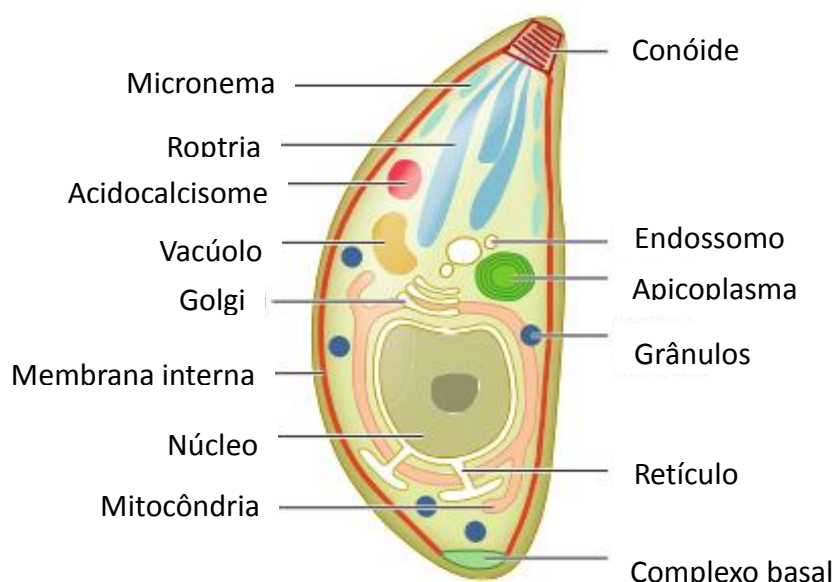


Figura 1. Estrutura do *T. gondii* Adaptado de Blader e colaboradores (2015).<sup>(4)</sup>

Este protozoário apresenta os estágios evolutivos oocisto esporulado, taquizoíto e cisto de bradizoíto como formas infectantes para o homem (Figura 2).<sup>(5)</sup>

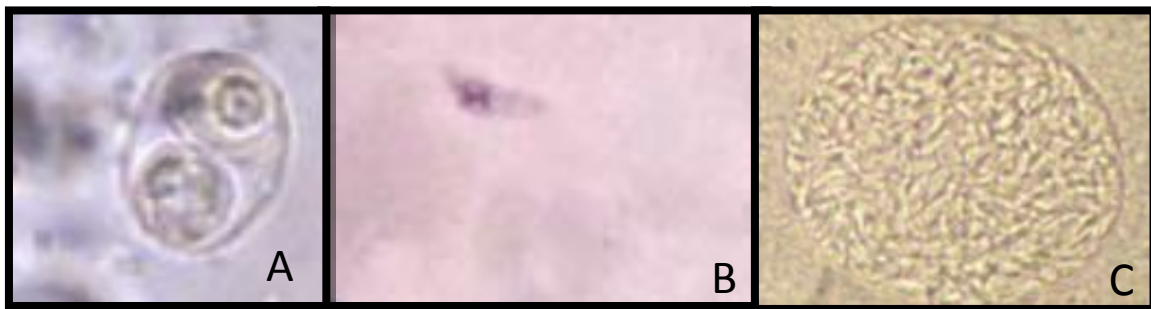


Figura 2. Estágios evolutivos do *T. gondii*. A letra A corresponde ao estágio de oocisto; a letra B ao estágio de taquizoíto; a letra C ao estágio de cisto de bradizoíto. Adaptado de Robert-Gangneux e Dardé (2012).<sup>(5)</sup>

Os oocistos apresentam morfologia elipsoides, possuem aproximadamente 13 micrômetro ( $\mu\text{m}$ ) de diâmetro e são formados por duas camadas incolores. No seu interior contém dois esporocistos com quatro esporozoítos e são encontrados no meio ambiente (Figura 2A).<sup>(6)</sup> O taquizoíto é o estágio evolutivo que apresenta rápida multiplicação. Exibi morfologia em arco, sendo a região anterior pontiaguda e a região posterior arredondada. Mede em torno de 6  $\mu\text{m}$  de diâmetros e são encontrados temporariamente livres em líquidos corpóreos (Figura 2B).<sup>(6,7)</sup> Os bradizoítos são encontrados dentro de cistos teciduais. Apresentam reprodução lenta por endodiogenia e difere ligeiramente dos taquizoítos. Dentre as diferenças encontradas estão: a posição nuclear na região posterior e a resistência às ações proteolíticas das enzimas (Figura 2C).<sup>(6)</sup>

O ciclo do *T.gondii* é do tipo heteroxeno, tendo os felinos como hospedeiro definitivo e vários mamíferos e aves como hospedeiro intermediário



(Figura 3).<sup>(6,8)</sup> O hospedeiro definitivo é infectado, principalmente, por ingestão de cisto de bradizoítos, os quais podem ser encontrados em tecidos de hospedeiros intermediários. Após a contaminação, os parasitos invadem os enterócitos e se multiplicam, assexuadamente, para formação de merozoítos, os quais sofrem diferenciações para os gametas masculinos e femininos. Estes são responsáveis pela reprodução sexuada. Após a fecundação dos gametas, ocorre a formação dos oocistos não esporulados, os quais são liberados juntamente com as fezes do animal. No meio ambiente, em condições favoráveis, os oocistos sofrem esporulação com formação de dois esporocistos com quatro esporozoítos cada.<sup>(5)</sup>

Os hospedeiros intermediários são infectados ao ingerirem estes oocistos esporulados. Os esporozoítos são liberados dos oocistos e os mesmos penetram nas células do epitélio intestinal, onde sofrem diferenciação em taquizoítos. Estes, replicam-se rapidamente por endodiogenia, rompem a célula hospedeira e disseminam pelos sistemas do hospedeiro infectado. Com o desenvolvimento das respostas imunológicas, os taquizoítos diferenciam-se em bradizoítos dentro de cistos teciduais e podem permanecer viáveis por longos períodos sem causar danos aparentes ao hospedeiro infectado.<sup>(9)</sup>

O ser humano pode ser infectado pelas vias vertical ou pós natal. A transmissão pela via vertical ocorre, principalmente, quando a mãe adquire a primo-infecção durante o período gestacional, ou quando passa por períodos de reagudização.<sup>(10)</sup> A transmissão via pós natal ocorre, geralmente, por meio da ingestão de alimentos ou água contaminada com os oocistos esporulados, ou pelo consumo de carne crua ou mal passada de animais com cistos de

bradizoítos.<sup>(5)</sup> Além destas possibilidades, há a transmissão via transplante de órgãos sólidos<sup>(10)</sup> e por transfusão de hemocomponentes.<sup>(11,12)</sup>

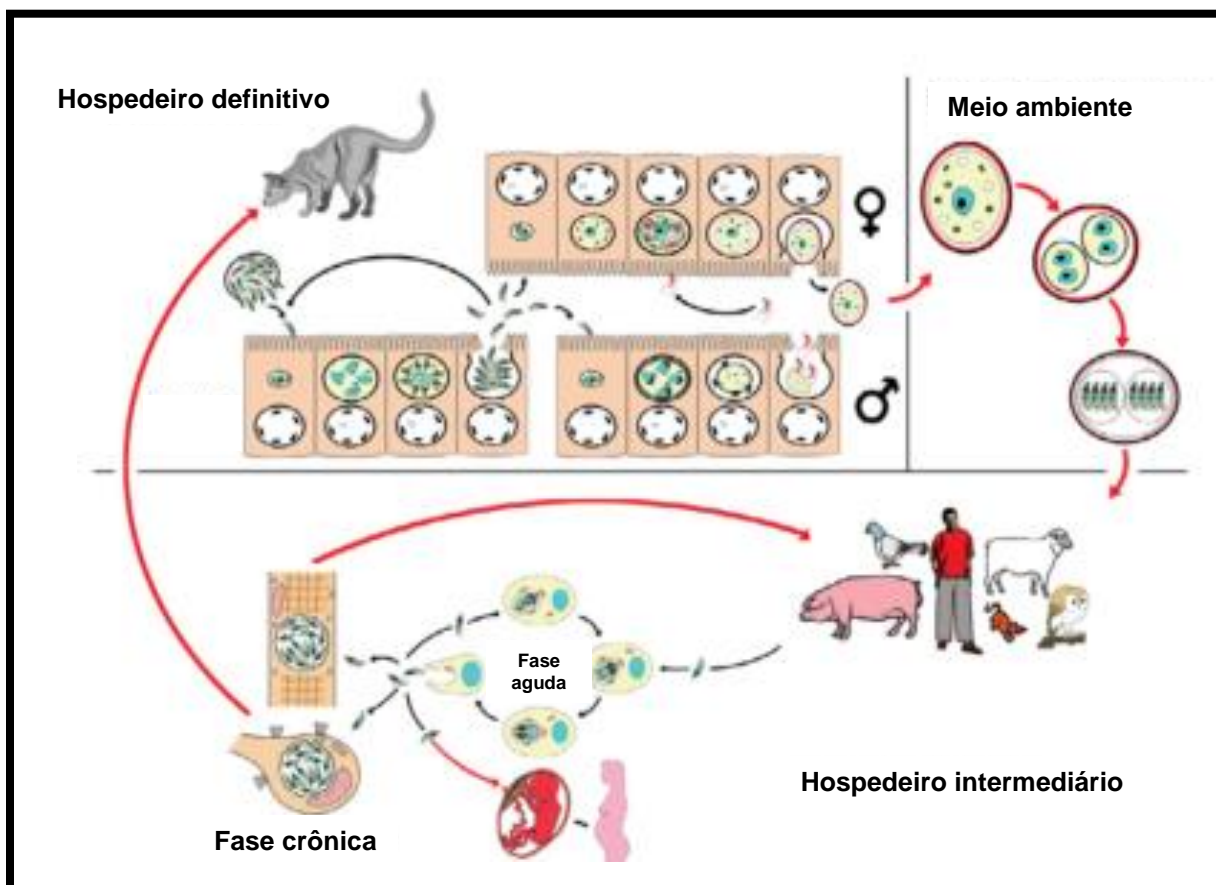


Figura 3. Ciclo biológico do *T. gondii* adaptado de Ferguson (2009).<sup>(9)</sup>

## 1.2 Infecção por *T. gondii* e Toxoplasmose humana

A infecção por *T. gondii* é mundialmente disseminada e a soroprevalência varia entre os países e dentro do mesmo país.<sup>(5)</sup> Estima-se que a prevalência de infecção por *T. gondii* no Brasil seja elevada, chegando a atingir 50% de crianças do ensino fundamental, e entre 50 a 80% das mulheres com idade fértil.<sup>(13)</sup> Com relação a população de doadores de sangue, Vaz e colaboradores (2008)<sup>(14)</sup> encontraram 60% de resultados reagentes para

anticorpos anti-*T. gondii* da classe IgG no Paraná, e Coêlho e colaboradores (2003)<sup>(15)</sup> encontraram 75% para os doadores do Recife.

Por se tratar de um parasito oportunista, capaz de infectar vários tipos celulares, as manifestações clínicas da toxoplasmose são diversas, dependem do local afetado e do estado imunológico do hospedeiro.<sup>(10)</sup> Os primeiros casos da toxoplasmose humana foram descritos por Jankû (1923) e Torres (1927). Tais pesquisadores relataram casos em crianças com complicações neurológicas.<sup>(16)</sup> No início da década de 40, foram relatados os primeiros casos de toxoplasmose em adultos sem alterações neurológicas. Em 1940, Pinkerton e Weinman relataram o encontro de *Toxoplasma* em biopsias de um jovem de 22 anos e em 1941, Pinkerton e Henderson conseguiram isolar de dois adultos com pneumonia atípica o *T. gondii* nos tecidos.<sup>(16)</sup>

A infecção em imunocompetentes, normalmente, é assintomática na maioria dos casos e raramente necessita de tratamento.<sup>(10)</sup> As manifestações mais frequentes são inespecíficas como linfadenopatia cervical, febre, fadiga, dores musculares, dor de garganta e dor de cabeça.<sup>(17)</sup> Complicações como miocardite, pneumonia, hepatite e encefalite podem surgir, mas não é comum.<sup>(10)</sup>

Nos indivíduos imunocomprometidos a doença pode ser grave e levar o indivíduo ao óbito. Estima-se que 10% dos pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) nos Estados Unidos e 30% na Europa morrem de toxoplasmose.<sup>(17)</sup> De acordo com os estudos de Passos e colaboradores,<sup>(18)</sup> a taxa de mortalidade por toxoplasmose nos anos de 1988 e 1991 foi de 25,4% nos pacientes com SIDA do Estado de São Paulo.

Além destes, as gestantes também constituem um grupo importante devido ao risco da transmissão vertical. Os fetos podem apresentar complicações como hidrocefalia, microcefalia, calcificação intracraniana, retinocoroidite, retardo mental, entre outros.<sup>(8)</sup>

### 1.3 Diagnóstico da infecção por *T. gondii*

O diagnóstico da infecção por *T. gondii* pode ser realizado por métodos indiretos e diretos. Os métodos indiretos, os quais baseiam-se na detecção de anticorpos específicos, são rotineiramente utilizados.<sup>(5,19,20)</sup> O emprego destes métodos permitem determinar o processo infeccioso e inferirem nas fases da doença (aguda e crônica) por meio da detecção das diferentes classes de anticorpos. Usualmente, utiliza-se a imunoglobulina da classe IgM como marcador de infecção recente/aguda e IgG para infecção crônica.<sup>(19-21)</sup> Em casos duvidosos, a verificação da soroconversão ou a presença de elevada concentração de anticorpos da classe IgG também são estratégias utilizadas para identificar a fase aguda da infecção.<sup>(20)</sup>

Embora existam várias vantagens dos métodos indiretos, alguns fatores como a sensibilidade, a permanência da IgM por longos períodos na circulação e o estado imunológico do hospedeiro, podem influenciar nos resultados destas análises.<sup>(5,13,20-24)</sup> Diante destas dificuldades, os métodos diretos, cujos quais baseiam-se na identificação do parasito ou de seu material genético, vem sendo utilizados para determinarem, com mais precisão e rapidez, os estágios recentes da infecção.<sup>(25,26)</sup>

Os métodos moleculares são amplamente empregados para ajudarem a detectar fase recente de infecção.<sup>(27,28)</sup> Há relatos que estes métodos são capazes de detectar o *T. gondii* em sangue periférico antes da circulação dos anticorpos, <sup>(25,29,30)</sup> o que demonstra a sua elevada sensibilidade quando comparada aos métodos sorológicos.

## 1.4 Transfusão de sangue

O processo de transferência de hemocomponentes de um indivíduo (doador) para outro indivíduo (receptor) é denominado transfusão de sangue.<sup>(31)</sup> Este processo é empregado na rotina médica para corrigir diversas situações, tais como o tratamento da anemia ferropriva, da anemia megaloblástica, da anemia hemolítica, da anemia auto-imune, etc.<sup>(32)</sup>

Embora haja uma ampla aplicabilidade, a transfusão sanguínea apresenta riscos de transmissão de doenças infecciosas (bacteriana, viral e parasitária).<sup>(33)</sup> Para evitar riscos de contaminação dos receptores de hemocomponentes por microrganismos patogênicos, algumas estratégias são utilizadas durante o processo de seleção do doador. Tais estratégias incluem a seleção clínica e epidemiológica do doador; a triagem sorológica;<sup>(34)</sup> o uso de filtros de leucócitos e a autotransfusão.<sup>(35)</sup>

Além destas, as agências transfusionais brasileiras seguem normas estipuladas pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC); da ANVISA, Nº 1.353 de 2011<sup>(36)</sup> para selecionarem doadores sanguíneos. Nesta Resolução, todos os doadores potenciais de sangue passam por uma seleção inicial, na qual é realizada uma entrevista sobre os hábitos cotidianos. Não devem

apresentar nenhuma enfermidade infecciosa aguda e nenhum antecedente de doença infecciosa transmissíveis pelo sangue.

Após a triagem inicial, é obrigatória a utilização de métodos altamente sensíveis, determinados pela ANVISA para a realização de exames laboratoriais nos testes de hepatite B e C, HIV I e II, Doença de Chagas, Sífilis, HTLV-I e II. A triagem sorológica para malária é obrigatória para regiões endêmicas e a triagem para citomegalovírus somente para indivíduos submetidos a transplante de órgãos e recém-nascidos.<sup>(36)</sup> Embora estas triagens sejam realizadas, existem relatos de transmissão de patógenos após transfusões sanguíneas.<sup>(37)</sup> Entre 1985 a 1997 foram registrados 946 de casos de infecções pelo HIV pós-transfusional em pacientes hemofílicos na Romênia, 13.249 nos Estados Unidos e 2.364 na França.<sup>(37)</sup>

Estes achados podem estar relacionados a infecções em estágio precoce com impossibilidade dos testes de triagem em detectar a presença do patógeno e/ou anticorpos.<sup>(35)</sup> Para aumentar a sensibilidade, a ANVISA<sup>(38)</sup> autorizou a realização de testes de amplificação de ácidos nucleicos para a detecção dos vírus HIV e HCV pelas agências transfusionais brasileiras.

Os métodos de amplificação de ácidos nucleicos empregados no diagnóstico de doenças infecciosas vêm mostrando constante aprimoramento.<sup>(39)</sup> Para a infecção bacteriana por *Mycobacterium tuberculosis* o método de amplificação mostrou 96,9% de sensibilidade e 100% de especificidade,<sup>(40)</sup> para HCV a especificidade encontrada foi de 99% e a capacidade de detecção da viremia 89 – 95%.<sup>(41)</sup>

## 1.5 Transmissão do *T. gondii* via transfusional

Apesar dos avanços dos métodos laboratoriais e o contínuo aprimoramento dos procedimentos envolvidos na transfusão de hemocomponentes, sabe-se que ainda há riscos de transmissão transfusional de doenças infecciosas e parasitárias. Os primeiros casos de possíveis transmissões transfusionais do *T. gondii* foram descritos por Siegel e colaboradores (1971)<sup>(11)</sup> e Nelson e coautores (1989).<sup>(42)</sup> Entretanto, estes estudos investigaram a infecção por este parasito utilizando métodos indiretos destinados à detecção de anticorpos específicos (IgM e IgG), e não a presença do parasito.

Com os avanços dos métodos de biologia molecular, a detecção e caracterização do *T. gondii* em líquidos corpóreos e em tecidos de humanos sintomáticos e de animais laboratoriais vem sendo utilizados com sucesso.<sup>(43-45)</sup> Considerando a possibilidade de detectar e caracterizar o genótipo do parasito em amostras clínicas, por métodos moleculares, este trabalho dedicou-se a investigar a infecção por *T. gondii* em doadores de sangue.

## 1.6 Objetivo geral

Detectar com o uso de métodos sorológicos a infecção por *T. gondii*, bem como caracterizar o genótipo deste protozoário por métodos moleculares em doadores de sangue.

## 1.7 Objetivos específicos

- Determinar a soroprevalência da infecção por *T. gondii* em doadores de sangue da região noroeste paulista.
- Avaliar o risco de transmissão transfusional a partir de doadores de sangue com evidência sorológica para infecção por *T. gondii*, utilizando métodos moleculares.
- Investigar o risco de transmissão transfusional do *T. gondii* utilizando métodos moleculares em amostras de receptores de hemocomponentes com suspeita de parasitemia.



## *2. Resultados*

---

Os resultados deste trabalho estão apresentados na forma de três manuscritos.

### **Manuscrito 1**

**Título:** Soroepidemiologia da infecção por *Toxoplasma gondii* em doadores de sangue

**Autores:** Fabiana Nakashima, Octávio Ricci Júnior, Valquíria Pardo de Sousa, Marcos Paulo Miola, Cinara de Cássia Brandão de Mattos, Luiz Carlos de Mattos.

### **Manuscrito 2**

**Título:** Investigação molecular de *Toxoplasma gondii* em doadores de sangue com evidência sorológica de infecção

**Autores:** Fabiana Nakashima, Octávio Ricci Júnior, Valquíria Pardo de Sousa, Marcos Paulo Miola, Cinara de Cássia Brandão de Mattos, Luiz Carlos de Mattos

### **Manuscrito 3**

**Título:** Avaliação molecular do risco da transmissão via transfusional do *Toxoplasma gondii*

**Autores:** Fabiana Nakashima, Octávio Ricci Júnior, Valquíria Pardo de Sousa, Marcos Paulo Miola, Cinara de Cássia Brandão de Mattos, Luiz Carlos de Mattos

*Manuscript 1*

---

## 2.1 Manuscrito 1

### **Soroepidemiologia da infecção por *Toxoplasma gondii* em doadores de sangue**

Fabiana Nakashima<sup>1</sup>, Octávio Ricci Júnior<sup>2</sup>; Valquíria Pardo de Sousa<sup>1</sup>; Marcos Paulo Miola<sup>1</sup>; Cinara de Cássia Brandão de Mattos<sup>1</sup>, Luiz Carlos de Mattos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Imunogenética da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

<sup>2</sup>Diretor do Hemocentro de São José do Rio Preto - Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto (FUNFARME)

#### **Resumo**

*Toxoplasma gondii* é um protozoário de ampla distribuição mundial causador da toxoplasmose. A prevalência da infecção por este parasito varia entre as diferentes populações e está associada, principalmente, com a exposição dos seres humanos com os fatores de riscos. Este trabalho teve por objetivo investigar a soroepidemiologia da infecção por *T. gondii* entre doadores de sangue. Foram selecionados 750 doadores de sangue do Hemocentro de São José do Rio Preto-SP. Após a obtenção do termo de consentimento, livre e esclarecido, os participantes responderam a um questionário sobre seus hábitos de vida e foram submetidos à coleta de sangue periférico. A presença dos anticorpos anti-*T. gondii* da classe IgG foi determinada pelo método de

ELISA. Trezentos e cinquenta e sete (47,6%) doadores apresentaram resultado reagente e 393 (52,4%) apresentaram resultado não reagente. As variáveis associadas a infecção por *T. gondii* foram: idade ( $P < 0,0001$ ), consumo de leite cru ( $P = 0,001$ ), consumo de carne crua e/ou mal passada de bovino e suíno ( $P = 0,003$ ), residir na zona rural ( $P = 0,004$ ), presença frequente de vetores mecânicos na residência (barata, rato e mosca  $P = 0,02$ ; ratos,  $P = 0,03$ ), menor grau de escolaridade (1º grau incompleto,  $P < 0,0001$  e 1º grau completo,  $P = 0,002$ ) e a baixa renda familiar ( $P = 0,002$ ). Mediante aos dados obtidos, concluímos que a população de doadores de sangue do Hemocentro de São José do Rio Preto está exposta à vários fatores de riscos associados a infecção por *T. gondii* e, sendo assim, é provável que a elevada frequência de anticorpos anti-*T. gondii* da classe IgG encontrada neste trabalho esteja relacionada a esta exposição.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*; doadores de sangue; fatores de risco; epidemiologia.

## **Introdução**

*T. gondii* é um protozoário intracelular obrigatório causador da toxoplasmose.<sup>(1,2)</sup> No homem, a doença é de grande importância clínica devido as severas consequências que podem ser desenvolvidas entre os indivíduos imunocomprometido ou imunossuprimido e fetos.<sup>(3,4)</sup> Estima-se que 10% dos pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) nos Estados Unidos e 30% na Europa morram de toxoplasmose.<sup>(5)</sup> Em São Paulo, o estudo

de Passos e colaboradores (2000)<sup>(6)</sup>, encontrou a taxa de mortalidade por toxoplasmose de 25,4% em pacientes com SIDA. Em fetos, a infecção por *T. gondii* pode ser grave levando ao desenvolvimento da Tétrade de Sabin, que é caracterizada por hidrocefalia, retinocoroidite, calcificações cerebrais, retardo mental ou perturbações neurológicas.<sup>(7)</sup>

A transmissão desta infecção para os seres humano envolve as formas de oocisto esporulado, cisto de bradizoíto e taquizoíto.<sup>(8)</sup> Os oocistos são eliminados juntamente com as fezes dos gatos, as quais podem contaminar alimentos e a água de consumo humano. Os cistos de bradizoítos podem ser encontrados contaminando carnes de consumo humano ou órgãos sólidos utilizados para o transplante. E os taquizoítos podem ser encontrados temporariamente livres em líquidos corpóreos, e portanto podem ser transmitidos via transplacentária em gestantes pelo consumo de leite cru, de animais infectados, ou por transfusão de hemocomponentes contaminados.<sup>(2-4)</sup>

A infecção por *T. gondii* é amplamente disseminada e a soroprevalência varia entre os países e dentro do mesmo país.<sup>(3)</sup> Estima-se que a prevalência de infecção por *T. gondii* no Brasil seja elevada, chegando atingir 50% de crianças do ensino fundamental, e entre 50 a 80% das mulheres com idade fértil.<sup>(4)</sup> Com relação a população de doadores de sangue, Vaz e colaboradores (2008)<sup>(9)</sup> encontraram 60% de resultados reagente para anticorpos anti-*T. gondii* da classe IgG no Paraná e Coêlho e colaboradores encontraram 75% para os doadores do Recife. Segundo Studenicova e colaboradores (2006),<sup>(11)</sup> a prevalência da toxoplasmose na população humana está associada à exposição aos fatores de risco desta população. Portanto, o conhecimento

sobre as possíveis rotas de infecção envolvidas dentro de uma determinada população são de grande importância epidemiológica. Dessa forma, esta pesquisa teve por objetivo determinar a soroprevalência da infecção por *T. gondii* em doadores de sangue da região noroeste paulista.

## **Material e Métodos**

### *Aspecto ético e seleção dos participantes*

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP (parecer 006/2011). Foram selecionados 750 indivíduos aptos a doação de sangue do Hemocentro de São José do Rio Preto-SP. Após a obtenção da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, os participantes responderam um questionário de caráter epidemiológico e foram submetidos à coleta de sangue periférico para a investigação da infecção por *T. gondii* por meio sorológico.

### *Sorologia*

Para investigar a presença de anticorpos específicos anti-*T. gondii* da classe IgG foi utilizado o método de ELISA (DiaSorin, Itália).

### *Dados epidemiológicos investigados*

O questionário respondido pelos participantes incluía dados epidemiológicos básicos como idade, gênero, hábitos alimentares (consumo de leite cru, carne crua ou mal passada, higienização adequada de legumes e

verduras), condições habitacionais (zona em que residem, presença frequente de vetores mecânicos, presença de animais domésticos), condições socioeconômicas (nível de escolaridade e renda familiar) e histórico de transfusão.

### *Análise estatística*

O *software* GraPhPad InStat 3.0 foi utilizado para realizar as análises estatísticas. Para investigar a associação entre a infecção por *T. gondii* e os potenciais fatores de riscos foram realizadas as análises univariáveis utilizando o teste  $X^2$  clássico e o teste T student.

## **Resultados**

### *Participantes*

A relação dos dados epidemiológicos e as frequências de resultados reagentes para a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* para a classe IgG obtidos entre os 750 doadores aptos à doação de sangue encontram-se na tabela 1. A média de idade dos participantes foi de 34,3 (mediana 33; intervalo de 16 a 65 anos). Quinhentos e dez (68%) dos indivíduos selecionados eram do sexo masculino e 240 (32%) eram do sexo feminino. A diferença entre as médias de idade do sexo masculino ( $34.80 \pm 11.60$ ) e feminino ( $32.85 \pm 10.71$ ) foi estatisticamente significativa ( $P = 0,028$ ; teste T-student = 2,21; Grau de liberdade = 748; Intervalo de confiança de 95% = 0.2159-3.696). A faixa etária de 30 à 39 anos foi a mais frequente encontrada entre os doadores de sangue de São José do Rio Preto-SP.



### *Pesquisa de anticorpos específicos anti-*T. gondii**

Em relação a sorologia para a pesquisa dos anticorpos anti-*T. gondii* da classe IgG, 357 (47,6%;  $\bar{x}$  de idade =  $37.1 \pm 10.8$ ) apresentaram resultado reagente e 393 (52,4%;  $\bar{x}$  de idade =  $31.7 \pm 11.6$ ) não reagente. A prevalência de infecção por *T. gondii* encontrada neste trabalho foi de 47,6%.

### *Fatores de risco envolvidos na infecção por *T. gondii**

Foi possível identificar sete variáveis associadas com o resultado sorológico reagente para a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* da classe IgG na população estudada. São elas:  $\bar{x}$  de idade, consumo de leite cru, consumo de carne bovina e suína crua ou mal cozida, zona habitacional, presença de vetores mecânicos, nível de escolaridade e renda familiar, conforme ilustrado na tabela 2.

## **Discussão**

Este trabalho buscou investigar a soroepidemiologia da infecção por *T. gondii* em doadores de sangue da região noroeste paulista. De acordo com os resultados observou-se que a taxa de infecção para a região noroeste paulista entre os doadores de sangue é elevada (47,6%). Este achado é semelhante aos trabalhos realizados com gestantes para a mesma região,<sup>(12-14)</sup> mesmo quando o método de triagem utilizado foi diferente.<sup>(12)</sup>

Ao comparar com outros trabalhos realizados em diferentes partes do mundo, a taxa de infecção, encontrada neste trabalho, é maior do que os

doadores de sangue de Durango-México, Taiwan, Tailândia, de várias regiões Irã, Arábia Saudita, Nova Zelândia, Zona urbana Karnatak da Índia, Eslováquia,<sup>(11,15-24)</sup> mas é menor do que os doadores de Quênia,<sup>(25)</sup> do Paraná no Brasil<sup>(9)</sup> e do Recife no Brasil.<sup>(10)</sup>

Variações relacionadas à taxa de infecção por *T. gondii* são esperadas para as diferentes populações do mundo, pois a disseminação das formas infectantes do parasito é ampla e depende dentre muitos fatores dos hábitos alimentares, dos hábitos culturais, da umidade e temperatura do meio ambiente, da profissão e do método laboratorial utilizado para determinar a infecção.<sup>(15-17,19,21-24)</sup>

Considerando os fatores ambientais, São José do Rio Preto fica localizada no sudeste do Brasil, na região noroeste do estado de São Paulo (IBGE, <http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=354980&search=sao-paulo%7Csao-jose-do-rio-preto>) e apresenta o clima tropical (CEPAGRI, [http://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima\\_muni\\_559.html](http://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima_muni_559.html)), o que favorece a sobrevivência de oocistos no meio ambiente,<sup>(3)</sup> aumentando as chances do contato destas formas do parasito com novos hospedeiros.

Para os doadores pesquisados neste trabalho, o hábito de consumir carne bovina e suína mal passada ou crua demonstrou associação com a soropositividade para a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* da classe IgG. Este achado indica que a infecção por cistos de bradizoítos ocorre entre os doadores de sangue da região noroeste paulista, sendo assim, uma importante via de transmissão. A associação do consumo de carne crua com a infecção

por *T. gondii* também foi encontrada entre os doadores de sangue de Taiwan (porco), Eslováquia e Egito.<sup>(11,16,26)</sup> Em contraste, Alvarado-Esquivel e colaboradores (2007),<sup>(15)</sup> que encontraram baixa frequência de infecção entre os doadores de sangue do México (7,4%), não encontraram esta associação, o que ajuda a reforçar a compreensão de que, realmente, os hábitos alimentares estão envolvidos na prevalência de infecção deste protozoário em diferentes regiões do mundo.

Este trabalho identificou o consumo de leite cru como potencial fator de risco para infecção por *T. gondii* entre os doadores de sangue da região noroeste paulista. Os resultados obtidos apontam para a possível associação entre o resultado positivo para pesquisa de anticorpos da classe IgG e o consumo de leite cru. Portanto, este achado sugere que a infecção por taquizoítos também ocorre entre os doadores de sangue desta região. Considerando que a presença desta forma infectante no leite de vários hospedeiros intermediários já foi detectada,<sup>(27)</sup> pode-se inferir que se trata de uma rota importante de transmissão entre os doadores da região noroeste paulista.

Foi possível observar também que residir na zona rural está associado à infecção por *T. gondii* entre os doadores pesquisados neste trabalho. Esta associação também foi encontrada entre os doadores do Irã<sup>(17)</sup> e do Iraque.<sup>(28)</sup> De acordo com Suhad e colaboradores (2013)<sup>(28)</sup> a pavimentação da zona urbana contribui para a redução da sobrevivência dos oocistos no meio ambiente e, assim, resulta na diminuição da exposição da população desta forma infectante eliminada pelas fezes dos gatos. Como o clima da região noroeste paulista

favorece a sobrevivência do oocisto no meio ambiente, residir em zona rural, a qual é constituída em grande parte por solo sem pavimento, pode contribuir com o aumento da frequência de infecção devida a maior exposição ao ambiente contaminado por oocistos. Em contraste aos nossos resultados, o estudo Studenicova e colaboradores (2006)<sup>(11)</sup> não encontrou esta associação com os doadores da Eslováquia.

Neste trabalho, observou-se que a presença frequente de vetores mecânicos (baratas, moscas e ratos) na residência está associada com o resultado reagente para infecção por *T. gondii*. Sabe-se que os vetores barata e rato frequentam ambientes que podem estar contaminados com fezes de gatos com oocistos e, conseqüentemente, carregam os oocistos em seus tegumentos para dentro da casa do hospedeiro humano, aumentando assim, as chances de infecção. Já as moscas, podem veicular os oocistos em suas patas após pousarem em superfícies contaminadas e posteriormente pousar em alimentos de consumo cru, como por exemplo; as frutas. Dessa maneira, aumenta as chances de contato do ser humano com esta forma infectante do protozoário.

Embora os resultados tenham sugerido que a transmissão por oocisto ocorra entre os doadores pesquisados, neste trabalho não foi observada associação entre a presença do gato como animal doméstico com a sorologia reagente para anticorpos anti-*T. gondii* da classe IgG. É possível que os cuidados higiênicos adotados pelos proprietários destes animais estejam contribuindo com a redução do contato com as fezes contaminadas. Todavia, as fezes contaminadas liberadas livres no meio ambiente podem ser

encaminhadas para dentro da casa dos hospedeiros humanos por vetores mecânicos e, por isso, esta via de transmissão continua sendo importante entre os doadores de sangue da região noroeste paulista.

Concordando com os resultados obtidos neste trabalho, Zarkovic e colaboradores (2007)<sup>(24)</sup> também não encontraram associação com a presença de gato entre os doadores da Nova Zelândia, mas encontraram com a presença do cão. O cão também é um hospedeiro intermediário do *T. gondii* e não elimina formas infectantes para o homem, porém este animal pode carregar em suas patas, ou pelos, os oocistos liberados por gatos no meio ambiente para dentro da casa de seus proprietários, elevando assim, as chances de contato destas formas com os hospedeiros humanos.

Com estes achados é possível compreender que as três formas infectantes do protozoário (taquizoítos, cistos de bradizoítos e oocistos esporulados) são de grande importância para a disseminação desta infecção entre os doadores de sangue da região noroeste paulista.

Além disso, o presente trabalho também constatou que a taxa de soropositividade diminui com o aumento do grau de escolaridade, assim como outras publicações já relataram,<sup>(15,16,21,23,26)</sup> e com o aumento da renda familiar que também foi observado no trabalho de Chiang e colaboradores (2012).<sup>(16)</sup> Acreditamos que o maior grau de escolaridade colabore com a diminuição da transmissão por *T. gondii*, pois este fator está associado ao maior nível de conhecimento sobre as principais fontes de contaminação de doenças. Assim, indivíduos com estes conhecimentos melhoram seus hábitos higiênicos, favorecendo a diminuição do contato de formas infectantes deste parasito com

estes indivíduos. Concordando com esta afirmação, Alvarado-Esquivel e colaboradores (2007)<sup>(15)</sup> especularam que o maior grau de escolaridade está relacionado com as boas práticas de higienização sanitária, as quais favorecem a diminuição da disseminação destes parasitos.

Também foi possível observar neste trabalho que a média de idade entre os doadores de sangue com sorologia reagente é maior que os indivíduos com sorologia não reagente. Este resultado também foi encontrado por outros autores que também investigaram este fator com a infecção por *T. gondii*. (11,15,17,19–21,24,28,29) Este achado é compreensivo, pois quanto maior a idade do hospedeiro, maiores as chances de exposição aos fatores de risco associados a esta infecção.

## **Conclusão**

A população de doadores de sangue da região noroeste paulista está exposta às várias fontes de infecção por *T. gondii*. É possível que a elevada frequência, encontrada neste trabalho, esteja relacionada a esta exposição.

## **Agradecimentos**

À FAPESP pelo apoio financeiro (processos: 2012/07750-2 e 2012/07716-9), ao Hemocentro de São José do Rio Preto, aos participantes e à FAMERP.

## **Referências**

1. Dubey JP, Lindsay DS. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites ,

- Bradyzoites , and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. Clin Microbiol Rev. 1998;11(2):267–99.
2. Weiss LM, Dubey J. Toxoplasmosis: a history of clinical observations. Int J Parasitol. 2009;29(6):997–1003.
  3. Robert-Gangneux F, Dardé M-L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. Clin Microbiol Rev. 2012 Apr [cited 2014 Oct 10];25(2):264–96.
  4. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int J Parasitol. 2000;30(12-13):1217–58.
  5. Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: Transmission, diagnosis, and prevention. Clin Microbiol Infect. 2002;8(10):634–40.
  6. Passos LN, De Araújo Filho OF, De Andrade HF. Toxoplasma encephalitis in aids patients in são paulo during 1988 and 1991. A comparative retrospective analysis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2000;42(3):141–5.
  7. Higa LT, Ramos J, Suetake H, Antoniassi P, Mantovan HF, Pelloso MC, et al. Relato de dois casos de toxoplasmose em gestantes atendidas no

- noroeste do Paraná, Brasil. *Sci med*. 2010;20 (1):99–102.
8. Dubey JP. The history of *Toxoplasma gondii* - The first 100 years. *J Eukaryot Microbiol*. 2008;55(6):467–75.
  9. Vaz RS, Guimarães ATB, Bonanato LD, Thomaz-Soccol V. Technical evaluation of serological screening tests for anti-*Toxoplasma gondii* antibodies to prevent unnecessary transfusion risks. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2008;30(4):277–80.
  10. Coêlho RAL, Kobayashi M, Carvalho LB. Prevalence of IgG antibodies specific to *Toxoplasma gondii* among blood donors in Recife, Northeast Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2003;45:229–31.
  11. Studenicova C, Bencaiova G, Holková R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in a healthy population from Slovakia. *Eur J Intern Med*. 2006;17:470–3.
  12. Brandao de Mattos CC, Cintra JR, Ferreira AIC, Spegiorin LCJF, Galisteu KJ, Machado RLD, et al. Lack of association between ABO histo-blood groups, secretor and non-secretor phenotypes, and anti-*Toxoplasma gondii* antibodies among pregnant women from the northwestern region of São Paulo State, Brazil. *Arch Med Sci*. 2008;4(3):254–8.



13. Gonçalves MA., Brandão de Mattos CC, Spegiorin LCJF, Vaz-Oliani DCM, Oliani AH, Mattos LC. Seropositivity rates for toxoplasmosis , rubella , syphilis , cytomegalovirus , hepatitis and HIV among pregnant women receiving care at a Public Health Service , São Paulo State , Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2010;14(6):601–5.
14. Rodrigues A, Uezato S, Vono M, Pandossio T, Spegiorin L, Oliani A, et al. Non-association between anti- *Toxoplasma gondii* antibodies and ABO blood group system. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2011;17(2):184–9.
15. Alvarado-Esquivel C, Mercado-suarez MF, Rodríguez-briones A, Fallad-torres L, Ayala-ayala JO, Nevarez-piedra LJ, et al. Seroepidemiology of infection with *Toxoplasma gondii* in healthy blood donors of Durango, Mexico. *BMC Infect Dis.* 2007;7(75):1–7.
16. Chiang T-Y, Hsieh H-H, Kuo M-C, Chiu K-T, Lin W-C, Fan C-K, et al. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* Infection among Healthy Blood Donors in Taiwan. *PLoS ONE.* 2012. p. e48139.
17. Mahmoudvand H, Dezaki ES, Soleimani S, Reza M, Kheirandish F, Ezatpour B, et al. Seroprevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii*

- infection among healthy blood donors in southeast of Iran. *Parasite Immunol.* 2015;
18. Makki S, AH A-T. Anti-*Toxoplasma gondii* antibodies among volunteer blood donors in eastern Saudi Arabia. *J Egypt Soc Parasitol.* 2010;40(2):401–12.
  19. Modrek MJ. *Toxoplasma gondii* Seroprevalence Among Blood Donors in Zahedan , Southeastern Iran. 2014;(1):1–4.
  20. Pinlaor S, Ieamviteevanich K, Pinlaor P, Maleewong W, Pipitgool V. Seroprevalence of specific total immunoglobulin ( Ig ), IgG and IgM antibodies to *Toxoplasma gondii* in blood donors from Loei Province, Northeast Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Heal.* 2000;31(1):123–7.
  21. Sarkari B, Shafiei R, Zare M, Sohrabpour S, Kasraian L. Seroprevalence and molecular diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection among blood donors in southern Iran. *J Infect Dev Ctries.* 2014;8:543–7.
  22. Sundar P, Mahadevan A, Jayshree RS, Subbakrishna DK, Shankar SK. *Toxoplasma* seroprevalence in healthy voluntary blood donors from urban Karnataka. *Indian J Med.* 2007;(July):50–5.

23. Zainodini N, Zare-Bidaki M A. Molecular and Serological Detection of Acute and Latent Toxoplasmosis Using Real-Time PCR and ELISA Techniques in Blood Donors of Rafsanjan City, Iran, 2013. Iran J Parasitol. 2014;9(3):336–41.
24. Zarkovic A, MacMurray C, Deva N, Ghosh S, Whitley D, Franzco SG. Seropositivity rates for *Bartonella henselae*, *Toxocara canis* and *Toxoplasma gondii* in New Zealand blood donors. Clin Exp Ophthalmol. 2007;35:131–4.
25. Griffin L, Williams K a. B. Serological and parasitological survey of blood donors in Kenya for toxoplasmosis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1983 Jan;77(6):763–6.
26. Elsheikha HM, Azab MS, Abousamra NK, Rahbar MH, Elghannam DM, Raafat D. Seroprevalence of and risk factors for *Toxoplasma gondii* antibodies among asymptomatic blood donors in Egypt. Parasitol Res. 2009;104:1471–6.
27. Tenter, Heckerroth AR, Lm. W. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int J Parasitol. 2000;30(12-13):1217–58.

28. Suhad H. Mahmood, Ban N. AL-Qadhi KHZ. Prevalence of Toxoplasmosis of Males Blood Donors in Baghdad. Iraqi J os Sci. 2013;54(4):832–41.
  
29. Al-Amari O. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* among blood donors in Abha, Asir Region, south-western Saudi Arabia. J Egypt Public Heal Assoc. 1994;69(1-2):77–88.

Tabela 1. Dados epidemiológicos dos 750 doadores aptos à doação de sangue selecionados do Hemocentro de São José do Rio Preto-SP

	Geral		IgG Reagente	
	Número	%	Número	%
Número	750	100	357	47,6
$\bar{x}$ de idade $\pm$ Desvio Padrão	34,3 $\pm$ 11,4		37,1 $\pm$ 10,8	
Faixa etária	Total	%	Número	%
16-17	6	0,8	2	0,6
18-19	71	9,5	13	3,4
20-24	115	15,3	35	9,8
25-29	92	12,3	41	11,5
30-39	229	30,5	120	33,6
40-49	151	20,1	97	27,2
50-59	78	10,4	43	12,0
> 59	8	1,1	6	1,7
Gênero	Total	%	Número	%
Sexo Masculino	510	68,0	254	71,1
Sexo Feminino	240	32,0	103	28,9
Hábitos alimentares	Total	%	Número	%
Consumo de Leite Cru	301	40,1	165	46,2
Consumo de Carne Crua ou mal passada	283	37,7	130	36,4
Higienização adequada dos legumes e verduras	715	95,3	340	95,2
Condições habitacionais	Total	%	Número	%
Zona urbana	714	95,2	331	92,7
Zona rural	36	4,8	26	7,3
Presença de vetores mecânicos na residência	214	28,5	101	28,3
Presença de animal doméstico	678	90,4	322	90,2
Condições socioeconômicas	Total	%	Número	%
Nível de escolaridade				
1º grau completo	68	9,1	45	12,6
1º grau incompleto	118	15,7	77	21,6
2º grau completo	304	40,5	141	39,5
2º grau incompleto	25	3,3	12	3,4
Superior completo	136	18,1	51	14,3
Superior incompleto	97	12,9	29	8,1
Não responderam	2	0,3	2	0,5
Renda familiar				
1 salário	30	4,0	23	6,4
2 salário	116	15,5	64	17,9
3 salários	177	23,6	81	22,7
4 salários	125	16,7	49	13,7
Acima de 4 salários	289	38,5	133	37,3
Não responderam	13	1,7	7	2,0
<b>Histórico de transfusão</b>	<b>33</b>	<b>4,4</b>	<b>21</b>	<b>5,9</b>

Tabela 2. Análise univariável entre as variáveis de risco e o resultado sorológico reagente e não reagente para anticorpos anti-*T. gondii* da classe IgG

Características	IgG Reagente	IgG Não reagente	P*(a)	IC** 95%			
	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$					
$\bar{x}$ de idade	37,1±10,8	31,7±11,6	<0,0001	-7,0 a -3,8			
Mediana	36	30					
Faixa etária							
	Número	%	Número	%	P <sup>(b)</sup>	OD***	IC 95%
18-19	13	18,3	58	81,7	<0,0001	0,2	0,1 a 0,4
20-24	35	30,4	80	69,6	<0,0001	0,4	0,3 a 0,7
40-49	97	64,2	54	35,8	<0,0001	2,3	1,6 a 3,4
Hábitos alimentares							
	Número	%	Número	%	P <sup>(b)</sup>	OD	IC 95%
Consumo de leite cru							
Sim	165	54,8	136	45,2	0,001	1,6	1,2 a 2,2
Não	192	42,8	257	57,2			
Consumo de carne							
Bovino e/ou suíno	20	74,1	7	25,9	0,003	3,8	1,5 a 9,3
Condições habitacionais							
	Número	%	Número	%	P <sup>(b)</sup>	OD	IC 95%
Zona							
Rural	26	72,2	10	27,8	0,004	3,0	1,4 a 6,3
Urbana	331	46,4	383	53,6			
Presença de vetores mecânicos							
Barata/mosca/ratos	13	76,5	4	23,5	0,02	4,0	1,3 a 12,8
Ratos	11	78,6	3	21,4	0,03	4,481	1,2 a 16,6
Condições socioeconômicas							
	Número	%	Número	%	P <sup>(b)</sup>	OD	IC 95%
Renda familiar							
1 salário	23	76,7	7	23,3	0,002	3,8	1,6 a 9,0
4 salários	49	39,2	76	60,8	0,05	0,7	0,4 a 1,0
Nível de escolaridade							
1º grau completo	45	66,2	23	33,8	0,002	2,3	1,4 a 3,9
1º grau incompleto	77	65,2	41	34,7	<0,0001	2,4	1,6 a 3,6
Superior completo	51	37,5	85	62,5	0,01	0,6	0,4 a 0,9
Superior incompleto	29	29,9	68	70,1	0,0003	0,4	0,3 a 0,7

\*P = Valor P determinado pelo testes T de student <sup>(a)</sup> e pelo qui-quadrado <sup>(b)</sup>;  
 \*\*IC = Intervalo de confiança; \*\*\*OD = Odds Ratio

*Manuscrito 2*

---

## 2.2 Manuscrito 2

### **Investigação molecular de *Toxoplasma gondii* em doadores de sangue com evidência sorológica de infecção**

Fabiana Nakashima<sup>1</sup>, Octávio Ricci Júnior<sup>2</sup>; Valquíria Pardo de Sousa<sup>1</sup>; Marcos Paulo Miola<sup>1</sup>; Cinara de Cássia Brandão de Mattos<sup>1</sup>, Luiz Carlos de Mattos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Imunogenética da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

<sup>2</sup>Diretor do Hemocentro de São José do Rio Preto - Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto (FUNFARME)

#### **Resumo**

*T. gondii*, causador da toxoplasmose, é um protozoário de ampla disseminação mundial que pode ser transmitido por várias vias, dentre elas a transfusional. Para avaliar o risco de transmissão deste parasito via transfusão de hemocomponentes, este trabalho buscou investigar, por métodos moleculares, a presença de parasitemia por *T. gondii* em doadores de sangue com evidência sorológica de infecção. Para esta finalidade, foram selecionados 750 indivíduos aptos à doação de sangue do Hemocentro de São José do Rio Preto-SP. A infecção por *T. gondii* foi determinada pelo método ELISA, por meio da pesquisa de anticorpos específicos anti-*T. gondii* das classes IgM e IgG. A determinação da possível parasitemia foi realizada pelos métodos



moleculares Nested PCR e qPCR, tendo como alvo o gene *B1* do parasito. As amostras consideradas positivas na Nested PCR foram submetidas à genotipagem pelo método Multilocus Nested PCR RFLP para os marcadores SAG1, 5'SAG2, 3'SAG2, SAG3, GRA6, BTUB, c22-8, c29-2, L358, PK1, alt-SAG2, APICO e CS3. Das 750 amostras analisadas, 362 (48,3%) apresentaram resultado sorológico reagente. Destas, nenhuma amostra apresentou curva de amplificação pela qPCR, mas 40 (11%) apresentaram resultado positivo pela Nested PCR. As amostras, consideradas positivas na Nested PCR, ao serem submetidas a genotipagem, pelo método Multilocus Nested PCR RFLP, não apresentaram amplificações específicas para nenhum marcador pesquisado do parasito. Diante da concordância dos resultados, entre qPCR e a genotipagem, concluímos que não há evidências moleculares de parasitemia nos doadores estudados, sendo assim, o risco de transmissão desta infecção via transfusional é baixo ou nulo para esta região. Além disso, o insucesso da genotipagem sugere que a positividade, encontrada em algumas amostras analisadas por Nested PCR, trata-se de resultados falso-positivos.

**Palavras-chave:** *Toxoplasma gondii*, transmissão por *T. gondii*, análises moleculares, sorologia, infecção por *T. gondii*.

## **Introdução**

Toxoplasmose é uma parasitose causada pelo protozoário denominado *T. gondii*.<sup>(1,2)</sup> A taxa de infecção por este parasito é elevada em diversas regiões do mundo,<sup>(3-6)</sup> mas a ocorrência da doença é baixa em indivíduos

imunocompetentes.<sup>(7)</sup> A transmissão deste parasito ocorre por três vias principais; pela ingestão de água e alimentos crus (legumes, frutas e verduras) contaminados por oocistos esporulados, pelo consumo de carne crua ou mal cozida de animais contaminados por cistos de bradizoítos e pela via vertical em períodos agudos de infecção materna.<sup>(2,8)</sup> Além destas, foi sugerido por alguns autores a transmissão via transfusional.<sup>(9,10)</sup>

A infecção por *T. gondii* é diagnosticada usualmente por métodos sorológicos indiretos, os quais investigam a presença dos anticorpos específicos contra o parasito.<sup>(2,11,12)</sup> Dependendo dos resultados destas pesquisas, os indivíduos são classificados em perfis sorológicos, sendo estes utilizados para determinar as fases aguda ou crônica da doença.<sup>(12)</sup> A presença de imunoglobulinas da classe IgM, normalmente, caracteriza a fase aguda e, a presença de IgG a fase crônica.<sup>(11)</sup> Embora estas pesquisas colaborem com a determinação da infecção e com a classificação de suas fases, estes métodos dependem da produção de anticorpos do hospedeiro em níveis detectáveis pelos métodos laboratoriais disponíveis e, ainda, não permitem evidenciar a presença do parasito no sangue periférico. Por estas razões, avaliar o risco de transmissão via transfusional utilizando somente os métodos sorológicos como parâmetros parece ser insuficiente.

Considerando as limitações dos métodos sorológicos a Portaria nº 112 do Ministério da Saúde (2004),<sup>(13)</sup> determinou a utilização de métodos moleculares para a pesquisa do material genético dos vírus HIV e do HCV por transfusão de hemocomponentes visando a diminuição do risco transfusional dos mesmos.<sup>(13)</sup> Corroborando com a normativa, os trabalhos de Lajolo e

colaboradores (2008)<sup>(14)</sup> e Stramer e coautores (2004)<sup>(15)</sup> demonstraram que é possível detectar a viremia por métodos moleculares mesmo antes dos métodos sorológicos, podendo assim, diminuir os casos de transmissão.

A possibilidade de detecção da parasitemia por *T. gondii* em indivíduos imunocompetentes com infecção aguda e crônica por métodos moleculares já foi relatada por alguns autores.<sup>(16,17)</sup> Dessa forma, é possível que a constatação da parasitemia em doadores de sangue, por métodos moleculares, forneça informações consistentes para avaliar o risco de transmissão deste parasito via transfusional. Considerando tais afirmações, este trabalho buscou avaliar o risco de transmissão transfusional a partir de doadores de sangue com evidência sorológica para infecção por *T. gondii*, utilizando métodos moleculares.

## **Material e Métodos**

### **Casuística**

Após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP (parecer 006/2011), 750 indivíduos aptos à doação de sangue do Hemocentro de São José do Rio Preto-SP foram selecionados. Depois da obtenção da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido pelos participantes, o sangue periférico foi coletado em dois tubos, um sem e outro com anticoagulante. O tubo com anticoagulante (EDTA) foi utilizado para extração do material genômico para detectar a possível parasitemia por *T. gondii*. O tubo sem anticoagulante foi

utilizado para pesquisar a presença dos anticorpos anti-*T.gondii* das classes IgM e IgG.

### **Pesquisa de anticorpos específicos anti-*T. gondii* das classes IgM e IgG**

As pesquisas dos anticorpos anti-*T. gondii* das classes IgM e IgG foram realizadas pelo método de ELISA (DiaSorin, Itália), de acordo com as instruções do fabricante. De acordo com os resultados encontrados, os participantes foram classificados em perfis sorológicos. Os indivíduos com o perfil IgM-IgG- foram excluídos das análises moleculares por não apresentarem evidências de infecção pelo método sorológico.

### **Extração do DNA genômico**

O material genômico foi extraído utilizando o protocolo publicado por Mattos e colaboradores (2011)<sup>(18)</sup>; utilizando o Pure Link Genomic DNA Mini Kit da Invitrogen.

### **Reação em Cadeia da Polimerase convencional (cPCR) para a pesquisa do gene *FUT2***

Para avaliar a qualidade do material extraído e verificar a presença de fatores inibitórios da PCR, todas as amostras com evidência sorológica de infecção (n=362) foram submetidas a pesquisa do gene *FUT2* utilizando o protocolo descrito por Svensson e colaboradores (2000)<sup>(19)</sup> com modificações. O resultado desta análise foi revelado por eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio.

### **Nested PCR (nPCR) para a pesquisa do gene *B1* do *Toxoplasma gondii***

Após a avaliação da qualidade de extração e da verificação da presença de fatores inibitórios por meio da cPCR para o gene *FUT2*, as amostras de DNA foram submetidas a pesquisa do gene *B1* do parasito por Nested PCR. O protocolo desenvolvido com modificações foi publicado por Okay e colaboradores (2009)<sup>(20)</sup>. O resultado foi observado por meio da eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio.

### **Genotipagem**

A genotipagem foi realizada pela reação de Multilocus Nested-PCR-RFLP nas amostras com resultado positivo na Nested PCR durante a triagem para o gene *B1* do parasito. Este método foi utilizado para pesquisar os marcadores SAG1, 5'SAG2, 3'SAG2, SAG3, GRA6, BTUB, c22-8, c29-2, L358, PK1, SAG2, APICO e CS3. Esta análise foi realizada em parceria com a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP) utilizando os protocolos publicados por Su e colaboradores (2010)<sup>(21)</sup> e Pena e colaboradores (2008).<sup>(22)</sup>

### **PCR em tempo real (qPCR)**

A PCR em tempo real foi realizado também para pesquisar o gene *B1* do *T. gondii* nas 362 amostras com sorologia reagente utilizando o ensaio presença/ausência. O mix foi preparado adicionando 4,5 µl de água RNase Free, 10 µl de 2x QuantiTec Probe PCR Mater Mix (Qiagen), 0,5 µl do ensaio

XL da IDT (500 nM de cada primer e 250 nM da sonda) da Invitrogen e 5 µl do DNA genômico. O ciclo foi realizado no aparelho Step One Plus (Applied) com as seguintes temperaturas: uma vez de 50°C por 2 minutos, uma vez de 95°C por 15 minutos, 40 vezes 94°C por 15 segundos, 40 vezes de 60 °C por 1 minuto e uma vez de 50°C por 30 segundos. Os primers e a sonda utilizados nesta análise foram publicados por Gunel e coautores (2012).<sup>(23)</sup>

## Resultados

As características da casuística e os resultados sorológicos encontram-se na tabela 3. Os resultados das análises moleculares realizadas nas amostras com evidências sorológicas de infecção (n=362; 48,3%) encontram-se na tabela 4. As figuras de 4 a 7 ilustram os padrões de resultados encontrados nas análises moleculares.

## Discussão

Considerando o risco da transmissão do parasito *T. gondii* por transfusão de hemocomponentes, o presente trabalho investigou a presença deste protozoário em sangue periférico de doadores de sangue com evidência sorológica de infecção, utilizando métodos moleculares.

A viabilidade de transmissão transfusional por *T. gondii*, já foi sugerida por alguns pesquisadores.<sup>(9,10)</sup> Entretanto, nestes trabalhos a avaliação do risco de transmissão transfusional foi baseada nos resultados de análises sorológicas indiretas,<sup>(9,10)</sup> as quais não permitem evidenciar a parasitemia. Para investigar a presença de parasitos circulantes, torna-se necessária a utilização

de métodos diretos. No entanto, por se tratar de um parasito intracelular obrigatório que pode infectar qualquer tipo celular do organismo humano, os métodos diretos são de difícil execução e, por isso, não são rotineiramente utilizados.<sup>(24)</sup>

Há diversos estudos na literatura que detectaram este parasito utilizando os métodos moleculares. Contudo, na maioria destes, a casuística foi composta por pacientes com manifestações ou com suspeitas clínicas de infecção por *T. gondii*,<sup>(20,25,26)</sup> o que colabora, parcialmente, com as interpretações laboratoriais. Divergente a estas pesquisas, este trabalho investigou por métodos moleculares a parasitemia por *T. gondii* em indivíduos considerados saudáveis, sem manifestações ou suspeitas clínicas.

Inicialmente, para triar a parasitemia foi investigada a presença do gene *B1* do *T. gondii* por Nested PCR. As amostras com resultado positivo por esta metodologia foram submetidas a genotipagem utilizando o método de Multilocus Nested PCR RFLP. Porém, todas as amostras positivas na Nested PCR não apresentaram amplificações na genotipagem. Vários fatores podem ter influenciado este resultado. Estudos de Alfonso e coautores (2009)<sup>(27)</sup> e Buchbinder e colaboradores (2003),<sup>(28)</sup> por exemplo, demonstraram que a sensibilidade e a reprodutibilidade da PCR dependem, dentre outros fatores, da quantidade de parasitos presentes na amostra.<sup>(27,28)</sup>

Como a casuística composta por este trabalho tratava-se de imunocompetentes, não se esperava elevada parasitemia, mesmo em infecções primárias.<sup>(28)</sup> Assim, é possível que a baixa parasitemia esperada em indivíduos imunocompetentes, devido a ativação do sistema imunológico do

hospedeiro,<sup>(29)</sup> tenha colaborado na obtenção dos resultados negativos durante a genotipagem, visto que, cada região envolvida nesta análise repete-se uma única vez no genoma do parasito e, de acordo com Su e colaboradores (2010),<sup>(21)</sup> a sensibilidade do Multilocus Nested PCR RFLP é de 10 parasitos. Portanto, encontrar resultados negativos em amostras com baixo número deste protozoário pelo método Multilocus Nested PCR RFLP é esperado. Mesmo assim, esta interpretação não descarta a possibilidade de ter ocorrido contaminação durante as análises de Nested PCR nesta pesquisa.

O gene *B1* repete-se no genoma do parasito 35 vezes, por isso, é considerado um bom alvo para o diagnóstico de infecção por *T. gondii*.<sup>(2)</sup> Segundo Homan e colaboradores (2000),<sup>(30)</sup> o número de cópias do alvo dentro do genoma, aumenta a sensibilidade do método empregado. Esta afirmação é consistente com nossos resultados obtidos através da Nested PCR. No entanto, ao submeter as amostras pelo método de PCR em tempo real para a mesma região, os resultados encontrados não foram concordantes com a Nested PCR. Nenhuma amostra apresentou amplificação na PCR em tempo real, mesmo aquele indivíduo classificado com perfil sorológico de transição (IgM+IgG+).

Estes achados concordam com os de Chiang e coautores (2012)<sup>(31)</sup> que pesquisaram parasitemia em 1783 doadores de sangue de Taiwan por qPCR utilizando também o sistema TaqMan para o elemento repetitivo 529. Entretanto, discordam dos achados de Zainodini e colaboradores (2014)<sup>(32)</sup> e Mahmoudvand e colaboradores (2015)<sup>(33)</sup>, os quais conseguiram detectar a



parasitemia em doadores de sangue utilizando a qPCR pelo sistema SYBR Green, pesquisando as regiões *SAG1* e *B1* do parasito, respectivamente.

Esta discordância, de certa forma, é esperada, pois o princípio de detecção da fluorescência utilizado nestes trabalhos é diferente. O sistema SYBR Green, utilizados por estes autores, não apresenta especificidade tão boa quanto o sistema TaqMan, o qual envolve uma sonda específica da região alvo<sup>(34)</sup>. O sistema SYBR Green pode anelar em qualquer amplificado de dupla fita, seja o alvo ou não.<sup>(34)</sup> É provável que, os diferentes resultados entre este trabalho e dos autores que utilizaram o sistema SYBR Green, tenham relação com o princípio de detecção da fluorescência e os alvos pesquisados.

Concordando com nossos resultados, no Nested PCR, Sarkari e colaboradores (2014)<sup>(35)</sup> também detectaram parasitemia em doadores de sangue utilizando o Nested PCR para o gene *B1*. Segundo o trabalho de Teixeira e coautores (2013)<sup>(36)</sup> a sensibilidade da qPCR e a Nested PCR para a detecção deste parasito em líquido amniótico é a mesma (98,3%), mas a especificidade é menor (90,2%) para a Nested PCR em relação a qPCR (100%). Considerando estes resultados,<sup>(36)</sup> podemos deduzir que a utilização da Nested PCR, aumenta o risco de obtenção de resultados falso-positivos quando comparado a qPCR, o que pode ter ocorrido com as amostras deste trabalho quando submetidas a esta análise.

Todavia, por se tratar de um trabalho com amostras de líquido amniótico e não de sangue periférico, esta interpretação pode ser tendenciosa e, por isso, mais estudos são necessários para avaliar os diferentes métodos moleculares na detecção de parasitos em sangue periférico de indivíduos

imunocompetentes. Embora a evolução dos métodos moleculares tenha colaborado para a detecção de microrganismos importantes para a transfusão de sangue,<sup>(14,15)</sup> os mesmos apresentam limitações relacionadas aos parâmetros de sensibilidade e especificidade. É possível que a discordância entre os resultados do Nested PCR com o qPCR e a genotipagem, encontrada neste trabalho, esteja relacionada a baixa especificidade e ao elevado risco de contaminação devido aos procedimentos pós PCR envolvidos neste método.

### **Conclusão**

De acordo com os resultados encontrados na qPCR e na Multilocus Nested PCR RFLP, concluímos que não há evidências moleculares de parasitemia entre os doadores de sangue da região noroeste paulista, portanto o risco de transmissão é baixo ou nulo para esta região. Além disso, a discordância entre os métodos moleculares, sugere elevado risco de contaminação e menor especificidade do Nested PCR.

### **Agradecimentos**

À FAPESP pelo apoio financeiro (processos: 2012/07750-2 e 2012/07716-9), ao Hemocentro de São José do Rio Preto, aos participantes, à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e à FAMERP.

### **Referências**

1. Dubey JP. The history of *Toxoplasma gondii* - The first 100 years. J Eukaryot Microbiol. 2008;55(6):467–75.

2. Robert-Gangneux F, Dardé M-L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2012 Apr [cited 2014 Oct 10];25(2):264–96.
3. Elhence P, Agarwal P, Prasad KN, Chaudhary RK. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in North Indian blood donors: Implications for transfusion transmissible toxoplasmosis. *Transfus Apher Sci*. 2010;43:37–40.
4. Coêlho RAL, Kobayashi M, Carvalho LB. Prevalence of IgG antibodies specific to *Toxoplasma gondii* among blood donors in Recife, Northeast Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2003;45:229–31.
5. Zarkovic A, MacMurray C, Deva N, Ghosh S, Whitley D, Franzco SG. Seropositivity rates for *Bartonella henselae*, *Toxocara canis* and *Toxoplasma gondii* in New Zealand blood donors. *Clin Exp Ophthalmol*. 2007;35(September 2006):131–4.
6. Al-Amari O. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* among blood donors in Abha, Asir Region, south-western Saudi Arabia. *J Egypt Public Heal Assoc*. 1994;69(1-2):77–88.

7. Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: Transmission, diagnosis, and prevention. Clin Microbiol Infect. 2002;8(10):634–40.
8. Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. 2004;363:1965–76.
9. Siegel SE, Lunde MN, Gelderman AH, Halterman RH, Brown JA, Levine AS, et al. Transmission of Toxoplasmosis by Leukocyte Transfusion. Blood. 1971;37(4).
10. Kimball AC, Kean BH, Kellner A. The risk of transmitting toxoplasmosis by blood transfusion. Transfusion. 1965;5(5):447–51.
11. Montoya JG. Laboratory Diagnosis of *Toxoplasma gondii* Infection and Toxoplasmosis. J Infect Dis. 2002;185:s73–82.
12. Tlamçani Z, Lemkhenete Z, Lmimouni BE. Toxoplasmosis : The value of molecular methods in diagnosis compared to conventional methods. 2013;3(2):93–9.
13. Anvisa. Portaria nº112, de janeiro de 2004. Ministério da Saúde 2004 p. 29–31.
14. Lajolo C p, Langhi Junior DM, Marques Junior JFC. HIV – Negative

ELISA and positive NAT: a reality in Blood Banking. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2008;30(4):330–4.

15. Stramer SL, Glynn S a, Kleinman SH, Strong DM, Caglioti S, Wright DJ, et al. Detection of HIV-1 and HCV infections among antibody-negative blood donors by nucleic acid-amplification testing. *N Engl J Med.* 2004;351(8):760–8.
16. Guy EC, Joynson DH. Potential of the polymerase chain reaction in the diagnosis of active *Toxoplasma* infection by detection of parasite in blood. *J Infect Dis.* 1995;172(1):319–22.
17. Silveira C, Vallochi a L, Rodrigues da Silva U, Muccioli C, Holland GN, Nussenblatt RB, et al. *Toxoplasma gondii* in the peripheral blood of patients with acute and chronic toxoplasmosis. *Br J Ophthalmol* [Internet]. 2011 Mar [cited 2014 Oct 17];95(3):396–400.
18. Mattos CCB, Meira CS, Ferreira AIC, Frederico FB, Hiramoto RM, Jr GCA, et al. Contribution of laboratory methods in diagnosing clinically suspected ocular toxoplasmosis in Brazilian patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011 Jul [cited 2014 Nov 19];70(3):362–6.

19. Svensson L, Petersson A, Henry S. Secretor genotyping for A385T, G428A, C571T, C628T, 685delTGG, G849A, and other mutations from a single PCR. *Immunohematology*. 2000;40(July):856–60.
20. Okay TS, Yamamoto L, Oliveira LC, Manuli ER, Andrade Junior HF De, Del Negro GMB. Significant performance variation among PCR systems in diagnosing congenital toxoplasmosis in São Paulo, Brazil: analysis of 467 amniotic fluid samples. *Clinics [Internet]*. 2009 Mar [cited 2014 Nov 19];64(3):171–6.
21. Su C, Shwab EK, Zhou P, Zhu XQ, Dubey JP. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology [Internet]*. 2010 Jan [cited 2015 May 25];137(1):1–11.
22. Pena HFJ, Gennari SM, Dubey JP, Su C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *Int J Parasitol [Internet]*. 2008 Apr [cited 2014 Oct 8];38(5):561–9.
23. Gunel T, Kalelioglu I, Ermis H, Has R, Aydinli K. Large scale pre-diagnosis of *Toxoplasma gondii* DNA genotyping by real-time PCR on amniotic fluid. *Biotechnol Biotechnol Equip*. 2012;26(2):2913–5.

24. Kompalic-Cristo A, Britto C, Fernandes O. Diagnóstico molecular da toxoplasmose: revisão. *J Bras Patol e Med Lab.* 2005;41(4):229–35.
25. Costa JGL, Carneiro ACAV, Tavares AT, Andrade GMQ, Vasconcelos-Santos DV, Januário JN, et al. Real-time PCR as a prognostic tool for human congenital toxoplasmosis. *J Clin Microbiol [Internet].* 2013 Aug [cited 2014 Nov 12];51(8):2766–8.
26. Mesquita, Rafael Tonini, Vidal, José Ernerto, Pereira-Chioccola VL. Molecular diagnosis of cerebral toxoplasmosis : comparing markers that determine *Toxoplasma gondii* by PCR in peripheral blood from HIV-infected patients. *Braz J Infect Dis.* 2010;346–50.
27. Alfonso Y, Fraga J, Jiménez N, Fonseca C, Dorta-Contreras AJ, Cox R, et al. Detection of *Toxoplasma gondii* in cerebrospinal fluid from AIDS patients by nested PCR and rapid identification of type I allele at *B1* gene by RFLP analysis. *Exp Parasitol [Internet].* Elsevier Inc.; 2009 Jul [cited 2014 Oct 30];122(3):203–7.
28. Buchbinder S, Blatz R, Rodloff AC, Pcr JA-J. Comparison of real-time PCR detection methods for *B1* and P30 genes of *Toxoplasma gondii*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003;45:269–71.

29. Denkers EY, Gazzinelli RT. Regulation and Function of T-Cell-Mediated Immunity during *Toxoplasma gondii* Infection Regulation and Function of T-Cell-Mediated Immunity during *Toxoplasma gondii* Infection. Clin Microbiol Rev. 1998;11(4):569–88.
30. Homan WL, Vercammen M, Braekeleer J De, Verschueren H. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii* , and its use for diagnostic and quantitative PCR p. Int J fro Parasitol. 2000;30:69–75.
31. Chiang T-Y, Hsieh H-H, Kuo M-C, Chiu K-T, Lin W-C, Fan C-K, et al. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* Infection among Healthy Blood Donors in Taiwan. PLoS ONE. 2012. p. e48139.
32. Zainodini N, Zare-Bidaki M A. Molecular and Serological Detection of Acute and Latent Toxoplasmosis Using Real-Time PCR and ELISA Techniques in Blood Donors of Rafsanjan City, Iran, 2013. Iran J Parasitol. 2014;9(3):336–41.
33. Mahmoudvand H, Dezaki ES, Soleimani S, Reza M, Kheirandish F, Ezatpour B, et al. Seroprevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection among healthy blood donors in southeast of Iran. Parasite Immunol. 2015;



34. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L. Basic principles of real-time quantitative PCR. 2005;209–19.
35. Sarkari B, Shafiei R, Zare M, Sohrabpour S, Kasraian L. Seroprevalence and molecular diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection among blood donors in southern Iran. J Infect Dev Ctries. 2014;8:543–7.
36. Teixeira LE, Kanunfre KA, Shimokawa PT, Targa LS, Rodrigues JC, Domingues W, et al. The performance of four molecular methods for the laboratory diagnosis of congenital toxoplasmosis in amniotic fluid samples. Rev Soc Bras Med Trop [Internet]. 2013;46(May):

Tabela 3. Características da casuística e resultados sorológicos para pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* das classes IgM e IgG

Gênero	N*	%	Características		
			$\bar{x}$ ** de idade $\pm$ DP***	Mediana (anos)	Mínimo e Máximo (anos)
Masculino	510	68,0	34,8 $\pm$ 11,6	34	16 a 65
Feminino	240	32	32,8 $\pm$ 10,7	32	16 a 60
Total	750	100	34,3 $\pm$ 11,4	33	16 a 65
Sorologia	N	%	$\bar{x}$ de idade $\pm$ DP	Mediana (anos)	Mínimo e Máximo (anos)
IgM reagente	27	3,6	36,8 $\pm$ 11,7	32	19 a 59
IgM não reagente	723	96,4	34,1 $\pm$ 11,3	33	16 a 6
IgG reagente	357	47,6	37,1 $\pm$ 10,8	36	16 a 65
IgG não reagente	393	52,4	31,5 $\pm$ 11,2	30	16 a 64

\*N = Número; \*\* $\bar{x}$  = média; \*\*DP = Desvio padrão

Tabela 4. Resultados das análises moleculares das 362 amostras com evidências sorológicas de infecção

Perfis Sorológicos	Nested PCR		Genotipagem		qPCR	
	N*	%	N	%	N	%
IgM+IgG-	5	1,4	0	0,0	0	0,0
IgM-IgG+	335	92,5	39	97,5	0	0,0
IgM+IgG+	22	6,1	1	2,5	0	0,0
Total	362	100,0	40	100,0	0	0,0

\*N = Número

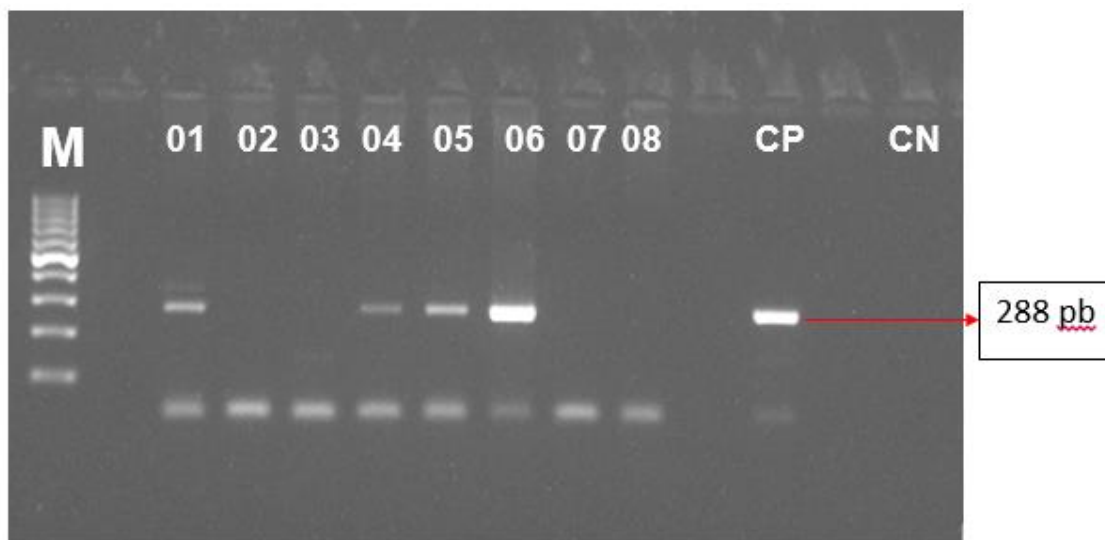


Figura 4. Perfil eletroforético da PCR convencional obtido durante as pesquisas do fragmento de 288 pb referente ao gene *B1* do *Toxoplasma gondii*. Os números de 01 a 08 correspondem às amostras de doadores. M representa o marcador de 100 pb, CP refere-se ao controle positivo e CN ao controle negativo.

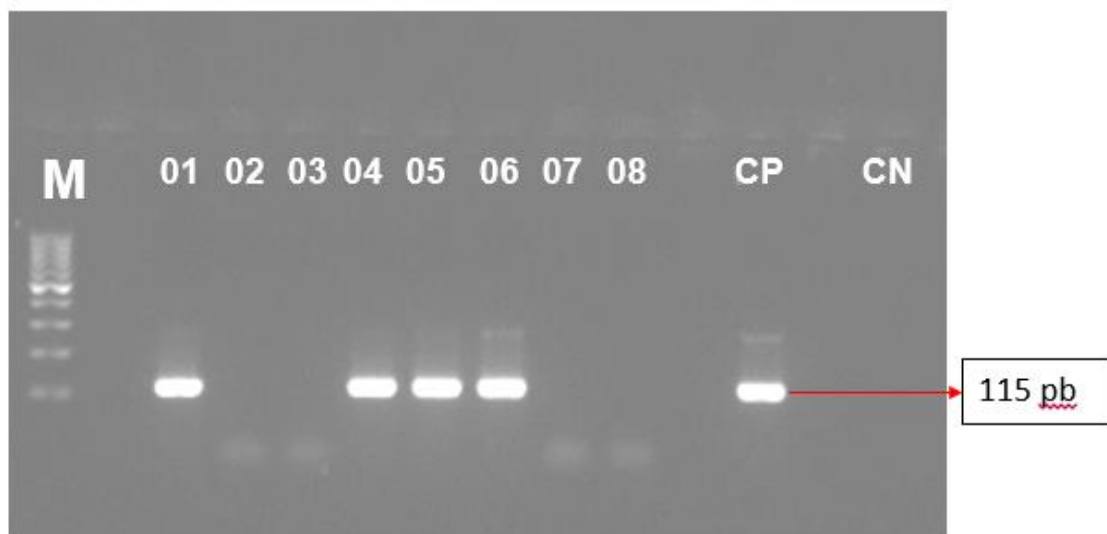


Figura 5. Perfil eletroforético da Nested PCR obtido durante as pesquisas do fragmento de 115 pb do gene *B1* do *Toxoplasma gondii*. Os números de 01 a 08 correspondem às amostras de doadores. M representa o marcador de 100 pb, CP refere-se ao controle positivo e CN ao controle negativo

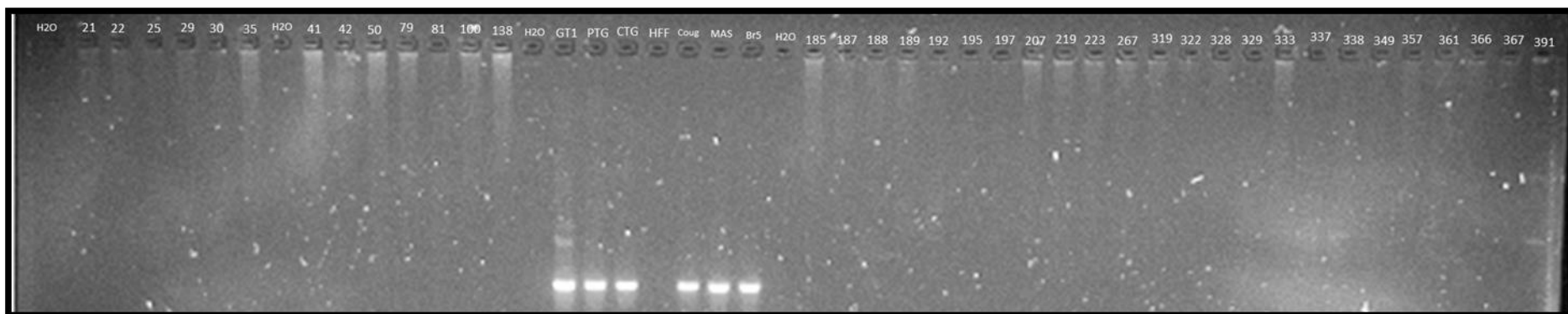


Figura 6. Perfil eletroforético da Nested PCR realizada para amplificar o marcador GRA6 do *Toxoplasma gondii*. Os números 21, 22, 25, 29, 30, 35, 41, 42, 50, 79, 81, 100, 138, 185, 187, 188, 189, 192, 195, 197, 207, 219, 223, 267, 319, 322, 328, 329, 333, 337, 338, 338, 349, 357, 361, 366, 367, 391 correspondem amostras de DNA dos doadores aptos a doação de sangue do Hemocentro de São José do Rio Preto. Os controles positivos correspondem as seguintes abreviações: GT1 (cepa I), PTG (cepa II), CTG (cepa III), Coug (cepa atípica), MAS (cepa atípica), Tg Cat BR5 (cepa atípica). As abreviações H<sub>2</sub>O correspondem aos controles negativo da reação.

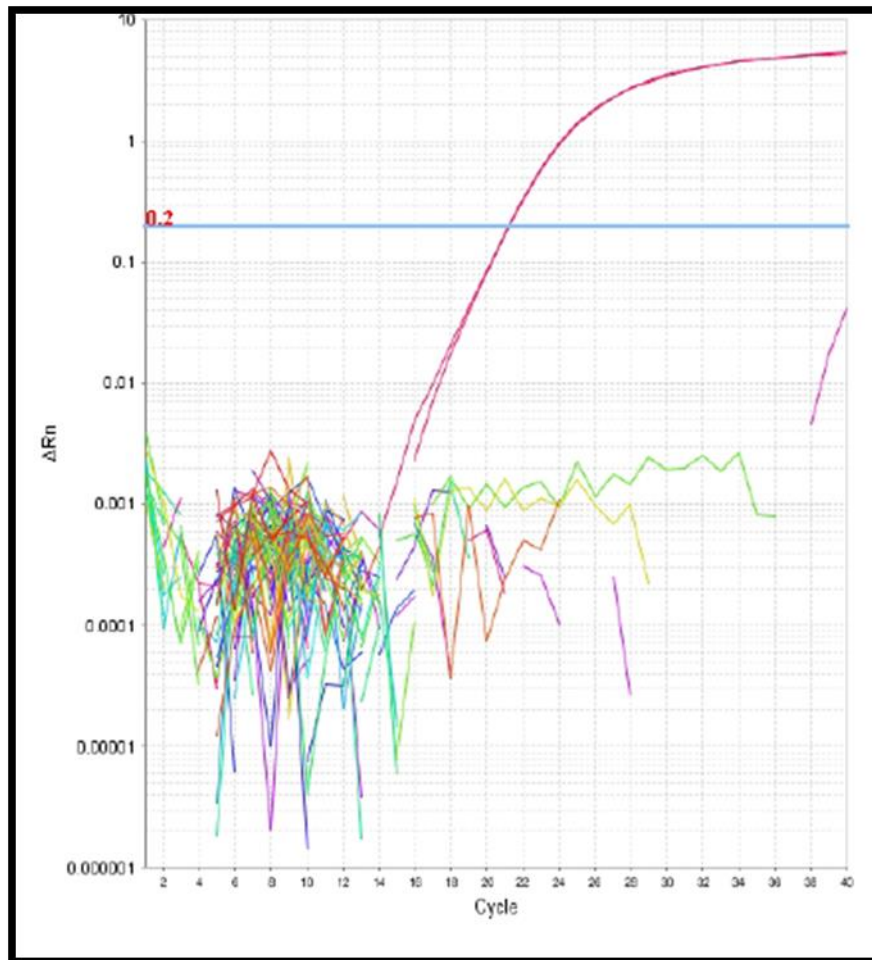


Figura 7. Gráfico de amplificação das amostras de doadores aptos a doação de sangue do Hemocentro de São José do Rio Preto-SP. As curvas que apresentaram amplificação (em vermelho) correspondem aos controles positivos (cepa RH).

*Manuscrito 3*

---



## 2.3 Manuscrito 3

### **Avaliação molecular do risco da transmissão via transfusional do *Toxoplasma gondii***

Fabiana Nakashima<sup>1</sup>, Octávio Ricci Júnior<sup>2</sup>; Valquíria Pardo de Sousa<sup>1</sup>; Marcos Paulo Miola<sup>1</sup>; Cinara de Cássia Brandão de Mattos<sup>1</sup>, Luiz Carlos de Mattos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Imunogenética da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

<sup>2</sup>Diretor do Hemocentro de São José do Rio Preto - Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto (FUNFARME)

#### **Resumo**

*T. gondii*, causador da toxoplasmose, é um protozoário de ampla distribuição mundial. Dentre as várias vias de transmissão deste parasito, pouco se conhece sobre a transfusional. Portanto, este trabalho buscou investigar, por métodos moleculares, o risco da transmissão deste protozoário por esta via. Para tanto, 250 indivíduos aptos à doação de sangue do Hemocentro de São José do Rio Preto-SP foram selecionados. Nas amostras, obtidas a partir do sangue periférico destes indivíduos, a infecção foi determinada pelo ELISA (IgM e IgG) e a parasitemia pela Nested PCR e qPCR. As amostras com suspeita de parasitemia foram submetidas a Multiplex Nested PCR RFLP, afim de caracterizar o genótipo do parasito. Os doadores com resultados

discordantes entre as análises sorológicas e moleculares (IgM-IgG-, Nested PCR positivo) foram reconvocados para uma nova coleta um ano após a primeira análise, para investigar a soroconversão (ELISA e IFI). Além destas análises, os hemocomponentes originados a partir das bolsas, com suspeita de parasitemia, foram rastreadas para identificar os seus respectivos receptores. Destes, foram separadas alíquotas de sangue periférico, antes da transfusão e após a transfusão ( $\pm 20$  dias). Estas amostras também foram analisadas pelos métodos sorológicos (ELISA e IFI) e moleculares (Nested PCR, qPCR e Multiplex Nested PCR RFLP). Das 250 amostras analisadas, 34 (13,6%) apresentaram resultado positivo somente na Nested PCR. Estas foram rastreadas, porém somente em quatro casos foram realizadas as análises sorológicas e moleculares nas amostras pré e pós transfusional. Somente uma amostra, oriunda de receptor, apresentou resultado positivo na Nested PCR, porém ao ser submetida à genotipagem não observou-se ampliações para nenhum marcador. Os resultados moleculares da qPCR, obtidos nesta pesquisa, indicam que não ocorreu transmissão transfusional do *T. gondii* na população estudada. Além disso, a não ocorrência de soroconversão de doadores com suposta parasitemia, detectada por Nested PCR, ilustra a menor especificidade deste método e os riscos de contaminações envolvidos.

**Palavras-chave:**

Toxoplasmose; vias de transmissão por *T. gondii*; hemocomponentes; riscos transfusionais.

## Introdução

Toxoplasmose é uma doença parasitária causada pelo agente etiológico *T. gondii*. Trata-se de um protozoário intracelular obrigatório e oportunista, capaz de infectar qualquer célula nucleada de vários mamíferos e aves.<sup>(1)</sup> Em humanos, a taxa de infecção é elevada, porém a frequência do desenvolvimento da doença é baixa.<sup>(2)</sup> Estima-se que um terço da população mundial esteja infectada com este parasito.<sup>(3)</sup> A frequência de infecção está associada aos hábitos alimentares, condições ambientais, hábitos culturais, condições socioeconômicas, idade do hospedeiro, dentre outros fatores. Normalmente, a infecção não está associada as complicações severas em indivíduos imunocompetentes, mas pode levar a quadros graves em indivíduos imunocomprometidos e os fetos.<sup>(2)</sup>

Nos humanos, a transmissão deste parasito pode ocorrer via congênita ou após o nascimento; adquirida principalmente pelo consumo de carne crua ou mal passada, contaminada por cistos de bradizoítos, e pela ingestão de alimentos ou água contaminados por oocistos esporulados. A transmissão vertical ocorre quando a gestante se infecta, pela primeira vez, durante a gestação ou passa por períodos de reagudização.<sup>(3,4)</sup> Além destas, o hospedeiro humano ainda pode adquirir esta infecção via transplante de órgãos sólidos e transfusão de hemocomponentes.<sup>(5-8)</sup>

A toxoplasmose não é uma doença infecciosa triada pelas agências transfusionais brasileiras.<sup>(9)</sup> Os riscos de transmissão do *T. gondii* por esta via não estão bem esclarecidos. Os estudos que buscaram avaliar este risco basearam-se, principalmente, nos resultados sorológicos indiretos e não na

detecção de parasitemia.<sup>(6-8)</sup> Por se tratar de uma infecção de frequência elevada,<sup>(1,4)</sup> inclusive no Brasil,<sup>(10,11)</sup> a exclusão de bolsas com diagnóstico sorológico reagente para toxoplasmose, com finalidade de diminuir o risco de transmissão, pode prejudicar o recrutamento de doadores, bem como a qualidade de vida dos pacientes que necessitam destes componentes sanguíneos.

Com os avanços dos métodos de biologia molecular, a detecção e caracterização do *T. gondii* em líquidos corpóreos, em tecidos de humanos sintomáticos e animais de laboratório vem sendo utilizados com sucesso.<sup>(12-14)</sup> Considerando a possibilidade de detectar e caracterizar o genótipo do parasito em amostras clínicas, por métodos moleculares, este trabalho dedicou-se a investigar o risco de transmissão transfusional do *Toxoplasma gondii* utilizando métodos moleculares em amostras de receptores de hemocomponentes com suspeita de parasitemia.

## **Material e Métodos**

### **Doadores de sangue**

Após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP (parecer 006/2011), 250 doadores de sangue do Hemocentro de São José do Rio Preto-SP foram selecionados. Depois da obtenção da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido pelos participantes, o sangue periférico foi coletado em dois tubos; um sem e outro com anticoagulante.

### **Pesquisa de anticorpos específicos anti-*T. gondii* das classes IgM e IgG**

Com o soro foi realizada a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* das classes IgM e IgG pelo método de ELISA (DiaSorin, Itália), seguindo as instruções do fabricante. Conforme os resultados, os participantes foram classificados em perfis sorológicos (PS). Além do ELISA, o método de imunofluorescência indireta (WAMA Diagnóstica, Brasil) também foi realizado nos indivíduos com resultado não reagente no ELISA e positivo para Nested PCR.

### **Extração do DNA genômico**

Com o sangue periférico coletado com o tubo com anticoagulante (EDTA) foi realizado a extração do material genômico utilizando o protocolo publicado por Mattos e colaboradores (2011)<sup>(15)</sup> utilizando o Pure Link Genomic DNA Mini Kit da Invitrogen.

### **Reação em Cadeia da Polimerase convencional (cPCR) para a pesquisa do gene *FUT2***

Para avaliar a qualidade do material extraído todas as amostras foram submetidas a pesquisa do gene *FUT2* utilizando o protocolo descrito por Svensson e colaboradores (2000)<sup>(16)</sup> com modificações.

### **Nested PCR (nPCR) para a pesquisa do gene *B1* do *Toxoplasma gondii***

O protocolo utilizado nesta análise foi publicado por Okay e colaboradores (2009).<sup>(17)</sup>

### **PCR em tempo real (qPCR)**

O PCR em tempo real foi realizado também para pesquisar o gene *B1* do *T. gondii* nas 250 amostras utilizando o ensaio presença/ausência. O mix foi preparado adicionando 4,5 µl de água RNase Free, 10 µl de 2x QuantiTec Probe PCR Mater Mix (Qiagen), 0,5 µl do ensaio XL da IDT (500 nM de cada primer e 250 nM da sonda) da Invitrogen e 5 µl do DNA genômico. O ciclo foi realizado no aparelho Step One Plus (Applied) com as seguintes temperaturas: uma vez de 50°C por 2 minutos, uma vez de 95°C por 15 minutos, 40 vezes 94°C por 15 segundos, 40 vezes de 60 °C por 1 minuto e uma vez de 50°C por 30 segundos. Os primers e a sonda utilizados nesta análise foram publicados por Gunel e coautores (2012).<sup>(18)</sup>

### **Genotipagem**

A genotipagem foi realizada pelo método de Multilocus Nested-PCR-RFLP nas amostras com resultado positivo na Nested PCR durante a triagem para o gene *B1* do parasito. Este método foi realizado em parceria com a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP) utilizando os protocolos publicados por Su e colaboradore (2010)<sup>(19)</sup> e Pena e colaboradores (2008).<sup>(20)</sup> A realização deste método objetivou-se a identificar e comparar os genótipos do parasito entre doador e

receptor, permitindo assim, inferir com mais segurança o risco de transmissão desta infecção via transfusional.

### **Rastreamento das bolsas de sangue com resultado positivo na Nested PCR**

As bolsas de sangue com resultado positivo na Nested PCR foram rastreadas com o objetivo de identificar os pacientes que as receberam. Dos receptores, uma alíquota de sangue periférico foi separada antes da transfusão (amostra pré-transfusional) e outra aproximadamente 20 dias após a transfusão (amostra pós-transfusional). Nestas amostras foram realizadas as análises moleculares (Nested PCR, qPCR e genotipagem) para evidenciar a parasitemia e definir o genótipo do parasito. Além destas, as análises sorológicas para pesquisar os anticorpos anti-*T. gondii* das classes IgM e IgG também foram realizadas. Grande dificuldade foi encontrada nesta etapa devido ao não comparecimento dos receptores ao serviço transfusional após a transfusão, o que comprometeu a coleta das amostras pós-transfusional.

### **Rastreamento dos doadores de sangue com resultados discordantes entre a Nested PCR e a sorologia**

Uma segunda análise foi realizada para tentar esclarecer os resultados discordantes encontrados entre Nested PCR e sorologia em alguns doadores de sangue (n=23). Os doadores foram reconvocados para uma nova coleta um ano após a doação de sangue. Tais amostras (soro) foram submetidas a pesquisa dos anticorpos específicos anti-*T.gondii* pelos métodos ELISA e

Imunofluorescência indireta (IFI) com a finalidade de identificar a soroconversão. Além desta, as amostras foram analisadas pelos mesmos métodos moleculares já descritos anteriormente.

## Resultados

Das 250 (100%; média de idade  $34,3 \pm 12$ ; mediana 33 anos; intervalo 16 a 65 anos) amostras de doadores analisadas, nenhuma apresentou resultado positivo na qPCR, mas 34 (13,6%; média de idade  $37,6 \pm 11,3$ ; mediana 38 anos; intervalo 20 a 58 anos) foram positivas na Nested PCR. Destas 34, nenhum genótipo do *T. gondii* foi determinado pelo Multilocus Nested PCR RFLP. Na tabela 5 encontram-se os resultados das análises sorológicas e moleculares dos doadores.

Mesmo com os resultados discordantes entre as análises moleculares (Nested PCR, qPCR e genotipagem), as 34 amostras de doadores com Nested PCR positivo foram rastreadas. Dez amostras pré-transfusionais e seis pós-transfusionais foram analisadas pelos métodos moleculares e sorológicos. Os resultados das análises encontram-se na tabela 6. Em dois casos não foi possível realizar a análise sorológica devido à quantidade insuficiente de amostra separada.

Das 16 amostras de receptores analisadas, somente em quatro casos foi possível obter as amostras pré e pós transfusionais (tabela 7). Dos 23 doadores reconvocados, somente sete (30,4%) compareceram para a segunda coleta, a qual se destinou à investigar a ocorrência de soroconversão. Destes, nenhum participante apresentou resultado reagente no ELISA e na IFI.



## Discussão

Este trabalho buscou avaliar o risco de transmissão do *T. gondii* via transfusional por meio de análises moleculares em pacientes que receberam hemocomponentes com suspeita de parasitemia. Sabe-se que a parasitemia por *T. gondii* está presente principalmente nas infecções recente, porém pouco se conhece sobre a permanência e vitalidade deste parasito na circulação sanguínea de humanos.<sup>(21)</sup> *In vitro*, estima-se que este parasito sobreviva em sangue humano coletado com citrato por um período de 26 a 28 dias a 4 °C.<sup>(22)</sup> Esta constatação apoia a hipótese levantada por alguns pesquisadores de que é possível a ocorrência de transmissão via transfusional deste protozoário.<sup>(6-8)</sup>

Os estudos que investigaram o risco de transmissão transfusional em humanos utilizaram como parâmetro os resultados obtidos dos métodos sorológicos indiretos.<sup>(6-8)</sup> Embora estes métodos sejam úteis no diagnóstico de infecção e na caracterização das fases (aguda e crônica) da doença, os mesmos não permitem detectar e/ou caracterizar o parasito, o que dificulta a comprovação de transmissão por esta via, visto que são várias as fontes possíveis de aquisição deste parasito.

Os métodos moleculares vem sendo amplamente empregados no diagnóstico da toxoplasmose em indivíduos com manifestações clínicas da doença.<sup>(12,14,17,23-25)</sup> Estes métodos, além de detectar o DNA do parasito, permitem genotipar o mesmo em amostras clínicas e de isolados,<sup>(19,20,25)</sup> inclusive em indivíduos saudáveis assintomáticos.<sup>(26-29)</sup> Por estas razões, este trabalho utilizou a Nested PCR e a qPCR para evidenciar a parasitemia e a

genotipagem para caracterizar o genótipo do parasito entre os doadores de sangue e seus respectivos receptores.

Os hemocomponentes originados a partir do sangue de doadores com resultado positivo na Nested PCR foram rastreados afim de investigar seus respectivos receptores. Nestes, as mesmas análises moleculares e sorológicas foram realizadas para detectar a infecção e caracterizar os genótipos do possível parasito transmitido. De acordo com o resultado da sorologia, evidenciou-se que os quatro casos de receptores analisados, já apresentavam resultado positivo para a infecção antes da transfusão do hemocomponente supostamente contaminado (amostra pré transfusional).

Por isso, somente a comparação dos genótipos do *T. gondii* entre as amostras dos doadores e dos receptores poderia esclarecer a dúvida sobre a possível transmissão via transfusional. Entretanto, não foi evidenciada a presença de parasitemia nestes quatro receptores. O único caso de receptor com presença de parasitemia determinada por Nested PCR foi submetida a genotipagem, porém não apresentou amplificação para nenhum marcador. Por consequência, não foi possível confirmar pelos métodos moleculares a ocorrência de transmissão deste protozoário via transfusional nos casos analisados.

Os métodos moleculares, assim como os sorológicos, também apresentam limitações e podem produzir resultados não confiáveis.<sup>(13,30)</sup> Há estudos que demonstraram que os parâmetros de sensibilidade e especificidade dos métodos moleculares, que são utilizados no diagnóstico da toxoplasmose, dependem, principalmente, da qualidade da amostra,<sup>(14)</sup> do tipo

da amostra (sangue total, buff coat, tecido, etc.),<sup>(31)</sup> da condição imunológica do hospedeiro,<sup>(32)</sup> número de cópias da região alvo pesquisada<sup>(19)</sup> e do princípio utilizado para detecção da reação positiva (eletroforese, sonda).<sup>(30)</sup>

Dessa maneira, é possível que as discordâncias entre os resultados da Nested PCR com a qPCR e da Nested PCR com a Multiplex Nested PCR RFLP, encontradas neste trabalho, estejam relacionadas a um, ou mais, destes fatores citados acima. Entretanto, como não foi evidenciada a soroconversão em sete doadores, um ano após serem classificados como sorologia não reagente e Nested PCR positivo, acreditamos que estes resultados iniciais tratavam-se de reações falso-positivas e não de limitações do método. Esta interpretação é corroborada com os resultados de Teixeira e colaboradores (2013) que descreveram que a Nested PCR apresenta menor especificidade que a qPCR.<sup>(23)</sup>

Neste trabalho foi observado que os resultados da qPCR mantiveram-se negativos para as amostras dos doadores com e sem infecção determinada pelos métodos sorológicos (ELISA e IFI). Como a qPCR não necessita de procedimentos pós amplificação, o risco de contaminação é menor quando comparada a Nested PCR.<sup>(13,30)</sup> A ausência de parasitemia determinada por qPCR utilizando o ensaio TaqMan em doadores de sangue também foi encontrada pelo trabalho de Chiang e colaboradores (2012).<sup>(26)</sup> A ausência de parasitemia entre estes doadores de sangue, determinada pelo qPCR, pode estar associada ao estado imunológico do hospedeiro, pois trata-se de um parasito oportunista. O estudo de Nguyen e colaboradores (1996), por

exemplo, demonstrou, experimentalmente, que com o surgimento de anticorpos específicos, a parasitemia não é mais detectada por método molecular.<sup>(33)</sup>

Pelo nosso conhecimento, somente dois trabalhos conseguiram detectar parasitos na circulação de doadores de sangue utilizando a qPCR com ensaio SYBR Green.<sup>(27-29)</sup> É possível que a discordância dos resultados entre estes trabalhos com o presente estudo possa estar associada com o princípio de detecção da fluorescência entre estes ensaios. O ensaio TaqMan é considerado mais específico devido a necessidade da sonda também ser complementar ao alvo pesquisado.<sup>(30)</sup>

Esta característica, apesar de ser um parâmetro necessário para o diagnóstico específico, pode apresentar desvantagem quanto a sensibilidade, principalmente se considerarmos o número restrito de parasito circulantes em indivíduos saudáveis. Portanto, a escolha do método molecular para investigar o *T. gondii* na circulação sanguínea em indivíduos saudáveis deve ser criteriosa e vários fatores devem ser considerados, principalmente por se tratar de protozoário principalmente tecidual.

## **Conclusão**

De acordo com os resultados encontrados nesta pesquisa, concluímos que não há evidências moleculares do risco da transmissão do *T. gondii* via transfusional na população investigada. Além disso, foi observado que o Nested PCR pode produzir com maior frequência resultado falso positivo.

## Agradecimentos

À FAPESP pelo apoio financeiro (processos: 2012/07750-2 e 2012/07716-9), ao Hemocentro de São José do Rio Preto, aos participantes, à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e à FAMERP.

## Referências

1. Carruthers VB, Carruthers VB. Host cell invasion by the opportunistic pathogen. *Microbiol Immunol.* 2002;81:111–22.
2. Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: Transmission, diagnosis, and prevention. *Clin Microbiol Infect.* 2002;8(10):634–40.
3. Robert-Gangneux F, Dardé M-L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev.* 2012;25(2):264–96.
4. Dubey JP, Lago EG, Gennari SM, Su C, Jones JL. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology.* 2012;139(11):1375–424.
5. Dubey JP, Lindsay DS. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites , Bradyzoites , and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts †. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(2):267–99.

6. Nelson J, Kauffmann D, Ciavarella D, WJ S. Acquired toxoplasmic retinochoroiditis after platelet transfusions. *Ann Ophthalmol.* 1989;21(7):253–4.
7. Kimball AC, Kean BH, Kellner A. The risk of transmitting toxoplasmosis by blood transfusion. *Transfusion.* 1965;5(5):447–51.
8. Siegel SE, Lunde MN, Gelderman AH, Halterman RH, Brown JA, Levine AS, et al. Transmission of Toxoplasmosis by Leukocyte Transfusion. *Blood.* 1971;37(4).
9. Saúde M da. Portaria MS nº 1.353, de 13.06.2011 - DOU 1 de 14.06.2011. 2011.
10. Coêlho RAL, Kobayashi M, Carvalho LB. Prevalence of IgG antibodies specific to *Toxoplasma gondii* among blood donors in Recife, Northeast Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2003;45:229–31.
11. Gonçalves MA., Brandão de Mattos CC, Spegiarin LCJF, Vaz-Oliani DCM, Oliani AH, Mattos LC. Seropositivity rates for toxoplasmosis , rubella , syphilis , cytomegalovirus , hepatitis and HIV among pregnant women receiving care at a Public Health Service , São Paulo State ,

Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2010;14(6):601–5.

12. Alfonso Y, Fraga J, Jiménez N, Fonseca C, Dorta-Contreras AJ, Cox R, et al. Detection of *Toxoplasma gondii* in cerebrospinal fluid from AIDS patients by nested PCR and rapid identification of type I allele at *B1* gene by RFLP analysis. *Exp Parasitol.* 2009;122(3):203–7.
13. Bastien P, Procop GW, Reischl U. Quantitative real-time PCR is not more sensitive than “conventional” PCR. *J Clin Microbiol.* 2008;46(6):1897–900.
14. Bou N, Figueroa MS, Marti P, Microbiologi S De. Value of PCR for Detection of *Toxoplasma gondii* in Aqueous Humor and Blood Samples from Immunocompetent Patients with Ocular Toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 1999;37(11):3465–8.
15. Mattos CCB, Meira CS, Ferreira AIC, Frederico FB, Hiramoto RM, Jr GCA, et al. Contribution of laboratory methods in diagnosing clinically suspected ocular toxoplasmosis in Brazilian patients. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;70(3):362–6.
16. Svensson L, Petersson A, Henry S. Secretor genotyping for A385T, G428A, C571T, C628T, 685delTGG, G849A, and other mutations from a

- single PCR. *Immunohematology*. 2000;40(July):856–60.
17. Okay TS, Yamamoto L, Oliveira LC, Manuli ER, Andrade Junior HF De, Del Negro GMB. Significant performance variation among PCR systems in diagnosing congenital toxoplasmosis in São Paulo, Brazil: analysis of 467 amniotic fluid samples. *Clinics*. 2009;64(3):171–6.
  18. Gunel T, Kalelioglu I, Ermis H, Has R, Aydinli K. Large scale pre-diagnosis of *Toxoplasma gondii* DNA genotyping by real-time PCR on amniotic fluid. *Biotechnol Biotechnol Equip*. 2012;26(2):2913–5.
  19. Su C, Shwab EK, Zhou P, Zhu XQ, Dubey JP. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*. 2010 Jan [cited 2015 May 25];137(1):1–11.
  20. Pena HFJ, Gennari SM, Dubey JP, Su C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *Int J Parasitol*. 2008;38(5):561–9.
  21. Guy EC, Joynson DH. Potential of the polymerase chain reaction in the diagnosis of active *Toxoplasma* infection by detection of parasite in blood. *J Infect Dis*. 1995;172(1):319–22.



22. Räisänen S. Toxoplasmosis transmitted by blood transfusions. *Transfusion*. 1978;18(3):329–32.
23. Teixeira LE, Kanunfre KA, Shimokawa PT, Targa LS, Rodrigues JC, Domingues W, et al. The performance of four molecular methods for the laboratory diagnosis of congenital toxoplasmosis in amniotic fluid samples. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013;46(May):0.
24. Mesquita, Rafael Tonini, Vidal, José Ernerto, Pereira-Chioccola VL. Molecular diagnosis of cerebral toxoplasmosis : comparing markers that determine *Toxoplasma gondii* by PCR in peripheral blood from HIV-infected patients. *Braz J Infect Dis*. 2010;346–50.
25. Ferreira IMR, Vidal JE, de Mattos CDCB, de Mattos LC, Qu D, Su C, et al. *Toxoplasma gondii* isolates: multilocus RFLP-PCR genotyping from human patients in Sao Paulo State, Brazil identified distinct genotypes. *Exp Parasitol*. 2011;129(2):190–5.
26. Chiang T-Y, Hsieh H-H, Kuo M-C, Chiu K-T, Lin W-C, Fan C-K, et al. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* Infection among Healthy Blood Donors in Taiwan. *PLoS ONE*. 2012. p. e48139.

27. Mahmoudvand H, Dezaki ES, Soleimani S, Reza M, Kheirandish F, Ezatpour B, et al. Seroprevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection among healthy blood donors in southeast of Iran. *Parasite Immunol.* 2015;
28. Sarkari B, Shafiei R, Zare M, Sohrabpour S, Kasraian L. Seroprevalence and molecular diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection among blood donors in southern Iran. *J Infect Dev Ctries.* 2014;8:543–7.
29. Zainodini N, Zare-Bidaki M A. Molecular and Serological Detection of Acute and Latent Toxoplasmosis Using Real-Time PCR and ELISA Techniques in Blood Donors of Rafsanjan City, Iran, 2013. *Iran J Parasitol.* 2014;9(3):336–41.
30. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev MolDiagn.* 2005;209–19.
31. Brenier-Pinchart M-P, Capderou E, Bertini R-L, Bailly S, Fricker-Hidalgo H, Varlet-Marie E, et al. Molecular diagnosis of toxoplasmosis: value of the buffy coat for the detection of circulating *Toxoplasma gondii*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015;82(4):289–91.
32. Bourdin C, Busse A, Kouamou E, Touafek F, Bodaghi B, Hoang P Le, et

- al. PCR-Based Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in Blood and Ocular Samples for Diagnosis of Ocular Toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 2014;52(11):3987–91.
33. Nguyen TD, Kesel MDE, Bigaignon G, Hoet P, Pazzaglia G, Lammens M, et al. Detection of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites and Bradyzoites in Blood , Urine , and Brains of Infected Mice. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1996;3(6):635–9.

Tabela 5. Resultados da sorologia, qPCR e genotipagem das 34 amostras

Nested positiva para o gene *B1* do *T. gondii*

Perfil sorológico	Nested PCR positivo		qPCR positivo		Genótipagem
	N	%	N	%	
IgM-IgG-	23	67,6	0	0,0	Não determinado
IgM+IgG-	0	0,0	0	0,0	-
IgM-IgG+	10	29,4	0	0,0	Não determinado
IgM+IgG+	1	2,9	0	0,0	Não determinado
Total	34	100,0	0	0,0	

N = Número; qPCR = PCR em tempo real.

Tabela 6. Resultados das análises moleculares e sorológicas das amostras de receptores que foram transfundidos por hemocomponentes com suspeitas de parasitemia

Amostras de Receptores	Tipo de amostra	Nested PCR	qPCR	Genótipo	Sorologia
01	Pré transfusional	Negativo	Negativo	-	IgM-IgG+
02	Pré transfusional	Negativo	Negativo	-	IgM-IgG-
03	Pré transfusional	Negativo	Negativo	-	IgM-IgG+
04	Pré transfusional	Positivo	Negativo	N/D	IgM-IgG-
05	Pré transfusional	Negativo	Negativo	-	N/R
06	Pós transfusional	Negativo	Negativo	-	IgM-IgG-
07	Pré transfusional	Negativo	Negativo	-	IgM-IgG-
08	Pré transfusional	Negativo	Negativo	-	IgM-IgG+
09	Pós transfusional	Negativo	Negativo	-	IgM-IgG+
10	Pré transfusional	Negativo	Negativo	-	IgM-IgG+
11	Pós transfusional	Negativo	Negativo	-	N/R
12	Pós transfusional	Negativo	Negativo	-	IgM-IgG+
13	Pré transfusional	Negativo	Negativo	-	IgM-IgG-
14	Pré transfusional	Negativo	Negativo	-	IgM-IgG+
15	Pós transfusional	Negativo	Negativo	-	IgM-IgG+
16	Pós transfusional	Negativo	Negativo	-	IgM-IgG+

N/R = Não Realizado; N/D= Não determinado; qPCR = PCR em tempo real.

Tabela 7. Avaliação dos quatros casos de receptores que receberam hemocomponentes com resultado Nested PCR positivo

Hemoc. Transfundido	Dados do hemoc. transfundido			Análise Pré-transfusional			Análise Pós Transfusional		
	OS	Nested	qPCR	PS	Nested	qPCR	PS	Nested	qPCR
PT	*IgM-IgG+ e IgM-IgG-	Pos.	Neg.	IgM-IgG+	Neg.	Neg.	IgM-IgG+	Neg.	Neg.
PT	IgM-IgG-	Pos.	Neg.	IgM-IgG+	Neg.	Neg.	IgM-IgG+	Neg.	Neg.
CH	IgM-IgG-	Pos.	Neg.	IgM-IgG+	Neg.	Neg.	IgM-IgG+	Neg.	Neg.
CH	IgM-IgG-	Pos.	Neg.	IgM-IgG+	Neg.	Neg.	IgM-IgG+	Neg.	Neg.

Hemoc.=Hemocomponente; PS=Perfil sorológico; PT=Plaqueta; CH=Concentrado de hemácias. Neg=Negativo; Pos=Positivo; qPCR = PCR em tempo real. \*Receptor recebeu duas bolsas com resultado Nested positivo de doadores diferentes.

### *3. Conclusões*

---

1. A prevalência sorológica de infecção entre doadores de sangue da região noroeste paulista é elevada. Os fatores de risco associados a presença de anticorpos anti-*T. gondii* da classe IgG foram: a média de idade avançada, o hábito de consumir carne bovina e suína mal passada ou crua, a ingestão de leite cru, a presença frequente de vetores mecânicos (baratas, moscas e ratos) na residência, a baixa condição econômica, o baixo nível de escolaridade e residir em zona rural.
2. Considerando os resultados da qPCR, não há evidências moleculares de parasitemia entre os doadores analisados, portanto, a transmissão via transfusional parece não ocorrer nesta região.
3. Após a obtenção dos resultados não reagente durante a avaliação da soroconversão de sete doadores de sangue, que foram classificados inicialmente com sorologia não reagente e Nested PCR positivo, concluímos que este método produz resultados falso-positivos com frequência.
4. Além dos resultados observados durante a investigação da soroconversão, o insucesso da genotipagem do *T. gondii* nas amostras positivas para a Nested PCR, apoiou, ainda mais, a interpretação de que estes resultados tratavam-se reações falso-positivas, decorrentes, provavelmente, de contaminações durante a realização destas análises.



## *4. Referências da Introdução*

---

1. Dubey JP. The history of *Toxoplasma gondii* - The first 100 years. J Eukaryot Microbiol. 2008;55(6):467–75.
2. Innes E a. A brief history and overview of *Toxoplasma gondii*. Zoonoses Public Health. 2010;57(1):1–7.
3. Carruthers VB, Carruthers VB. Host cell invasion by the opportunistic pathogen. Microbiol Immunol. 2002;81:111–22.
4. Blader IJ, Coleman BI, Chen C-T, Gubbels M-J. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 Years Later. Annu Rev Microbiol. 2015;69(1):463-485.
5. Robert-Gangneux F, Dardé M-L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. Clin Microbiol Rev. 2012;25(2):264–96.
6. Dubey JP, Lindsay DS. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites , Bradyzoites , and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. Clin Microbiol Rev. 1998;11(2):267–99.
7. Silveira C, Vallochi a L, Rodrigues da Silva U, Muccioli C, Holland GN, Nussenblatt RB, et al. *Toxoplasma gondii* in the peripheral blood of

- patients with acute and chronic toxoplasmosis. *Br J Ophthalmol*. 2011;95(3):396–400.
8. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol*. 2000;30(12-13):1217–58.
  9. Ferguson DJP. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(2):133–48.
  10. Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet*. 2004;363:1965–76.
  11. Siegel SE, Lunde MN, Gelderman AH, Halterman RH, Brown JA, Levine AS, et al. Transmission of Toxoplasmosis by Leukocyte Transfusion. *Blood*. 1971;37(4).
  12. Kimball AC, Kean BH, Kellner A. The risk of transmitting toxoplasmosis by blood transfusion. *Transfusion*. 1965;5(5):447–51.
  13. Dubey JP, Lago EG, Gennari SM, Su C, Jones JL. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology*. 2012;139(11):1375–424.
  14. Vaz RS, Guimarães ATB, Bonanato LD, Thomaz-Soccol V. Technical

- evaluation of serological screening tests for anti-*Toxoplasma gondii* antibodies to prevent unnecessary transfusion risks. Rev Bras Hematol Hemoter. 2008;30(4):277–80.
15. Coêlho RAL, Kobayashi M, Carvalho LB. Prevalence of IgG antibodies specific to *Toxoplasma gondii* among blood donors in Recife, Northeast Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2003;45:229–31.
  16. Weiss LM, Dubey J. Toxoplasmosis: a history of clinical observations. Int J Parasitol. 2009;29(6):997–1003.
  17. Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: Transmission, diagnosis, and prevention. Clin Microbiol Infect. 2002;8(10):634–40.
  18. Passos LN, De Araújo Filho OF, De Andrade HF. Toxoplasma encephalitis in aids patients in são paulo during 1988 and 1991. A comparative retrospective analysis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2000;42(3):141–5.
  19. Montoya JG. Laboratory Diagnosis of *Toxoplasma gondii* Infection and Toxoplasmosis. J Infect Dis. 2002;185:s73–82.
  20. Suzuki LA, Rocha, R, Rossi, C. Evaluation of serological markers for the

- immunodiagnosis of acute acquired toxoplasmosis. JMed Microbiol. 2001;50:62-70.
21. Cordeiro, Cynthia Azeredo, Moreira, Paula Rocha, Dutra, Walderez Ornelas, Young Lucy, Campos, Wesley Ribeiro, Oréface, Fernando, Teixeira Júnior AL. Imunologia da retinocoroidite toxoplásmica. Arq Bras Oftalmol. 2010;73:548–51.
  22. Jula M, Jula FM, Nowzari GKN, Hashemazadeh FH. A Serological and Molecular study on *Toxoplasma gondii* infection in sheep and goat in Tabriz. Razi Intitute. 2013;68(1):29–35.
  23. Kompalic-Cristo A, Britto C, Fernandes O. Diagnóstico molecular da toxoplasmose: revisão. J Bras Patol e Med Lab. 2005;41(4):229–35.
  24. Reischl U, Bretagne S, Krüger D, Ernault P, Costa J. Comparison of two DNA targets for the diagnosis of Toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. BCM Infectious Diseaseas 2003;9:1–9.
  25. Nguyen TD, Kesel MDE, Bigaignon G, Hoet P, Pazzaglia G, Lammens M, et al. Detection of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites and Bradyzoites in Blood , Urine , and Brains of Infected Mice. Clin Diagn Lab Immunol.

1996;3(6):635–9.

26. Tlamçani Z, Lemkhenete Z, Lmimouni BE. Toxoplasmosis : The value of molecular methods in diagnosis compared to conventional methods. JMID 2013;3(2):93–9.
27. Detecção P, Vírus DOS, Na H-EHC V, Sangue TDE. Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde □. 2007;1–9.
28. Sterkers Y, Ribot J, Albaba S, Issert E, Bastien P, Pratlong F. Diagnosis of congenital toxoplasmosis by polymerase chain reaction on neonatal peripheral blood. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011;71(2):174–6.
29. Lajolo C p, Langhi Junior DM, Marques Junior JFC. HIV – Negative ELISA and positive NAT: a reality in Blood Banking. Rev Bras Hematol Hemoter. 2008;30(4):330–4.
30. Stramer SL, Glynn S a, Kleinman SH, Strong DM, Caglioti S, Wright DJ, et al. Detection of HIV-1 and HCV infections among antibody-negative blood donors by nucleic acid-amplification testing. N Engl J Med. 2004;351(8):760–8.
31. Learoyd P. a Short History of blood transfusion. NBS - Sci Tech Train.

2006;042:1–18.

32. Razouk FH, Reiche EM V. Caracterização, produção e indicação clínica dos principais hemocomponentes. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2004;26(2):126–34.
33. Hajjar LA, Octávio J, Auler C, Santos L, Galas F. Review Blood Tranfusion in Critically Ill Patients: State of the Art. *Clinics.* 2007;62(4):507–24.
34. Wendel Neto S. Current concepts on the transmission of bacteria and parasites by blood components. *São Paulo Med J.* 1995;113(6):1036–52.
35. Lopes, Maria Sueli S. N., & Proietti ABFC. HTLV-1/2 transfusional e hemovigilância: a contribuição dos estudos de look-back. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2008;30(3):229–40.
36. Saúde M da. Portaria MS nº 1.353, de 13.06.2011 - DOU 1 de 14.06.2011. 2011.
37. Moor A, Dubbelman T, VanSteveninck J, Brand A. Transfusion-transmitted disease: risk, prevention and perspectives. *Eur J Haematol.* 1999;62(1):1–18.

38. Anvisa. Portaria nº112, de janeiro de 2004. Ministério da Saúde 2004 p. 29–31.
39. Molina AL, Toba PR. Série - Biologia molecular Atualização Parte 2 - Uso das técnicas de biologia molecular para diagnóstico. Einstein 2004;2(2):139–42.
40. Miller MB. Molecular diagnosis of infectious diseases. NC MED J. 2007;68(2):115–8.
41. Brandão ABDM, Fuchs SC, Silva MADA, Emer LF. Diagnóstico da hepatite C na prática médica: revisão da literatura. Rev Panam Salud Pública. 2001;9(4):161–8.
42. Nelson J, Kauffmann D, Ciavarella D, WJ S. Acquired toxoplasmic retinochoroiditis after platelet transfusions. Ann Ophthalmol. 1989;21(7):253–4.
43. Alfonso Y, Fraga J, Jiménez N, Fonseca C, Dorta-Contreras AJ, Cox R, et al. Detection of *Toxoplasma gondii* in cerebrospinal fluid from AIDS patients by nested PCR and rapid identification of type I allele at *B1* gene by RFLP analysis. Exp Parasitol. 2009;122(3):203–7.



44. Bastien P, Procop GW, Reischl U. Quantitative real-time PCR is not more sensitive than “conventional” PCR. *J Clin Microbiol.* 2008;46(6):1897–900.
  
45. Bou N, Figueroa MS, Marti P, Microbiologi S De. Value of PCR for Detection of *Toxoplasma gondii* in Aqueous Humor and Blood Samples from Immunocompetent Patients with Ocular Toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 1999;37(11):3465–8.

## *5. Anexos*

---

## Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



### FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Autarquia Estadual - Lei n.º 8899 de 27/09/94  
(Reconhecida pelo Decreto Federal n.º 74.179 de 14/06/74)

---

Parecer n.º 006/2011

#### COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Protocolo n.º 6531/2010 sob a responsabilidade de Luiz Carlos de Mattos, com o título "Investigação sorológica e molecular de Toxoplasma gondii em doadores de sangue" está de acordo com a Resolução do CNS 196/96 e foi **aprovado por esse CEP**.

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

São José do Rio Preto, 03 de janeiro de 2011.



Prof. Dr. Fernando Batigália  
Coordenador do CEP/FAMERP

## Anexo 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido

### FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Conselho Nacional de Saúde - Resolução CNS 196/96)

Você esta sendo convidado (a) a participar da pesquisa denominada “**Investigação sorológica e molecular de *Toxoplasma gondii* em doadores de sangue**”, aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FAMERP (parecer 006/2011). O *Toxoplasma gondii* é o parasita causador da toxoplasmose. Essa doença pode ser transmitida aos seres humanos pelo contato com fezes contaminadas de gato, pelo consumo de carne crua de animais, por transplante e órgãos sólidos e medula óssea. Essa pesquisa tem como objetivo triar pelo sangue periférico a presença do *T. gondii* nos doadores selecionados com e sem sorologia reagente para avaliar os riscos da transmissão deste protozoário por meio da doação de sangue. A sua participação nessa pesquisa é voluntaria, podendo se retirar a qualquer momento. Para participar como voluntario (a) nessa pesquisa será necessário:

1. Responder um questionário sobre você e seus hábitos de vida. Todas as informações a seu respeito serão mantidas em absoluto sigilo.
2. Autorizar-nos a colher uma amostra de seu sangue para exames da toxoplasmose. A coleta de sangue é realizada com a introdução de uma agulha estéril na veia e de acordo com a sua sensibilidade, você poderá sentir uma leve ardência no local. O risco da coleta de sangue poderá incluir vermelhidão e raramente deixa o local de introdução da agulha inchado e com manchas roxas. O seu sangue será utilizado apenas para análises científicas e fará parte do banco de amostra do Laboratório de Imunogenética da FAMERP. Você deve saber que não haverá riscos de qualquer tipo de contaminação durante a coleta de seu sangue, pois o material utilizado será individual e não contaminado. Esse material é totalmente estéril (seringa, agulha, algodão com álcool) e único para cada pessoa. Após a coleta de seu sangue, as agulhas, seringas e algodão utilizados serão colocados em saco de lixo e descartados em local seguro. Esses procedimentos serão realizados por profissionais com experiência. Você será informada (o) de todos os resultados dos exames que serão realizados em seu sangue e eles serão mantidos em absoluto sigilo. Se essa pesquisa for encerrada antes do período previsto, você também será informado (a).

Se você tiver qualquer dúvida sobre essa pesquisa ou mesmo sobre lesões relacionadas a coleta de sangue, entre em contato com o Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos pelo telefone ou pelo endereço abaixo indicados. Caso você tenha qualquer dúvida sobre seus direitos como sujeito de pesquisa, você também pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da

Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, pelo telefone (17) 3201-5813. Você receberá uma cópia deste formulário de consentimento livre e esclarecido assinado e datado.

**Declaração do sujeito da pesquisa**

Eu voluntariamente aceito participar da pesquisa "**Investigação sorológica e molecular de *Toxoplasma gondii* em doadores de sangue**". Li e compreendi essa declaração de consentimento livre e esclarecido, os riscos descritos, assim como estou ciente que a amostra comporá um banco de amostra do Laboratório de Imunogenética da FAMERP, podendo ser utilizada para outras pesquisas. Entendo que posso retirar meu consentimento ou retirar-me dessa pesquisa a qualquer momento, sem perder nenhum benefício aos quais tenho direito.

..... de ..... de .....

-----  
Responsável pela discussão do  
consentimento livre e esclarecido

-----  
Assinatura do sujeito da pesquisa ou seu  
representante legal

-----  
Pesquisador responsável

**Endereço para contato:**

Laboratório de Imunogenética

Departamento de Biologia Molecular - Faculdade de Medicina de S J do Rio Preto

Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416

São José do Rio Preto - 15090-000

**Fones: (17) 3201-5854 (Faculdade)**

## Anexo 3 – Ficha de dados Epidemiológicos

Data da coleta:		Código da amostra:		Registro do Doador no Hemocentro:				
Nome:								
Local de Nascimento:						Idade:		
Endereço atual:						Nº:		
Cidade:			Estado:		Telefone:			
Você contraiu algumas dessas doenças infecto-parasitárias?								
	Si m	Não		Sim	Não		Sim	Não
HTLV I/II			Malária			Sarampo		
Sífilis			Citomegalovírus			Catapora		
Chagas			Toxoplasmose			Outras:		
Hepatite viral			Rubéola			Outras:		
Dados clínicos:				S	N			
Você tem habito de tomar leite cru?						Qual?		
Você carne crua ou mal passada de qualquer animal?						Qual?		
Você lava bem os legumes e as verduras?								
Você tem o hábito de andar descalço no solo?								
Você tem ou já teve animal doméstico?						Qual?		
Você já recebeu transfusões sanguíneas?						Quando? Por quê?		
Há quanto tempo você é doador de sangue?								
Você já fez algum tipo de cirurgia?						Qual?		
Você faz uso de algum tipo de medicamento?						Qual? Quanto tempo?		
Você viajou nos últimos seis meses?						Onde?		
Você ficou resfriado nos últimos seis meses?								
Você sabe seu tipo sanguíneo e seu fator Rh?						Qual?		
Você teve gravidez anterior?						Quantas?		
Você teve filho prematuro?						Quando?		
Você teve filho com algum tipo de síndrome?						Qual?		
Você teve algum aborto						Quantos?		
Dados ambientais:								
Você mora em zona: ( ) urbana ( ) rural								
Qual tipo de moradia: ( ) alvenaria ( ) madeira ( ) outro <small>especificar</small>								
( ) própria ( ) alugada ( ) cedida ( ) outro <small>especificar</small>								
Tem rede de esgoto: ( ) sim ( ) não Se não qual tipo? ( ) fossa ( ) outro <small>especificar</small>								
Você bebe água: ( ) filtrada ( ) fervida ( ) torneira								
Qual é o destino do lixo: ( ) coleta pública ( ) outro <small>especificar</small>								
Onde você mora tem: ( ) ratos ( ) baratas ( ) moscas								
Qual é o seu nível de escolaridade?								
Qual é a renda familiar em salários mínimos? ( ) 1 ( ) 2 ( ) 3 ( ) 4 ( ) acima de 4.								
Etnia: Paciente:		Pai:		Mãe:				

Obs: