

U. PORTO



FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

Revisão bibliográfica sobre toxoplasmose humana

Vicky Bakk

Monografia do 2º Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre em Análises Clínicas

Trabalho realizado sob a orientação do Professor Doutor

Miguel Freire de Albuquerque Ferreira Cabral

Setembro, 2012

Declaração de reprodução:

É autorizada a reprodução integral desta monografia apenas para efeitos de investigação mediante declaração escrita do interessado, que a tal se compromete.

Agradecimentos.

No âmbito desta monografia, gostaria de agradecer a todas as pessoas que contribuíram para a elaboração da mesma:

Antes de mais, ao Professor Doutor Miguel Freire de Albuquerque Ferreira Cabral, meu orientador neste trabalho, pelo valioso contributo e empenho na minha formação, bem como, pela disponibilidade e paciência demonstradas.

Ao Professor Doutor Agostinho Franklim Pinto Marques, bem como a todo o painel de professores do Mestrado em Análises Clínicas pelos conhecimentos transmitidos ao longo do meu percurso académico.

Gostaria de tecer um agradecimento, particularmente especial, à Sara Soares e à Isabel Gonçalves, pela colaboração em todas as etapas deste trabalho.

E, por fim, a todos os meus familiares e amigos, que sempre me transmitiram todo o seu apoio incondicional e que acreditaram desde o início que seria possível a concretização deste trabalho.

A todos, os meus sinceros e profundos agradecimentos.

Resumo.

Esta revisão bibliográfica sobre toxoplasmose na espécie humana tem como principal foco a abordagem dos diferentes quadros de sintomatologia apresentados pelos pacientes infetados por *Toxoplasma gondii*, bem como as metodologias mais comumente utilizadas no diagnóstico da infeção e tratamento de cada caso específico. Como tal, são expostos, no final do trabalho, alguns casos clínicos que evidenciam todos os aspetos expostos na primeira parte do trabalho.

A toxoplasmose é uma doença causada pelo parasita Apicomplexa *Toxoplasma gondii*, cujo desenvolvimento sexual ocorre exclusivamente nos membros da família *Felidae*, no entanto todos os animais homeotérmicos podem ser hospedeiros intermediários do parasita, incluindo o Homem. No ser humano a infeção é normalmente assintomática em indivíduos imunocompetentes, embora quadros clínicos mais severos possam ocorrer em infeções congénitas ou em indivíduos imunodeprimidos. Podem ser utilizados vários métodos para diagnosticar a infeção, através da deteção direta do parasita ou do seu ADN, ou de métodos serológicos, os últimos mais comumente utilizados. Nos últimos anos foram desenvolvidas e aperfeiçoadas inúmeras ferramentas técnicas de genotipagem, importantes na caracterização genética de estirpes de *Toxoplasma gondii*. Contudo, a elaboração de estudos genéticos requer o isolamento prévio do parasita ou do seu ADN a partir de amostras biológicas, o que normalmente só é possível em pacientes sintomáticos. Embora a estrutura genética das populações de *T. gondii* seja altamente variável, na América do Norte e Europa predominam as estirpes I, II e III, enquanto noutras partes do globo, como na América do Sul ou África, estirpes recombinantes ou atípicas são associadas a casos de toxoplasmose ocular e manifestações clínicas severas da infeção em indivíduos imunocompetentes. O tratamento da toxoplasmose passa, sobretudo, pela administração de sulfonamidas e pirimetamina, que podem ser combinadas com outros tipos de drogas, consoante os casos. As drogas são utilizadas como forma de tratamento da infeção apesar de não possuírem a capacidade de erradicar quistos teciduais do parasita.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, toxoplasmose, infeção, genótipo, estirpe.

Abstract.

This bibliographic revision about toxoplasmosis in human species has his main focus on the approach of the different symptomatology frameworks presented by patients infected by *Toxoplasma gondii*, as well as the methodologies most commonly used in the diagnosis and treatment of this infection in each specific case. They are exposed at the end of this work, some clinical cases which show all aspects exposed in the first part of this work.

Toxoplasmosis is a disease caused by the parasite Apicomplexa *Toxoplasma gondii*, whose sexual development exclusively occurs in the members of the family *Felidae*. However all homoeothermic animals can be an intermediate host of the parasite, including Humans. In human beings this infection is usually asymptomatic in immunocompetent individuals, although they can occur more severe clinical infections in congenital or in immunocompromised individuals. Various methods can be used to diagnose the infection, by direct detection of the parasite or their DNA, or by serologic methods, the latest more commonly used. In recent years they have been developed and refined numerous technical tools of genotyping, which are important in the genetic characterization of *Toxoplasma gondii* strains; however the development of genetic studies require the prior isolation of the parasite or their DNA from biological samples, which only is normally possible in symptomatic patients. Although the genetic structure of the populations of *T. gondii* is highly variable, in North America and Europe dominate the strains I, II and III, while in other parts of the globe, such as South America or Africa, recombinant or atypical strains are associated with ocular toxoplasmosis cases and severe clinical manifestations of infection in immunocompetent individuals. Mainly the treatment of toxoplasmosis passes by administration of pyrimethamine and sulfonamides, which may be combined with other types of drugs, as appropriate to the different cases. The drugs are used as a treatment of the infection; however, they do not have the ability to eradicate the tissue cysts of the parasite.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, toxoplasmosis, infection, genotype, strain

Índice.

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vii
Índice de figuras	xi
Lista de abreviaturas e símbolos	xiii
1. Enquadramento histórico	15
2. Ciclo de vida	17
2.1. Taquizoito	19
2.2. Quistos teciduais	20
2.3. Oocistos	21
3. Epidemiologia	23
4. Vias de contaminação, aspectos clínicos e de tratamento da toxoplasmose em seres humanos	27
4.1. Indivíduos imunocompetentes	28
4.2. Indivíduos imunocomprometidos	29
4.3. Infeção pré-natal e toxoplasmose congénita (TC)	29
4.4. Toxoplasmose ocular (TO)	30
4.5. Desordens psiquiátricas	31
5. Métodos de Diagnóstico	32
5.1. Antígenos de <i>T. gondii</i>	34
5.1.1. Proteínas SAG	34
5.1.2. Proteínas MIC	35
5.1.3. Proteínas ROP	35
5.1.4. Proteínas GRA	36
5.2. Genotipagem <i>T. gondii</i>	36
Parte II	39
Caso clínico 1: Toxoplasmose num paciente imunocompetente	39
Caso clínico 2: Toxoplasmose durante a gravidez	41
Caso clínico 3: Toxoplasmose congénita em gémeos dizigóticos	43
Caso clínico 4: Encefalite toxoplásmica (ET) num paciente portador do vírus VIH ...	45
Caso clínico 5: Encefalite toxoplásmica grave com genótipo recombinante I/III num paciente portador de VIH	47
Caso clínico 6: Toxoplasmose cerebral e medular	50
Caso clínico 7: Hepatite toxoplásmica em paciente imunocompetente	52

Caso clínico 8: Uveíte toxoplásmica	54
Conclusão	56
Bibliografia	57
Relatório de Estágio Laboratório de Análises Clínicas de Rotina	71

Índice de figuras.

Figura 1. Ciclo de vida <i>Toxoplasma gondii</i>	17
Figura 2. Representação esquemática geral da morfologia de um taquizoito de <i>Toxoplasma gondii</i>	20
Figura 3. Quisto tecidual extraído do cérebro de ratinho com 14 meses, após infeção por <i>T. gondii</i> , contendo bradizoitos no seu interior	21
Figura 4. Oocistos de <i>T. gondii</i>	22
Figura 5. Taxa de notificação de casos de toxoplasmose por sexo e idade na UE e EEE/EFTA	24
Figura 6. Número e taxas de notificação de casos reportados na UE e EEE/EFTA	25
Figura 7. Evolução das imunoglobulinas G e M após infeção por <i>T. gondii</i>	33

Lista de abreviaturas e símbolos.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ALP: Fosfatase alcalina.

ALT: Alanina Transaminase.

AST: Aspartato transaminase.

CD4: *Cluster of differentiation 4.*

CD8: *Cluster of differentiation 8.*

CDC: *Centers for disease control and prevention.*

CHCM: Concentração de hemoglobina corpuscular média.

cm: Centímetro.

CMV: Citomegalovírus.

dL: Decilitro.

EEE: Espaço económico europeu.

EFTA: European Free Trade Association.

ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay.*

ET: Encefalite toxoplásmica.

g: Grama.

Gb: Glóbulos brancos.

GGT: Gama-glutamil transpetidase.

GRA: *Dense granule proteins.*

HAART: *Highly active antiretroviral therapy.*

Hb: Hemoglobina.

IgA: Imunoglobulina A.

IgG: Imunoglobulina G.

IgM: Imunoglobulina M.

kDa: kilodalton.

L: Litro.

LCR: Líquido cefalorraquidiano.

LDH: Lactato desidrogenase.

Lf: Linfócitos.

MIC: *Microneme proteins.*

mL: Mililitro.

mm³: Milímetro cúbico.

MS: Microssatélites.

PCR: *Polymerase chain reaction.*

PI: Plaquetas.

RFLP: *Restriction fragment length polymorphism*.

RMN: Ressonância magnética nuclear.

RNA: *Ribonucleic acid*; ácido ribonucleico.

RON: Proteínas das róptrias localizadas na parte anterior do organelo.

ROP: *Rhoptry proteins*.

SAG: *Surface antigens*.

SIDA: Síndrome da imunodeficiência adquirida.

SNC: Sistema nervoso central.

SRS: *SAG-related sequences*.

TC: Toxoplasmose congénita.

TO: Toxoplasmose ocular.

UE: União europeia.

UI: Unidades internacionais.

UV: Ultravioleta.

VDRL: *Venereal disease research laboratory*.

VGM: Volume globular médio.

VIH: Vírus da imunodeficiência humana.

VP: Vacúolo parasitóforo.

VR: Valor de referência.

VS: Velocidade de sedimentação.

TC-CE: Tomografia computadorizada crânio-encefálica.

µL: Microlitro.

µm: Micrómetro.

1. Enquadramento histórico

Em 1908, o *Toxoplasma gondii* foi descrito, pela primeira vez, por Nicole e Manceaux, em células mononucleares do fígado e do baço de um roedor do Norte de África – *Ctenodactylus gundii*. Nesse ano, no Brasil, Splendore isolou o mesmo parasita a partir de um coelho cuja morte foi causada por uma paralisia (Halonen & Weiss, 2009). A nomenclatura do género foi atribuída por Nicole e Manceaux e tem origem na palavra grega “toxon”, que significa arco e na palavra “plasma” que significa criatura (Weiss & Dubey, 2009).

No entanto, o modo de transmissão do parasita era desconhecido até então (Dubey, 2009).

O primeiro caso associado à infeção por *T. gondii* na espécie humana foi descrito por Janku, em Praga, em 1923, na retina de uma criança com infeção congénita que apresentava hidrocefalia e microftalmia (Tenter *et al.*, 2000). Em 1928, Levaditi sugeriu, com base neste caso, uma associação entre a hidrocefalia congénita e a toxoplasmose. Em 1937, Wolf e Cowen descreveram um caso fatal de encefalite granulomatosa infantil, relacionada com a toxoplasmose por Sabin e Olitski, permitindo afirmar o *T. gondii* como a causa da doença congénita (Dubey, 2009).

Em 1940, foi descrito, por Pinkerton e Weinman, o primeiro caso de toxoplasmose adquirida num jovem adulto. Em 1948, foi implementado, pelas mãos de Sabin e Feldman, o teste serológico mais específico para toxoplasmose humana, o “dye test” (Tenter *et al.*, 2000).

A tétrada de sintomas da infeção congénita foi completamente descrita em 1952 por Sabin e seus colaboradores. Este quadro sintomático inclui: hidrocefalia, retinocoroidite, microcefalia, calcificação cerebral ou distúrbios psicomotores. (Tenter *et al.*, 2000). Apenas em 1969, aquando da descoberta de oocistos nas fezes de felinos por Hutchison, foi apurado que o gato se tratava do hospedeiro definitivo (Dubey, 2009). No entanto, e apesar de toda a descoberta feita até então, apenas em 1970, pelas mãos da equipa de Frenkel, foi possível descrever todo o ciclo de vida do *T. gondii*, incluindo a descrição da fase sexual do ciclo no interior do intestino delgado do gato. Por fim, entre 1981 e 1982, foram descritos casos de toxoplasmose cerebral em pacientes infetados com o VIH (Tenter *et al.*, 2000).

Antes de 1983, a toxoplasmose com envolvimento cerebral era considerada muito rara. Contudo, com a pandemia da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) que se verificou na mesma década, este quadro mudou. Um dos avanços significativos, indiretamente relacionado com a toxoplasmose, foi o contributo da *highly active*

antiretroviral therapy (HAART) fazendo diminuir significativamente os casos de neurotoxoplasmose em indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência humana (VIH), ao fortalecer o sistema imunológico dos pacientes, evitando reativações da infecção toxoplásmica (Boothroyd, 2009).

Na década de 90, estudos genéticos revelaram que, para além das diferenças estruturais, as várias fases de desenvolvimento do *T. gondii* são antigenicamente e bioquimicamente adequadas aos seus respectivos papéis na transmissão (Boothroyd, 2009).

Nos últimos 25 anos, o grande incremento dos estudos da genética dos seres vivos proporcionou avanços importantes no conhecimento dos constituintes do *T.gondii* (Soete, *et al.*, 1993) e das suas manifestações clínicas (Dubey, 2009), bem como do diagnóstico laboratorial da infecção (Boothroyd, 2009).

2. Ciclo de vida

Toxoplasma gondii, protozoário do filo Apicomplexa, é um parasita ubíquo que ocorre em grande parte do mundo, cujo ciclo de vida é facultativamente heteroxeno. (Tenter *et al.*, 2000) O desenvolvimento sexual ocorre exclusivamente no hospedeiro definitivo, nomeadamente em membros da família *Felidae* (ex: gatos domésticos). (Sibley *et al.*, 2009). O seu desenvolvimento assexuado ocorre simultaneamente nos hospedeiros definitivo e intermediário. Todos os animais homeotérmicos, ou seja, mamíferos e aves, domésticos ou silvestres, incluindo o Homem, podem ser hospedeiros intermediários do *T. gondii* (Dubey *et al.*, 1998).

Existem quatro estágios no ciclo de vida do *T. gondii* (Figura 1): taquizoitos (agrupados em grupos ou clones), merozoitos, bradizoitos (quistos teciduais) e esporozoitos (em oocistos). Taquizoitos, bradizoitos e esporozoitos são infetantes, tanto para os hospedeiros intermediários, como para os hospedeiros definitivos (Dubey *et al.*, 1998). Estes podem ser infetados horizontalmente, por ingestão de oocistos infetantes provenientes do meio ambiente, ou por ingestão oral de quistos teciduais contidos na carne crua ou mal cozinhada dos hospedeiros intermediários, ou ainda verticalmente por transmissão transplacentária de taquizoitos. Além disso, muitos hospedeiros podem transmitir taquizoitos através do leite materno para a descendência (Tenter *et al.*, 2000).

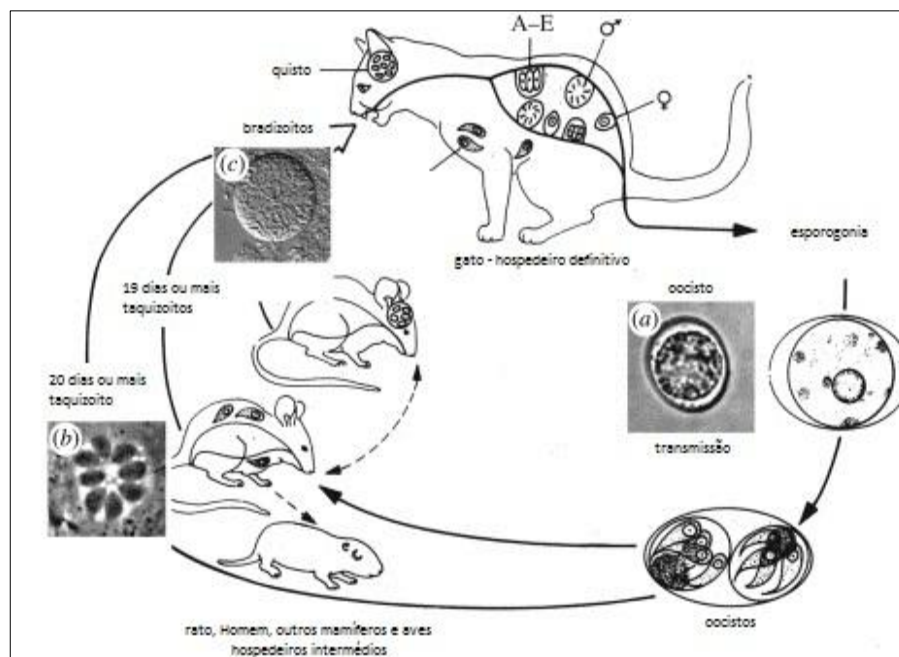


Figura 1. Ciclo de vida *Toxoplasma gondii* (adaptada de Sibley *et al.*, 2009). A-E: estágios de desenvolvimento no interior dos enterócitos; (a) exteriorização de oocistos através das fezes do gato; (b) taquizoitos em proliferação rápida durante a fase aguda da infeção; (c) quistos teciduais contendo bradizoitos transmitidos assexuadamente após ingestão oral de uma grande variedade de hospedeiros intermediários.

O ciclo de vida do *T. gondii* no hospedeiro definitivo difere do ciclo de vida nos hospedeiros intermediários. Nestes, o *T. gondii* passa por duas fases de desenvolvimento assexuado. Na primeira fase de desenvolvimento, ocorre a multiplicação rápida dos taquizoitos por um processo de endodiogenia repetida em vários tipos de células do hospedeiro. Na segunda fase, os taquizoitos de última geração sofrem uma conversão para o desenvolvimento de bradizoitos, na qual resulta a formação de quistos teciduais. No interior dos quistos teciduais, os bradizoitos multiplicam-se lentamente por endodiogenia. (Dubey *et al.*, 1998). Os quistos teciduais localizam-se predominantemente no sistema nervoso central (SNC), no tecido ocular, bem como nos músculos cardíaco e esquelético, no entanto podem ser encontrados também em órgãos viscerais, tais como, pulmões, fígado, rins, etc. (Dubey *et al.*, 1998). Os quistos teciduais são o estágio terminal do ciclo de vida dos hospedeiros intermediários e são imediatamente infetantes. No entanto, quando os bradizoitos são ingeridos por um hospedeiro definitivo, iniciam outra fase assexuada de proliferação (merozoitos) que consiste na multiplicação inicial por endodiogenia, seguida de endopoligenia repetida em células epiteliais do intestino delgado do gato. A proliferação dos merozoitos ocorre nos enterócitos e é limitada a poucas gerações (2-4) dando origem aos estágios sexuais (microgametócitos e macrogametócitos). A gametogonia ocorre com a fusão do gâmeta masculino e feminino que origina o zigoto, após segregação da parede quística. A formação de oocistos tem lugar no epitélio do intestino delgado do gato. Os oocistos não esporulados são libertados no lúmen intestinal e passam para o ambiente através das fezes do animal. A esporogonia, por sua vez, ocorre fora do hospedeiro e leva ao desenvolvimento de oocistos infetantes que contêm dois esporocistos, cada um contendo quatro esporozoitos (Tenter *et al.*, 2000).

Esporozoitos e bradizoitos maduros são estágios não replicativos e o seu principal papel é transmitir a infecção entre hospedeiros, apresentando resistência ao ambiente externo e/ou do trato digestivo do novo hospedeiro (Radke *et al.*, 2003).

2.1. Taquizoito

Os taquizoitos (Figura 2) têm uma forma crescente, aproximadamente de 2 x 6 µm. O termo taquizoito tem origem na palavra grega “tachos”, que significa velocidade, pretendendo descrever a sua grande taxa de multiplicação. Os taquizoitos requerem um habitat intracelular próprio para sobreviverem e multiplicarem-se. Entram na célula hospedeira através do plasmalema por penetração direta ou por fagocitose e multiplicam-se por endodiogenia. Após a entrada na célula hospedeira, os taquizoitos tornam-se ovóides e encontram-se rodeados por um vacúolo parasitóforo (VP) (Dubey *et al.*, 1998).

Na região apical estão localizadas as seguintes estruturas: anéis polares, conóide e róptrias. O núcleo encontra-se situado numa posição central e, acima deste, situam-se o aparelho de Golgi e o apicoplasto (De Souza *et al.*, 2010).

O conóide, as róptrias e os micronemas são estruturas características desta forma parasitária. O conóide está localizado na extremidade polar, tratando-se de um cone cilíndrico, com seis a oito elementos fibrilares dispostos como uma mola comprimida. Devido à capacidade giratória, de distensão e retração desta estrutura, o parasita pode encontrar o melhor local de fixação à célula hospedeira. As róptrias, localizadas no interior do conóide, são essencialmente, quatro a dez estruturas semelhantes a glândulas com um estreito pescoço anterior e uma espécie de saco na outra extremidade. As róptrias têm uma função secretora na penetração na célula hospedeira. Quando o parasita está ligado à célula hospedeira, os seus conteúdos são descarregados através do conóide (Dubey *et al.*, 1998).

Os taquizoitos possuem uma película constituída por três membranas. A membrana interna é descontínua em três áreas, no anel polar (anterior), no microporo (lateral) e na extremidade posterior. Estas interrupções na membrana interna estão envolvidas no processo endocítico da ingestão de macromoléculas. A película está associada a elementos do citoesqueleto o que confere integridade mecânica e capacidade de locomoção, sem que o mesmo necessite de apêndices locomotores (De Souza *et al.*, 2010).

Os micronemas, estruturas semelhantes a tubos, estão situados na extremidade conoidal do parasita e contribuem também para a invasão da célula hospedeira. O parasita contém grânulos densos que segregam proteínas. Os microporos têm como função essencial, a absorção de nutrientes por endocitose (Dubey *et al.*, 1998).

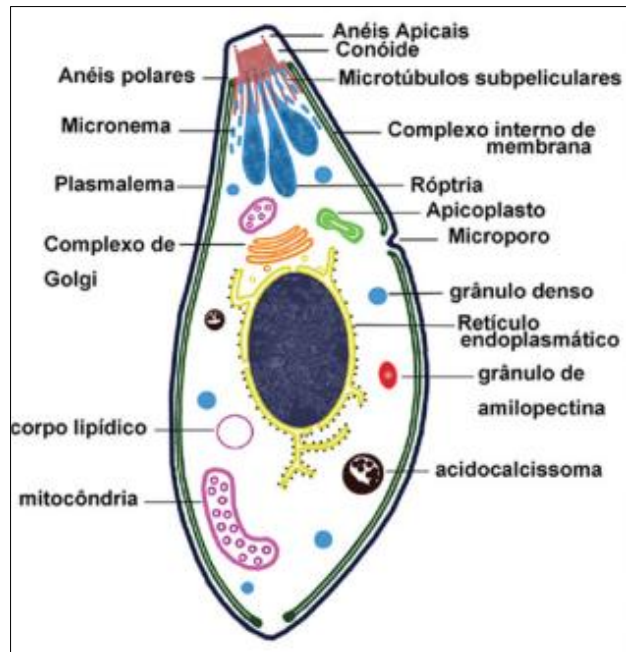


Figura 2. Representação esquemática geral da morfologia de um taquizoito de *Toxoplasma gondii* (De Souza *et al.*, 2010).

2.2. Quistos teciduais

Os quistos (Figura 3) formam-se no interior da célula hospedeira e o seu tamanho é variável, entre 5 a 60 μm no cérebro e 100 μm noutros tecidos. A sua parede mede menos de 0.5 μm . Localizam-se mais comumente no tecido cerebral, ocular e cardíaco e, ainda, no músculo esquelético. Morfologicamente, os quistos localizados no tecido cerebral são geralmente esféricos e, nas fibras musculares do coração e dos músculos esqueléticos, possuem a capacidade de adaptar a sua forma. Os quistos podem conter um número muito variável de bradizoitos. Os quistos teciduais desenvolvem-se e permanecem no interior da célula hospedeira, estando a sua parede intimamente associada ao retículo endoplasmático e à mitocôndria da célula hospedeira. Os quistos teciduais contêm antígenos *T. gondii*. Estas formas parasitárias não possuem resistência ao congelamento e descongelamento, nem ao aquecimento acima de 66°C e à dissecação. No entanto, conseguem sobreviver até 2 meses a 4°C, apesar de os fatores que determinam a sua rutura permanecerem ainda desconhecidos (Dubey *et al.*, 1998).

Em relação à estrutura, os bradizoitos diferem ligeiramente dos taquizoitos. Nos primeiros, o núcleo está localizado na extremidade posterior, enquanto que, nos segundos, situa-se numa posição mais central. Os bradizoitos possuem, ainda, entre uma

a três róprias e vários grânulos de amilopectina, geralmente ausentes nos taquizoitos (Tenter *et al.*, 2000).

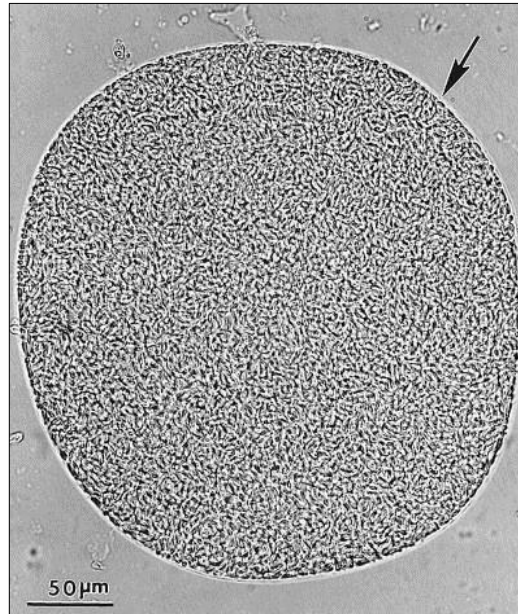


Figura 3. Quisto tecidual extraído do cérebro de ratinho com 14 meses, após infecção por *T. gondii*, contendo bradizoitos no seu interior (Dubey *et al.*, 1998).

2.3 Oocistos

Os oocistos (Figura 4) não esporulados possuem uma forma que pode variar entre sub-esférica a esférica com 10 x 12 μm de diâmetro. Os esporulados variam entre uma forma sub-esférica a elipsóide com 11 x 13 μm de diâmetro. Os oocistos esporulados possuem dois esporozoitos no seu interior que medem 6 x 8 μm . Estes esporocistos dividem-se em quatro esporozoitos, com 2 x 6 a 8 μm , ou seja, os oocistos esporulados contêm oito esporozoitos. A parede dos oocistos esporulados é formada por três camadas, duas delas electronodensas na parte mais externa e interna do quisto e uma camada intermédia (Dubey *et al.*, 1998).

A esporulação dos oocistos pode demorar entre 1 a 21 dias estando dependente da temperatura e oxigénio disponíveis. A esporulação ocorre entre 2 a 3 dias a 24°C, 5 a 8 dias a 15°C e 14 a 21 dias a 11°C. No entanto, este processo não ocorre abaixo dos 4°C ou acima dos 37°C. O tratamento com raios ultravioleta (UV) pode ser um bom método de desinfecção, na medida em que inativa os oocistos na água potável, sendo que uma

exposição mais contínua aos raios UV é muito eficaz na inativação de mais de 99.9% de oocistos de *T. gondii* (Dumètre *et al.*, 2006).

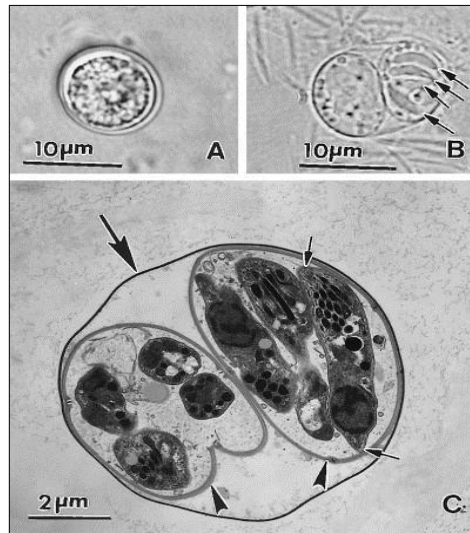


Figura 4. Oocistos de *T. gondii*. (A) oocisto não esporulado. (B) oocisto esporulado com dois esporocistos contendo quatro esporozoitos (setas). (C) oocisto esporulado contendo esporocistos e esporozoitos (Dubey *et al.*, 1998).

3. Epidemiologia

Tendo em consideração a proximidade geográfica, foi utilizado como exemplo o caso da toxoplasmose em território europeu. O panorama epidemiológico europeu da toxoplasmose congénita é bastante heterogéneo. Um estudo efetuado em 28 países acerca de sistemas implementados para a vigilância da toxoplasmose em estados membros (EUROTOXO, 2006) revelou que 11 países têm sistemas de vigilância que só reportam toxoplasmose sintomática (Bulgária, Chipre, República Checa, Estónia, Irlanda, Letónia, Lituânia, Malta, Polónia, Eslováquia e Escócia); 2 países reportam toxoplasmose congénita (Itália, Alemanha); um país reporta toxoplasmose sintomática e congénita (Dinamarca) e os restantes países não têm nenhum sistema de vigilância para toxoplasmose (Portugal, França, Holanda, Bélgica, Noruega, Suécia, Finlândia, Suíça, Malta, Austria, Bósnia, Roménia, Grécia) (EUROTOXO,2006).

Em 2008 (*Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe*, 2010), foram relatados 1788 casos de toxoplasmose em 16 países da União Europeia (UE) e Espaço Económico Europeu (EEE) / European Free Trade Association (EFTA); destes, apenas 1457 casos foram confirmados. Países como o Chipre, Malta, Suécia e Islândia não evidenciaram nenhum caso. A Lituânia teve a maior taxa de toxoplasmose apresentando um valor de 3,5 por 100 000 habitantes, seguida da Eslováquia na qual se verifica um valor de 3,2 por 100 000 habitantes. A taxa de reportes global foi de 0,76 por 100 000 habitantes. Em 916 casos (63% de casos confirmados) estavam disponíveis informações acerca da prevalência nas diferentes faixas etárias. Assim sendo, a faixa etária dos 15-24 anos reporta a taxa mais elevada – 0,93 por 100 000 habitantes. Em 1022 casos (70% de casos confirmados), 30% eram do sexo masculino (308 casos) e 70% do sexo feminino (714 casos). Dever-se-á ter em consideração que o maior número de reportes pode estar relacionado com a triagem relativa à gravidez, o que explica um maior número de reportes no sexo feminino e em mulheres em idade fértil (15-24 anos).

Numa análise global, verifica-se que, as taxas mais elevadas surgem em mulheres na faixa etária dos 15-44 anos de idade (Figura 5) (*Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe*, 2010).

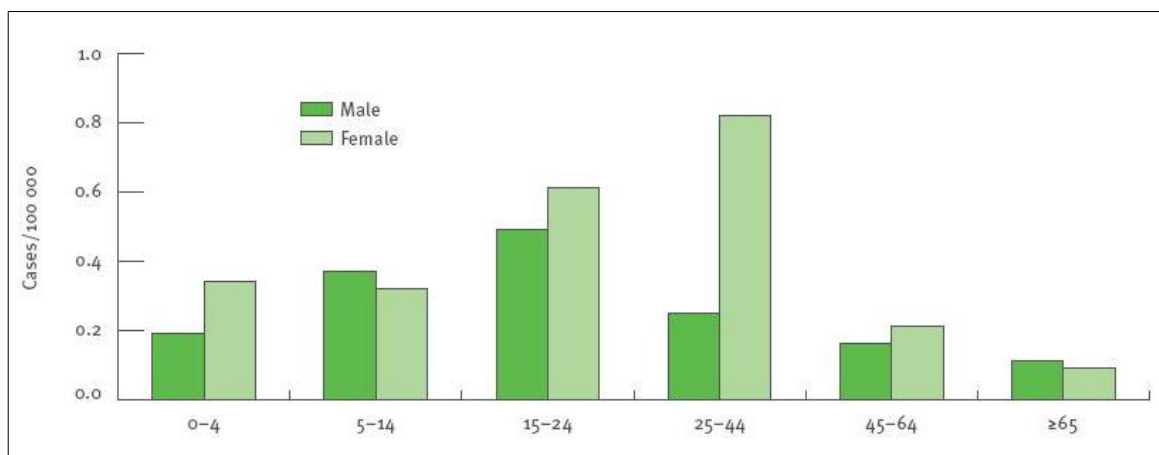


Figura 5. Taxa de notificação de casos de toxoplasmose por sexo e idade na UE e EEE/EFTA (2008), (n=531) – Casos reportados em: Áustria, Bulgária, República Checa, Estónia, Finlândia, Hungria Irlanda, Letónia, Lituânia, Luxemburgo, Roménia, Eslováquia, Eslovénia, Espanha, Reino Unido, Chipre e Malta. (*Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe, 2010*).

Todavia, é complicado apresentar uma análise precisa e global do panorama europeu da toxoplasmose, uma vez que de 30 países que fazem parte da UE e da EEE / EFTA, 11 países não fornecem dados de prevalência de toxoplasmose e outros não fornecem informações detalhadas dos casos. Além disso, a infecção, sendo assintomática, poucas vezes é diagnosticada. O cenário aqui ilustrado constitui mais um esforço para encontrar casos documentados do que propriamente um quadro epidemiológico atual (Figura 6).

Depois de efectuada uma análise comparativa de tendências sazonais de toxoplasmose nos últimos três anos, não foi encontrado qualquer padrão consistente (*Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe, 2010*).

Country	Report type*	2008			2007		2006	
		Total cases	Confirmed cases	Notification rate per 100 000 population	Confirmed cases and notification rate		Confirmed cases and notification rate	
					Cases	Rate	Cases	Rate
Austria	C	1	1	< 0.1	1	< 0.1	—	—
Belgium	—	—	—	—	—	—	—	—
Bulgaria	A	64	64	0.84	113	1.5	3 016	39
Cyprus	C	0	0	0.00	0	0.00	0	0.00
Czech Republic	C	248	248	2.4	228	2.2	328	3.2
Denmark	—	—	—	—	—	—	—	—
Estonia	C	1	1	< 0.1	1	< 0.1	3	0.22
Finland	C	46	46	0.87	36	0.68	0	0.00
France	—	—	—	—	—	—	—	—
Germany	—	—	—	—	—	—	—	—
Greece	—	—	—	—	—	—	—	—
Hungary	C	84	84	0.84	69	0.69	98	0.97
Ireland	C	49	49	1.1	49	1.1	42	1.0
Italy	—	—	—	—	—	—	—	—
Latvia	A	6	6	0.26	9	0.39	4	0.17
Lithuania	A	117	117	3.5	67	2.0	0	0.00
Luxembourg	C	1	1	0.21	0	0.00	0	0.00
Malta	C	0	0	0.00	0	0.00	0	0.00
Netherlands	—	—	—	—	—	—	—	—
Poland	A	514	183	0.48	423	1.1	438	1.2
Portugal	—	—	—	—	—	—	—	—
Romania	A	327	327	1.5	326	1.5	—	—
Slovakia	C	175	175	3.2	253	4.7	303	5.6
Slovenia	C	21	21	1.0	20	0.99	22	1.1
Spain ^(a)	C	1	1	—	—	—	41	—
Sweden	C	0	0	0.00	0	0.00	0	0.00
United Kingdom	C	133	133	0.22	149	0.24	127	0.21
EU total		1 788	1 457	0.76^(b)	1 744	0.91	4 422	2.72^(b)
Iceland	C	0	0	0.00	0	0.00	—	—
Liechtenstein	—	—	—	—	—	—	—	—
Norway	—	—	—	—	—	—	—	—
Total		1 788	1 457	0.76^(b)	1 744	0.91	4 422	2.72^(b)

Figura 6. Número e taxas de notificação de casos reportados na UE e EEE/EFTA (2006-2008) Fonte: relatórios nacionais; A: relatórios de dados agregados; C: relatórios baseados em casos; -: ausência de relatórios; U: não especificados; (a): Sistemas de vigilância baseados num número limitado de laboratórios seleccionados que relataram apenas toxoplasmose congénita; (b): Dados calculados excluindo os dados espanhóis. (Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe, 2010).

Em Portugal, a ausência de uma rede eficiente entre os profissionais de saúde, laboratórios e autoridades de saúde nacionais para a notificação dos casos de toxoplasmose, para além de comprometer em larga escala a recolha e comparação de dados, também enviesa o cenário real da prevalência da infeção. Porém, alguns dados são obtidos em estudos realizados em território nacional.

Segundo Machado *et al.* (2006a), foi feito um levantamento em 7362 gestantes de 48 hospitais que permitiu concluir que 18% das mulheres com serologia negativa não tomaram as precauções necessárias, enquanto que 62,1% das mulheres grávidas com serologia positiva tinham tomado precauções desnecessárias. Relativamente à informação e conhecimento acerca de infeção, 77,3% das mulheres já tinha ouvido falar da toxoplasmose, sendo que a idade também se revelou um fator relevante – 50% das

mulheres com menos de 20 anos de idade não tinha qualquer informação acerca da infeção (Machado *et al.*, 2006b).

No caso de indivíduos imunocomprometidos, um estudo envolvendo 63 pacientes portugueses infetados pelo VIH mostrou uma taxa de infeção de 57% (Ângelo, 2000). Cinco destes pacientes desenvolveram encefalite toxoplásmica (ET). A ET também tem sido relatada em doentes transplantados tratados com drogas imunossupressoras: um caso descrito em 1991, num transplante de medula óssea (Abecassis, 1991) e outro caso em 1994, após transplante renal (Da Cunha *et al.*, 1994).

4. Vias de contaminação, aspectos clínicos e de tratamento da toxoplasmose em seres humanos

Os seres humanos podem adquirir a infecção através de diversas vias: contato com animais domésticos ou selvagens (Sibley, *et al.*, 2009), manipulação de carne crua, ingestão de carne mal cozinhada que contenha quistos teciduais (Choi *et al.*, 1997; Mead *et al.*, 1999; Dawson, 2005) ou ainda através da ingestão de água (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003; Dawson, 2005) ou alimentos contaminados com oocistos provenientes de fezes de gatos infetados (Sibley, *et al.*, 2009).

A expressão da doença causada pelo parasita oportunista *T. gondii* está relacionada com a imunidade e origens genéticas do hospedeiro, sendo que a variação na manifestação da doença pode dever-se a alguns fatores inerentes ao parasita, tais como: a dose de inóculo, o estágio infetante, a via de infecção e o genótipo do parasita. Embora esta infecção seja considerada, na maioria dos casos, assintomática, pode acarretar algumas implicações em pacientes imunocomprometidos, como resultado de uma primo-infecção ou uma predisposição ao risco de reativação de uma infecção crônica (Sibley *et al.*, 2009) e crianças infetadas congenitamente, como resultado de uma primo-infecção da mãe (McLeod *et al.*, 2000).

A estrutura genética das populações de *T. gondii* é altamente variável entre diversas áreas do globo. Na Europa e América do Norte predominam 3 estirpes – I, II, III (Howey & Sibley, 1995). Nos EUA e na Europa, foi reportado que 70% dos casos de toxoplasmose em seres humanos estavam associados a estirpes do tipo II, apesar de serem avirulentas em ratinhos de laboratório (Ajzenberg *et al.*, 2002). Por outro lado, na América do Sul e África, nota-se uma predominância de genótipos recombinantes ou atípicos. Estirpes do tipo I recombinantes ou atípicas estão muitas vezes relacionadas com casos de toxoplasmose ocular (Grigg *et al.*, 2001) e toxoplasmose com manifestações clínicas severas em indivíduos imunocompetentes (Ajzenberg *et al.*, 2004).

As variações na virulência entre as diferentes estirpes estão bem estabelecidas em ratinhos de laboratório, na qual a estirpe do tipo I é particularmente virulenta. Embora este conceito não possa ser diretamente extrapolado para os seres humanos, algumas evidências circunstanciais sugerem que alguns perfis genéticos de *T. gondii* podem estar associados a manifestações clínicas em seres humanos, com algumas estirpes atípicas relacionadas com complicações graves da doença em pacientes imunocompetentes, que incluem a toxoplasmose pulmonar ou multivisceral (Carne *et al.*, 2002; Demar, 2007).

Em relação ao tratamento, as sulfonamidas e a pirimetamina são as drogas mais utilizadas no tratamento da toxoplasmose. Estes agentes antimicrobianos possuem a capacidade de reduzir o crescimento de taquizoítos de proliferação rápida (Zuther *et al.*, 1999). A combinação de ambas as drogas é oito vezes mais ativa do que a sua utilização separada (Remington *et al.*, 2006, Mui *et al.*, 2008). O tratamento da toxoplasmose em casos de infecções em indivíduos imunocompetentes pode ser ainda complementado com a administração de ácido fólico que protege a medula óssea contra os efeitos tóxicos da pirimetamina. Para além das drogas anteriores, a espiramicina também se revelou útil no tratamento contra *T. gondii* em casos de infecção materno fetal (Montoya & Liesenfeld, 2004). Embora estas drogas sejam a principal escolha no que se refere ao tratamento destas infecções, não possuem capacidade de erradicar quistos teciduais do parasita (Zuther *et al.*, 1999).

4.1 Indivíduos imunocompetentes

A toxoplasmose na população imunocompetente é normalmente assintomática em cerca de 80% dos casos e raramente causa doença grave. Normalmente, a leve sintomatologia é ignorada por um número considerável de pacientes. Além disso, os sintomas são não específicos podendo não ser associados a uma infecção por *T.gondii*. Embora pouco comuns, os sintomas clínicos associados a uma infecção aguda ocorrem 10-14 dias após a infecção e podem consistir em linfadenopatias, febre, dores de cabeça e fadiga. A linfadenopatia é vista em 3-20% dos casos de indivíduos com infecção aguda e pode persistir por semanas ou meses. A toxoplasmose crónica ativa é rara mas pode ocorrer com persistência de sintomas clínicos e concentração elevada de anticorpos por longos períodos de tempo (Demar *et al.*, 2007).

Foram reportados casos de toxoplasmose primária grave na Guiana-Francesa em adultos imunocompetentes. Estes casos são associados a estirpes geneticamente atípicas e altamente virulentas do parasita (Carme *et al.*, 2002). No Brasil foram também identificados casos de indivíduos imunocompetentes que desenvolveram pneumonia causada por *T. gondii* (Leal *et al.*, 2007).

Na ausência de sinais clínicos, os pacientes imunocompetentes não são tratados. Em casos de sintomatologia leve, os benefícios do tratamento em relação às melhorias do quadro clínico e duração dos sintomas não estão demonstrados. No entanto, se a sintomatologia for grave ou persistente, o tratamento pode ser indicado para 2 a 4

semanas, com sulfadiazina-pirimetamina e ácido folínico, seguido de avaliação do quadro clínico do paciente (Demar *et al.*, 2007).

4.2 Indivíduos imunocomprometidos

As infecções oportunistas causadas por *T. gondii* em pacientes imunocomprometidos (SIDA e pacientes transplantados), com alto déficit de células T (< 100 cél/mL), representam um grande risco de vida e podem ser fatais se não forem diagnosticadas e tratadas precocemente resultando, na grande maioria dos casos, da reativação de infecções anteriores ou da reativação de quistos teciduais em órgãos transplantados (Mele *et al.*, 2002). A apresentação clínica pode variar entre uma reativação assintomática até casos de doença disseminada grave. Nestes pacientes, as lesões mais frequentes ocorrem no cérebro embora também possam ser afetadas outras partes do corpo como o tecido ocular, pulmonar e cardíaco (Dixit *et al.*, 2007).

A ET e a toxoplasmose disseminada têm sido observadas em pacientes imunocomprometidos devido à infecção pelo VIH, doença de Hodgkin's, transplantes de órgãos ou medula óssea (Tenter *et al.*, 2000). Estima-se que o parasita *T.gondii* seja a causa de encefalites graves em mais de 40% dos pacientes com o VIH, enquanto que, 10-30% destes pacientes, morrem no decorrer da infecção (Ho-Yen, 1992; Ammassari *et al.*, 1996).

A terapia HAART tem tido um papel fulcral no decréscimo da ET em pacientes com SIDA (Tenter *et al.*, 2000).

O recurso à tomografia computadorizada e à ressonância magnética são ferramentas vantajosas no diagnóstico da ET. Com a utilização destas técnicas de imagem é possível visualizar as regiões de tecido necrosado como resultado do crescimento focal do parasita (Strittmatter *et al.*, 1992).

4.3 Infecção pré-natal e toxoplasmose congénita (TC)

A infecção pré-natal resulta de uma primeira infecção da mãe durante a gravidez e o risco de infecção aumenta em paralelo com o aumento do tempo de gestação, embora numa fase tardia da gravidez a severidade da infecção no feto seja mais baixa, dado que o

desenvolvimento da maturação imunológica do mesmo já começou (Romand *et al.*, 2004). Esta infecção por *T.gondii* adquirida durante a gravidez revela um quadro que pode variar de infecção subclínica à infecção fetal severa, podendo acarretar graves lesões envolvendo sobretudo o tecido cerebral e ocular e, em casos mais graves, a perda do feto. Outros órgãos como o fígado, o baço, os rins e pulmões podem também ser afetados. Sabin descreve a téttrade de sintomas clínicos da infecção congênita severa: microcefalia ou macrocefalia, calcificação intra-cranial, distúrbios psicomotores e coriorretinites (Lopes *et al.*, 2007).

Estudos recentes revelaram que estirpes do tipo II podem estar na origem de muitos casos de TC, enquanto a severidade das implicações fetais depende sobretudo da fase de gestação no momento da infecção e das concentrações do parasita no líquido amniótico (Romand *et al.*, 2004).

Em mulheres grávidas que adquiriram a infecção no decorrer da gravidez, é normalmente recomendada a administração de espiramicina, embora este tratamento não forneça nenhuma evidência na diminuição do risco de transmissão do parasita para o feto (Gilbert & Gras, 2003). O tratamento com pirimetamina-sulfadiazina e leucovirina é também recomendado, em casos de infecção aguda diagnosticada em mulheres no decorrer da gravidez. Em recém-nascidos, congenitamente infetados, a utilização das mesmas drogas é também recomendada, durante 2 a 6 meses em casos de infecção subclínica, podendo variar entre 1 a 2 anos, em casos de infecção clínica (Montoya & Liesenfeld, 2004).

4.4 Toxoplasmose ocular (TO)

A TO é uma das consequências da infecção por *T. gondii*, sendo a principal responsável pelo aparecimento da uveíte posterior (Vallochi *et al.*, 2008) e pode levar, em grande parte dos casos, nos indivíduos imunocompetentes, à perda permanente da visão, geralmente resultantes da reativação da infecção (80% dos casos) (Bosh-Driessen, 2002). Para explicar variações na ocorrência, na apresentação clínica ou mesmo na gravidade das lesões oculares, importam alguns fatores, tais como a taxa de exposição à carga parasitária, a localização geográfica, características genéticas do hospedeiro, o seu estado imunológico e tempo de infecção (Fekkar *et al.*, 2011).

Há uma elevada prevalência de doenças oculares observada em países da América do Sul, como o Brasil (Holland, 2003; Silveira *et al.*, 2001), Colômbia (de-la-Torre *et al.*,

2007) e no continente africano (Gilbert *et al.*, 1999), por comparação à América do Norte ou Europa. Casos de retinocoroidite toxoplásmica são descritos como uma das principais causas de cegueira no Brasil (de Carvalho *et al.*, 1998). O aparecimento de sequelas oculares está intimamente relacionado com a composição e estrutura genética do isolado envolvido na doença (Howe & Sibley, 1995).

O tratamento da toxoplasmose ocular deve variar em função do tamanho da lesão ocular, da sua localização e características, sendo que a administração de pirimetamina em conjunto com a sulfadiazina resulta eficazmente na diminuição das lesões oculares na maior parte dos pacientes (Roberts *et al.*, 2008).

4.5 Desordens psiquiátricas

Tem sido estudada há já alguns anos a associação entre a infecção toxoplásmica e a esquizofrenia. Nesses estudos, anticorpos anti-*T. gondii* foram encontrados em indivíduos com diagnóstico de esquizofrenia. (Cettinkaya *et al.*, 2007; Hinze-Selch *et al.*, 2007; Niebuhr *et al.*, 2008). Os títulos de anticorpos encontrados nos pacientes com esquizofrenia são significativamente mais elevados do que em pacientes saudáveis. Estudos envolvendo animais demonstraram que animais infetados com *T. gondii* apresentaram alterações de comportamento: ratos infetados com *T. gondii* perdem a capacidade de fugir dos seus predadores (gatos) e, conseqüentemente, aumentam as chances de serem atacados (Webster, 2007). Foi demonstrado, que a administração de ácido valpróico, droga utilizada em doentes com esquizofrenia, é capaz de inibir o crescimento de *T. gondii in vitro* (Jones-Brando *et al.*, 2003).

5. Métodos de diagnóstico

Existem vários métodos de diagnóstico da toxoplasmose que são aplicados em função da variabilidade fisiopatológica e clínica da infecção (Spalding *et al.*, 2005). São quatro os grupos de indivíduos sobre os quais recai maior atenção no que diz respeito ao diagnóstico da infecção: mulheres grávidas que adquiriram a infecção no decorrer da gestação e, por consequência, os fetos e recém-nascidos, os doentes imunocomprometidos e, ainda, os doentes com comprometimento ocular (Montoya, 2002). O diagnóstico pode ser feito através da detecção direta do parasita ou do seu ADN. No entanto, esta pesquisa, de difícil execução, é muitas vezes complementada por meio de outras técnicas, tais como pela inoculação em animais de laboratório, através de culturas celulares ou pela utilização de métodos serológicos (Uchoa *et al.*, 1999; Robert-Gagneux *et al.*, 1999).

A infecção toxoplásmica pode ser evidenciada através de métodos serológicos, que assentam no estudo da cinética das diferentes imunoglobulinas, sobretudo IgG e IgM anti-*T. gondii*. O doseamento de IgA e IgE também possui algum valor no diagnóstico, embora a sua interpretação deva ser feita em simultâneo com a interpretação das IgG e IgM. No caso das IgA, estas sofrem um aumento precoce no início da infecção, seguida de uma queda acentuada, pelo que a ausência de IgA pode indicar que a infecção em causa ocorreu há mais de três meses, mas é preciso ter em consideração que a sua síntese é inconstante, o que muitas vezes acarreta o seu aparecimento em casos de reativação e/ou reinfeção. O título de IgE também pode ser detetado precocemente, no entanto a evolução do mesmo ainda não está bem esclarecido (Petersen, 2007).

Através da análise da evolução das imunoglobulinas G e M é possível a identificação de 5 fases serológicas distintas (Figura 7). A primeira fase da infecção, com duração aproximada de 8-10 dias, é caracterizada pela serologia negativa para IgG e IgM. Na segunda fase, apenas as IgM são detetadas, seguida da terceira fase, em que as IgM permanecem e as IgG começam a aparecer. O aparecimento e o aumento no título de IgG confirma a existência de uma infecção por *T.gondii*. Este período varia entre 2-6 meses após a infecção. Na quarta fase, o título de IgG atinge o seu valor máximo, associado, ainda, à presença de IgM. Quando a infecção já tem mais de 6 meses, entra-se numa quinta fase que é caracterizada pela presença de IgG e pela ausência de IgM (Petersen, 2007).

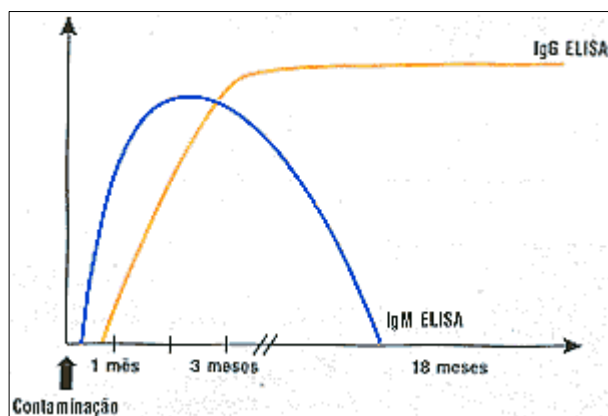


Figura 7. Evolução das imunoglobulinas G e M após infecção por *T. gondii* (<http://www.labmed.pt/NotasTecnicas07.asp>)

O estudo da serologia também pode passar pela realização de testes de avidéz das IgG (afinidade funcional com que os anticorpos IgG se ligam aos seus respectivos antígenos), desenvolvidos com o intuito de distinguir uma infecção passada de uma infecção recentemente adquirida. No decorrer da evolução da resposta imunológica do hospedeiro ocorre a maturação da afinidade do anticorpo-antígeno, que aumenta progressivamente ao longo de semanas ou até meses. Os anticorpos produzidos nos primeiros meses têm uma avidéz fraca ou intermédia, o que sugere que a infecção é recente, enquanto os anticorpos produzidos há mais tempo, possuem uma avidéz maior, indicando uma provável infecção passada (Remington *et al.*, 2004).

No recém-nascido deve ser realizado um acompanhamento serológico se, na mãe, for detetada uma infecção aguda durante a gravidez. Os anticorpos IgG detetados no soro do recém-nascido podem ter origem no bebé ou podem ter sido adquiridos, através da barreira transplacentária. Os anticorpos IgG provenientes da mãe diminuem e desaparecem ao fim de 6 a 12 meses de idade, enquanto que as auto-IgG no recém-nascido tendem a aumentar ao longo do tempo (Lopes *et al.*, 2007).

Os anticorpos IgG atravessam a barreira transplacentária, enquanto as IgM e IgA não. No entanto, a presença das últimas pode muitas vezes indicar casos de infecção congénita (Pelloux *et al.*, 2002). O recém-nascido produz principalmente IgG2 e IgG3, enquanto que os anticorpos maternos transferidos são principalmente IgG1. Serologicamente, a persistência de IgG, o aparecimento de IgM específica no recém-nascido e o isolamento do parasita a partir da placenta, do sangue do cordão ou do líquido amniótico, são indicativos de uma possível infecção congénita (Petersen, 2007).

Anticorpos específicos de *T.gondii* podem ser detetados em amostras de soro ou líquido cefalorraquidiano (LCR) em pacientes com SIDA, com suspeita de envolvimento cerebral. (Leport *et al.*, 2001).

Apesar de a toxoplasmose ocular pode ser diagnosticada com recurso à serologia, a titulação de anticorpos é de baixa fiabilidade (Suresh *et al.*, 2012). O teste de avidéz das IgG é um método que trouxe melhorias no diagnóstico serológico da infeção ocular aguda. Embora um resultado de avidéz baixo não identifique necessariamente um caso de toxoplasmose ocular recente, um resultado de avidéz elevada pode excluir um quadro de infeção primária adquirida há poucos meses (Paul, 1999).

O diagnóstico laboratorial da toxoplasmose pode ser feito ainda com recurso a *polimerase chain reaction* (PCR) para deteção do ADN do parasita. Grover *et al.* (1990) sugere, pela primeira vez, o diagnóstico pré-natal da toxoplasmose congénita utilizando PCR no líquido amniótico. O PCR tem sido utilizado eficazmente no diagnóstico de toxoplasmose congénita, ocular e toxoplasmose em indivíduos imunocomprometidos. Vários loci podem ser pesquisados, sendo o B1 o mais comumente utilizado para o diagnóstico (Bou *et al.*, 1999; Joseph *et al.*, 2002; Kompalic-Cristo *et al.*, 2007). No diagnóstico pré-natal o recurso ao PCR no líquido amniótico é o mais comum e possui uma sensibilidade de aproximadamente 64% e uma especificidade de 100% (Romand *et al.*, 2001). No diagnóstico da ET, o PCR pode ser utilizado com uma grande especificidade e sensibilidade a partir de LCR e/ou amostras de sangue (Joseph *et al.*, 2002). Em casos de toxoplasmose ocular, pode ser utilizado o diagnóstico molecular em amostras de humor aquoso (Bou *et al.*, 1999), bem como em leucócitos do sangue periférico (Mahalakshmi *et al.*, 2007).

5.1. Antígenos de *T. gondii*

5.1.1. Proteínas SAG

A superfície do taquizoito possui antígenos denominados *surface antigens* (SAGs). SAGs e *SAG-related sequences* (SRSs), que compõem uma família de proteínas (Junge *et al.*, 2004), com uma função importante na adesão e invasão da célula hospedeira, através do reconhecimento inicial da célula-alvo (Grimwood & Smith, 1992; Mineo *et al.*, 1993; Robinson *et al.*, 2004). Os antígenos mais expressos à superfície dos taquizoitos nomeadamente, SAG1, SAG2 e SAG3, possuem maior destaque (Lekutis *et al.*, 2001).

As proteínas desta família podem estar envolvidas na conversão de taquizoitos a bradizoitos, uma vez que a sua expressão diferencial é encontrada em ambas as fases de desenvolvimento (Kim *et al.*, 2007).

Os genes SAG têm sido úteis na caracterização molecular de estirpes de *T. gondii* através de PCR, seguida de *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) ou sequenciamento, especialmente SAG1 (Dubey *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2005), SAG2 (Lehmann *et al.*, 2000; Su *et al.*, 2006) e SAG5C (Tinti *et al.*, 2003).

5.1.2. Proteínas MIC

Os micronemas são organelos secretores presentes nos taquizoitos de *T. gondii* e descarregam os seus conteúdos através da extremidade apical do parasita. As proteínas dos micronemas (MIC), que podem ser apresentadas como proteínas solúveis ou proteínas transmembranares (Carruthers & Sibley, 1997; Garcia-Réguet *et al.*, 2000), são as primeiras a serem libertadas em contacto com a célula hospedeira (Carey *et al.*, 2000; Sibley *et al.*, 1998). A sua função assenta na ligação ao hospedeiro através do complexo actina-miosina na superfície da célula hospedeira, facilitando a penetração do parasita (Hager & Carruthers, 2008). Após a entrada do parasita, algumas proteínas MIC permanecem associadas à superfície apical do parasita, onde medeiam a fixação à célula hospedeira por meio da ligação a recetores específicos na célula-alvo (Carruthers & Sibley, 1997; Garcia-Réguet *et al.*, 2000).

5.1.3. Proteínas ROP

As róptrias são outro exemplo de organelos secretores/excretores dos Apicomplexa. Além de estarem envolvidos na invasão das células hospedeiras, exercem função na formação do VP (Dubremetz, 2007; El Hajj, Demey *et al.*, 2006; Sinai, 2007). As róptrias descarregam os seus conteúdos, a partir da extremidade apical do taquizoito, em contacto com a célula hospedeira (Carey *et al.*, 2000). Até então, já foram identificadas mais de 30 proteínas das róptrias, tendo sido atribuídas para estas duas denominações: proteínas localizadas na parte posterior (ROP) e proteínas localizadas na parte do pescoço do organelo (RON) (Dubremetz, 2007).

As proteínas das róprias são sintetizadas inicialmente com pré-pró-proteínas e no decorrer da sua entrada na via secretora são processadas a pró-proteínas. Apenas no final da via secretora, estas pró-proteínas são processadas na sua forma madura (Bradley & Boothroyd, 2001). Algumas proteínas das róprias são fosforiladas (ROP4 e ROP9). As ROP2 e ROP4 estão envolvidas no bloqueio da ação da lactoferrina, enzima capaz de privar o parasita da aquisição do ferro, essencial ao seu desenvolvimento (Dziadeck, Dlugonska, 2007). As ROP16 e ROP18 podem estar envolvidos na virulência do parasita (El Hajj *et al.*, 2007; Saeij *et al.*, 2007).

5.1.4. Proteínas GRA

No interior do VP, existem 12 proteínas GRA secretadas a partir dos grânulos densos dos taquizoítos, durante e após a invasão celular: GRA1 a GRA14, sendo que GRA11 e GRA13 não revelaram até hoje qualquer função específica (Michelin *et al.*, 2009). Após a libertação das proteínas GRA no interior do VP, estas podem manter-se solúveis no lúmen do VP, ou associarem-se à membrana do vacúolo parasitóforo (MVP) (GRA3, GRA5, GRA7 e GRA8), ou à rede tubulo-reticular das membranas (GRA2, GRA4, GRA6, GRA9 e GRA12) (Mercier *et al.*, 2005; Michelin *et al.*, 2009).

Estas proteínas estão envolvidas na sobrevivência intracelular e replicação de *T. gondii* (Carey *et al.*, 2000) modificando a membrana vacuolar e, possivelmente, a aquisição de nutrientes a partir da célula hospedeira (Cesbron-Delauw *et al.*, 1996). O tamanho das proteínas GRA varia entre 21-49 kDa (Nam, 2009). Algumas proteínas GRA são glicadas: GRA 2 (Zinecker *et al.*, 1998), GRA4 (Achbarou *et al.*, 1991) GRA6 (Mercier *et al.*, 2005) e GRA12 (Michelin *et al.*, 2009). As GRA3, GRA4, GRA5, GRA6, GRA7, GRA8, GRA10 e GRA12 possuem domínios transmembranares (Mercier *et al.*, 2005). As proteínas GRA3, GRA5 e GRA6 estão envolvidas no estabelecimento de longa duração dos parasitas intracelulares através da modulação da concentração intracelular de cálcio, o que leva à inibição da apoptose da célula hospedeira (Ahn *et al.*, 2006).

5.2. Genotipagem *T. gondii*

Nos últimos anos, várias ferramentas técnicas têm sido utilizadas e aperfeiçoadas nos estudos genéticos de *T. gondii* (Dardé, 2004).

As isoenzimas foram as primeiras ferramentas analíticas a serem utilizados na caracterização bioquímica do parasita quando os seus genótipos ainda não eram conhecidos (Dardé *et al.*, 1988). RFLP em ADN genómico total é uma ferramenta que pode ser utilizada mas está limitada devido à dificuldade em purificar e produzir parasitas *T. gondii* (Dardé, 2004).

A técnica de PCR-RFLP numa cópia de genes é um método amplamente utilizado nos últimos anos para distinguir isolados de *T. gondii* (Owen & Trees, 1999).

O local para uma enzima de restrição pode estar presente em algumas estirpes e ausente noutras. O polimorfismo dos nucleótidos do ADN pode alterar o local de restrição para uma enzima de restrição. Se o local de restrição está ausente, a enzima não corta o ADN. Se o local de restrição está presente, a enzima irá cortar o ADN em dois fragmentos. O comprimento desses fragmentos será diferente de acordo com a estirpe. Este método é facilmente aplicado e permite a obtenção de resultados rápidos, apesar de haver relatos de problemas técnicos, tais como: amplificação incompleta ou digestão incompleta do ADN por enzimas de restrição (Owen & Trees, 1999).

A técnica de PCR-RFLP para o locus SAG2 foi uma das técnicas mais vulgarmente utilizadas, onde na extremidade 5' existe um local de restrição para a enzima Sau3AI, e na extremidade 3' um sítio de restrição para a enzima HhaI (Howe *et al.*, 1997). No entanto, a análise multilocus trouxe um contributo valioso para a genotipagem de *T. gondii*. Um RFLP multilocus foi desenvolvido com base nos seguintes marcadores SAG1, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, um novo SAG2 e Apico (Dubey *et al.*, 2007; Sue *et al.*, 2006).

RFLP multilocus tem um maior poder discriminativo e permite a diferenciação de genótipos atípicos.

Outros marcadores têm sido descritos para serem utilizados na técnica de RFLP. O marcador B1 distingue os tipos I, II e III, sendo que as estirpes do tipo I não são digeridas por *Xho I* nem por *PMI I*, enquanto que as estirpes dos tipos II e III são digeridas por ambas as enzimas (Grigg & Boothroyd, 2001).

A genotipagem recorre também a técnicas de sequenciação para a identificação das sequências de nucleótidos do ADN. Através desta técnica é possível fazer a comparação entre a sequência de um gene a partir de várias estirpes e identificar todas as mutações aí presentes (Lehmann *et al.*, 2000).

A sequenciação de ADN revelou-se um método bastante útil na detecção de *Single-Nucleotide Polymorphism* (SNPs) a nível de vários pares de bases ou deleções. Pode ser utilizado também como método de detecção de polimorfismos de sítios de restrição das endonucleases, com o intuito de desenvolver um método de PCR-RFLP. De acordo com esta técnica, um único marcador pode revelar mais ou menos polimorfismos. A sequenciação é frequentemente utilizada como complemento de RFLP para genotipagem, podendo definir novos alelos (Fazaeli *et al.*, 2000).

A título de exemplo, na Coreia do Sul, um isolado de uma infeção ocular foi classificada como tipo I pela técnica de RFLP. No entanto, a sequenciação dos loci *SAG1*, *ROP1* e *GRA8* revelou polimorfismos de nucleótidos e substituições de aminoácidos (Lin *et al.*, 2005). No Brasil, um novo alelo foi descrito em estirpes de *T. gondii* para o intrão UPRT-1 que se distingue das outras linhagens clonais através de seis polimorfismos (Khan *et al.*, 2006).

Marcadores genéticos obtidos através de microssatélites (MS), unidades repetidas de dois a seis nucleótidos, são altamente polimórficos fruto da variação do comprimento destas repetições. Como tal, possuem alelos múltiplos com poder informativo em estudos genéticos. A utilização dos microssatélites tem trazido um grande acréscimo ao estudo do polimorfismo do ADN, sendo que este polimorfismo pode ser avaliado por PCR, apenas com a utilização de uma pequena porção de ADN (Dardé, 2004).

Alguns marcadores têm sido descritos com utilidade na genotipagem de *T. gondii*, sendo que uma técnica de PCR-multiplex foi desenvolvida com base no polimorfismo de comprimento de cinco marcadores MS, cuja combinação dos mesmos forneceu informação suficiente para distinguir diversas estirpes (Ajzenberg *et al.*, 2005).

A mais-valia da utilização dos marcadores MS na distinção de isolados de *T. gondii* tem sido demonstrada por diversos estudos (Costa *et al.*, 1997; Ajzenberg *et al.*, 2005).

PARTE II

Caso clínico 1: Toxoplasmose num paciente imunocompetente

(Taila *et al.*, 2011)

✓ **Apresentação clínica**

Paciente de 20 anos, sexo masculino, presumivelmente saudável, não-fumador, sem qualquer medicação prescrita, apresentou-se ao médico de família com queixa persistente de glândulas inchadas há alguns meses.

No mês anterior à consulta do médico de família, o paciente havia notado a existência de vários nódulos linfáticos na região cervical, occipital e inguinal direita. Não foram relatados mais sintomas. O paciente não tinha viajado recentemente, nem tinha tido qualquer contacto recente com pessoas doentes.

✓ **Exames físicos e laboratoriais**

O paciente apresentava-se com febre ligeira e sinais vitais normais. Verificou-se que os nódulos linfáticos cervicais e occipitais tinham aumentado e eram palpáveis, medindo até cerca de 4 cm. Também os nódulos da região inguinal direita tinham aumentado. A tonsila palatina esquerda encontrava-se eritematosa e alargada.

Contagens normais do sangue e eletrólitos séricos, pesquisa de Epstein-Barr negativo e pesquisa de VIH negativo.

Após uma semana, a reavaliação médica não trouxe qualquer alteração ao quadro clínico. O paciente referiu, então, ter ingerido carne crua de cordeiro temperada com grãos (prato típico do Médio Oriente) (ver página 27) o que levou à pesquisa de IgG e IgM anti-*T. gondii* que se apresentaram positivos.

✓ **Diagnóstico**

Toxoplasmose aguda.

✓ **Tratamento**

Não foi administrado tratamento específico e foi planeado um acompanhamento para garantir a resolução da linfadenopatia.

✓ **Conclusão**

Foi apresentado um caso clínico de toxoplasmose num indivíduo imunocompetente. Apesar de neste grupo de indivíduos, a infeção ser normalmente assintomática, neste

caso trata-se de uma infecção aguda que se manifesta com linfadenopatia generalizada e persistente (ver página 28) cujo fator de risco foi o consumo de carne crua.

Caso clínico 2: Toxoplasmose durante a gravidez

(Giannoulis *et al.*, 2008)

✓ **Apresentação clínica**

Paciente gestante, 26 anos, no decorrer da 13ª semana de gestação. Não apresentava qualquer patologia confirmada por exames pré-natais de rotina. Esta era a sua segunda gravidez. Na primeira não havia histórico de toxoplasmose. A paciente relatou ainda ter adquirido recentemente um gato (ver página 27).

✓ **Exames laboratoriais**

Serologia às 13 semanas de gestação:

IgG anti-*T. gondii*: 249 UI/mL (Valor de Referência (VR): 0-6 UI/mL); Avidéz IgG: 0,010 % (VR: 0-0,2%); IgM anti-*T. gondii* >160 UI/mL (VR: 0-10 UI/mL).

2ª Análise de confirmação (sem data específica definida):

IgG anti-*T. gondii* > 400 UI/mL; avidéz IgG: 4,4%; IgM anti-*T. gondii*: 63 UI/mL; IgA anti-*T. gondii*: 13 UI/mL.

A constatação das IgA positivas e o aumento gradual da avidéz dos anticorpos IgG confirmou a presença de uma infecção recente, adquirida nas últimas seis semanas (ver página 32). Com base nos resultados obtidos, no decorrer da 15ª semana de gestação foi realizada uma amniocentese, com o intuito de verificar se o feto havia sido infetado por *T. gondii*. O PCR-DNA feito no líquido amniótico revelou resultado negativo, ou seja, sem evidência de transmissão vertical (ver página 34). No entanto, mesmo assim, foi aconselhado o tratamento da mãe com 1gr de espiramicina, 3 vezes ao dia (ver página 29 e 30).

Serologia às 20 semanas de gestação:

IgG anti-*T. gondii*: 440 UI/mL; avidéz IgG: 23%; IgM anti-*T. gondii*: 51 UI/mL; IgA anti-*T. gondii*: negativo.

Uma segunda amniocentese foi realizada e, desta vez, o PCR-DNA ao líquido amniótico foi positivo para a presença do parasita.

Às 23 semanas de gestação foi realizada uma cordocentese, e foram realizados testes serológicos ao sangue fetal do cordão umbilical (ver página 33):

IgG anti-*T. gondii*: 310 UI/mL; avidéz IgG: 16% (considerado de origem materna pela incapacidade imunológica do feto em produzir IgG nesta etapa de desenvolvimento); IgM anti-*T. gondii*: negativo; IgA anti-*T. gondii*: negativo.

O PCR realizado ao sangue fetal foi negativo.

Serologia às 35 semanas de gestação:

IgG anti-*T. gondii*: 84 UI/mL; IgM anti-*T. gondii*: 17 UI/mL; IgA anti-*T. gondii*: negativo.

Nos exames realizados mensalmente, nenhuma anormalidade fetal foi detetada.

A partir da 35ª semana de gestação a paciente começou a sofrer contrações prematuras. À 36ª semana, a paciente foi submetida a uma cesariana. O recém-nascido era do sexo feminino, aparentemente saudável, com peso de 2880 g. Os testes serológicos efectuados após o nascimento, ao recém-nascido, a partir do sangue do cordão umbilical revelaram:

IgG anti-*T. gondii*: 74 UI/mL; avidéz IgG: 64% (embora nesta altura também seja considerada de origem materna, dado que os recém-nascidos ainda não têm a capacidade de produzir IgG) (ver página 33); IgM anti-*T. gondii*: negativo; IgA anti-*T. gondii*: negativo.

✓ **Conclusão**

Indivíduos imunocompetentes normalmente não requerem tratamento, a menos que manifestem sintomas clínicos graves e prolongados durante algumas semanas. Neste caso a confirmação de uma infeção aguda por *T. gondii* no decorrer da gravidez foi feita por métodos serológicos, vindo a requerer o tratamento com 1 g de espiramicina (ver página 30), por via oral, de oito em oito horas, como forma de prevenção da passagem da infeção para o feto. Este fármaco tem o poder de se concentrar na placenta onde trata a infeção e previne a transmissão ao feto.

Caso clínico 3: Toxoplasmose congénita em gémeos dizigóticos

(Falavigna *et al.*, 2007)

✓ **Apresentação clínica (mãe)**

Paciente de 20 anos, grávida pela primeira vez, iniciou o acompanhamento pré-natal às seis semanas de gestação.

✓ **Exame laboratoriais pré-natais de rotina (12 semanas de gravidez)**

Hemograma e análise sumária de urina normais; *venereal disease research laboratory* (VDRL) negativo; VIH negativo; toxoplasmose: negativo (IgM anti-*T.gondii*: 0,109 UI/mL e IgG anti-*T.gondii*: 0,1 UI / mL).

Às 23 semanas de gestação, uma ultrassonografia revelou a existência de gravidez gemelar di-coriónica e di-amniótica. Ao todo, foram feitas sete consultas pré-natais que decorreram sem incidentes. Às 31 semanas de gestação, a paciente apresentou sintomas de amniorrexe prematura (rotura do cório e do âmnio antes do início do parto) e foi reencaminhada para o hospital mais próximo.

✓ **Apresentação clínica (filho JV)**

Ao nascer, o primeiro gémeo (JV) apresentava índice de Apgar de 9/10/10, peso 1935 g, 44 cm de altura, perímetro cefálico 31 cm, perímetro torácico 28 cm, em bom estado geral, boa sucção e reflexos normais. Permaneceu na incubadora até ao 7^a dia de vida.

No período de acompanhamento, o JV revelou um desenvolvimento neuropsicomotor adequado para a sua idade e mostrou atenção aos estímulos verbais, bons reflexos e tónus muscular.

No entanto, aos sete anos, o JV foi submetido a um teste oftalmológico na escola que revelou problemas de visão no olho esquerdo e visão turva. Um exame oftalmológico mais aprofundado revelou uma lesão de retinocoroidite no olho esquerdo (ver página 30) e visão normal no olho direito

✓ **Apresentação clínica (filho JH)**

O segundo gémeo, JH, aparentemente normal, com um índice de Apgar de 9/10/10, peso 2200 g, 42,5 cm de altura, perímetro cefálico de 31 cm e perímetro torácico de 30 cm. Permaneceu na incubadora até ao 7^o dia de vida.

No entanto, durante o acompanhamento, verificou-se que o JH chorava bastante, mostrando-se hipoativo, icterico, com sucção pobre, fontanela (espaço macio

membranoso que separa os ossos do crânio dos recém-nascidos) deprimida e falta do reflexo de Moro.

Durante o período neonatal, a mãe observou que o JH sempre pareceu mais letárgico do que o JV e que, aos 20 dias de vida, as suas pálpebras não abriam corretamente. Quando consultado, o oftalmologista solicitou testes serológicos para diagnóstico de toxoplasmose, depois de examinar a sua retina. O JH apresentava ainda sudorese, letargia, ptose e atraso do desenvolvimento neuropsicomotor.

✓ **Exames laboratoriais (JH)**

IgM anti- *T.gondii*: 4.590 UI/mL; IgG anti- *T.gondii* >300 UI/mL.

Testes serológicos anti-*T.gondii* foram solicitados posteriormente para a mãe e ambos os filhos, tendo a mãe IgG > 300 UI/mL e sendo as crianças positivas para IgM com índices acima de 0,720 UI/mL.

✓ **Diagnóstico**

Toxoplasmose congénita.

A fundoscopia do olho direito de JH revelou uma lesão macular de retinocoroidite típica esbranquiçada, enquanto que o olho esquerdo não apresentou alterações. JH tinha também microcefalia e, na tomografia do crânio, verificou-se a presença de calcificações cerebrais associando o diagnóstico aos sintomas clássicos da Tétrade de Sabin.

✓ **Tratamento**

Ambas as crianças receberam tratamento antimicrobiano com sulfadiazina, pirimetamina e leucovorina (ver página 30) dos cinco aos 15 meses. A lesão de retinocoroidite de JH não aumentou após o término do tratamento.

✓ **Conclusão**

Vários investigadores debruçaram-se sobre a toxoplasmose congénita em gémeos dizigóticos verificando que, em cada par, um revela indícios de toxoplasmose subclínica, e o outro apresenta a infeção, como se constatou no caso apresentado. Esta variabilidade sugere que a placenta tem um papel importante no controlo da infeção por *T. gondii*, sendo um feto mais afetado do que o outro. Verificou-se que, a longo prazo, a retinocoroidite é a sequela mais frequente na toxoplasmose congénita e o risco de novas lesões persiste durante muitos anos.

Caso clínico 4: Encefalite toxoplásmica num paciente portador do vírus VIH

(Yunihastuti *et al.*, 2005)

✓ **Apresentação clínica**

Indivíduo do sexo masculino, 26 anos, portador do vírus VIH, deu entrada numa clínica com febre e dor de cabeça grave progressiva que já se manifestava há duas semanas. Também apresentava náuseas e vômitos.

✓ **Exames físicos e laboratoriais**

Hemiparesia esquerda (paralisia parcial de um lado do corpo), ptose unilateral esquerda (queda da pálpebra superior).

Nível de CD4⁺: 14 cél/mL e carga viral: 1.592.572 cópias de RNA/mL (ver página 29).

A ressonância magnética ao crânio revelou múltiplas lesões, edema perifocal (situado em redor de um foco de infeção) no tronco cerebral, núcleos da base à direita e lóbulo frontal direito (ver página 29).

IgM anti-*T. gondii*: Negativo; IgG anti- *T. gondii*: >300 UI/L

✓ **Diagnóstico**

Encefalite toxoplásmica e SIDA.

✓ **Tratamento**

Foi prescrita a administração de pirimetamina a cada 6 horas durante 6 semanas, combinadas com a administração de leucovorina, seguida de doses de manutenção de pirimetamina a cada 6 horas (ver página 28).

Ao quarto dia de tratamento antitoxoplásmico, a condição clínica do paciente melhorou e, após a conclusão da terapia de fase aguda, foi capaz de fazer atividades diárias normais.

Paralelamente, o paciente foi também tratado com a terapia HAART (ver página 29) que consistia na administração de zidovudina, lamivudina e nevirapina durante duas semanas. Contudo, no decorrer do tratamento, a nevirapina foi substituída por efavirenz, devido à elevação dos níveis de transaminase hepática para 5 vezes o seu valor normal registado pelo paciente.

Seis semanas após o início do tratamento de manutenção, o paciente parou com a medicação. Cinco semanas após o término da terapêutica, o paciente voltou a manifestar dor de cabeça occipital grave. Uma tomografia computadorizada ao cérebro voltou a

mostrar múltiplas lesões em núcleos da base bilateral e edema cerebral perifocal. Após a análise das imagens obtidas admitiu-se que se tratavam de novas lesões diferentes das anteriores. A terapia de fase aguda com o mesmo regime foi reiniciada neste paciente.

✓ **Conclusão**

O déficit neurológico progressivo em pacientes infectados com VIH com níveis de CD4⁺ <100 células/mL, aliado à observação de lesões focais cerebrais, é altamente sugestivo de encefalite toxoplásmica. Nestas condições, é aconselhável o início da terapia durante 2 semanas. Se não se verificarem melhorias do quadro clínico, outros cenários devem ser explorados. A medicação anti-toxoplásmica é eficaz na fase de taquizoítos, mas não tem efeito na fase de quisto tecidual. Para evitar casos de reativação da infeção, após o tratamento durante a fase aguda, é recomendado a continuação do tratamento em dosagens mais baixas enquanto houver imunossupressão. A terapêutica só deve ser interrompida quando se observar a manutenção de níveis de CD4⁺ >200 cél/mL durante um período de pelo menos 6 meses, sem registo de qualquer sintoma. A experiência clínica deste caso demonstrou que o tratamento não deveria ter sido interrompido após o desaparecimento dos sinais clínicos de encefalite toxoplásmica aguda, dado que a reativação da infeção é um evento relativamente comum em pacientes imunodeprimidos.

Caso clínico 5: Encefalite toxoplásmica grave com genótipo recombinante I/III num paciente portador de VIH

(Genot *et al.*, 2007)

✓ **Apresentação clínica**

Um indivíduo do sexo masculino, natural do Gana, que residia na França, visitou o seu país natal durante um mês em 2002. Em novembro de 2005, deu entrada nos serviços hospitalares do país onde residia, com perda de peso, letargia e febre, sintomas que já se manifestavam há cerca de 15 dias.

✓ **Exames físicos e laboratoriais**

O paciente apresentava-se com febre, hepatoesplenomegalia, ulcerações orais e genitais, coriorretinite aguda bilateral, quadro clínico compatível com a infeção toxoplásmica. Os resultados dos exames neurológicos e pulmonares foram normais.

Hemoglobina (Hb): 7,9 g/dl (valores de referência (VR): 11,5 – 15,5 g/dl); glóbulos brancos (Gb): 980 mm³ (VR: 4.000 – 11.000 /mm³); linfócitos (Lf): 337 mm³ (VR: 1.000 – 4.000/ mm³); plaquetas (Pl): 54.000 mm³ (VR: 150.000– 500.000/ mm³); alanina aminotransferase (ALT): 448 UI/L (VR: 8 – 40 UI/L); aspartato aminotransferase (AST): 507 UI/L (VR: 6- 53 UI/L); lactato desidrogenase (LDH) no soro: 750 UI/L (VR: 125 – 250 UI/L); fosfatase alcalina no soro: 433 UI/L (VR: 53-128 UI/L); proteína C reativa (PCR) no plasma: 14 mg/L (VR: 5 mg/L).

Os resultados serológicos para o VIH foram positivos. O paciente apresentava ainda um nível de células CD4⁺ de 10 células/mm³ e 273.454 cópias do genoma VIH/ mL de plasma (ver página 29).

Foram realizadas culturas de sangue para a deteção de bactérias, fungos, micobactérias, espécies de *Leishmania* e citomegalovírus (CMV) cujos resultados foram negativos.

Uma semana após o internamento hospitalar, o paciente apresentou hemiplegia do lado direito e confusão mental (ver página 29).

Foi realizada uma tomografia computadorizada abdominal que confirmou a hepatoesplenomegalia anteriormente verificada através dos exames físicos, mas não se verificou o alargamento de nenhum nódulo linfático. Foi feita ainda uma ressonância magnética ao cérebro que revelou lesões generalizadas nas regiões occipital, temporal e frontal.

Análise ao LCR: leucócitos: 13/mm³ (80% de células mononucleares); glicose: 74 mg/dL; proteínas: 241 mg/dL.

Foi realizada uma biópsia ao cérebro, em consequência das lesões atípicas reveladas pela ressonância magnética. O exame histológico da amostra da biópsia mostrou áreas de necrose coagulativa circundadas por inflamação crônica e a presença de taquizoitos e quistos teciduais com bradizoitos ovóides no seu interior, quadro sugestivo de infecção por *Toxoplasma gondii*.

Em paralelo, foi feito um “Real-Time PCR” (ver página 34) que tinha como alvo um fragmento de ADN repetitivo de *T. gondii* de 529 pb em amostras de biópsia cerebral e LCR que obtiveram resultado positivo, sendo que o número de taquizoitos de *T. gondii* foi estimado em 1000/mL de LCR. Através da técnica de “PCR multiplex” foi possível revelar uma mistura de alelos do tipo I e III.

Testes serológicos para *T. gondii* revelaram níveis de anticorpos IgG anti-*T.gondii*: 858 UI/mL e não detetaram a presença de anticorpos IgM anti- *T.gondii*.

✓ **Diagnóstico**

Encefalite toxoplásmica.

✓ **Tratamento**

A terapêutica foi prescrita imediatamente após a leitura dos resultados da ressonância magnética e consistiu na administração de sulfadiazina, pirimetamina, em associação com um glucocorticóide (metilprednisolona) (ver página 28).

Quatro semanas após o início da terapêutica, o paciente havia recuperado da encefalite toxoplásmica e os níveis de transaminases, plaquetas e leucócitos havia normalizado. A medicação anti-toxoplásmica foi mantida e iniciada conjuntamente com a terapia HAART (ver página 29).

Apesar da contagem de linfócitos CD4⁺ continuar baixa (14/mm³), não houve evidência de uma recaída de sintomas de toxoplasmose.

Após 5 meses, o paciente faleceu de choque séptico e pneumonia causada por *Pseudomonas aeruginosa*.

✓ **Conclusão**

No presente caso clínico foi descrita a situação clínica de um paciente imunodeprimido, infetado por VIH, com encefalite grave e coriorretinite, causadas pelas reativação de um genótipo de *T.gondii* recombinante dos tipos I e III. O indivíduo em questão nasceu no Gana e lá residiu até 2000, onde provavelmente adquiriu a infecção

por *T.gondii*. O mesmo apresentou extensas lesões cerebrais e rápida deterioração das condições neurológicas, o que levou à necessidade de ventilação mecânica. Verificou-se ainda a correlação entre a encefalite diagnosticada e a relativa alta densidade de taquizoitos de *T. gondii* no cérebro e LCR.

Caso clínico 6: Toxoplasmose cerebral e medular

(San Martin *et al.*, 2008)

✓ **Apresentação clínica**

Paciente de 37 anos, do sexo masculino, aparentemente saudável, com histórico de relações sexuais desprotegidas, deu entrada num hospital com sintomas que já persistiam há quatro meses: astenia, anorexia, febre, disestesias, fraqueza dos membros inferiores, incontinência urinária e disfunção erétil.

✓ **Exames físicos**

Febre alta; Hipoestesia; Perda de sensibilidade postural nos membros inferiores

✓ **Exames laboratoriais**

Anemia normocítica normocrômica (Hb: 11,5 g/dL; VGM: 85,6 fL; CHCM: 34,7 g/dL); leucopenia com neutropenia discreta (3500 x10⁹/L e 1100 x10⁹/L, respectivamente); trombocitopenia discreta (141 000 x10⁹/L); velocidade de sedimentação (VS) elevada (85 mm); proteína C reativa (PCR) elevada (16,8 mg/dL)

A tomografia computadorizada crânio-encefálica (TC-CE) não revelou quaisquer alterações.

O exame citoquímico e anatomopatológico ao LCR revelou hiperproteínoorraquia, pleocitose com predomínio de células mononucleares: linfócitos, monócitos e macrófagos e glicorraquia normal. Estes achados no LCR sugeriam a hipótese de meningite crónica.

Através de Western-Blot foi possível confirmar a serologia positiva para VIH tipo 1 (linfócitos T CD4⁺: 163 cél/μL; linfócitos T CD8⁺: 806 cél/μL; carga viral: 83 743 cópias/mL).

O PCR realizado ao LCR (ver página 34) revelou-se negativo para a presença de *Mycobacterium tuberculosis* e vírus Epstein-Barr, enquanto esta análise ao LCR se revelou positiva para a presença de *Toxoplasma gondii*.

Perante a identificação do parasita no LCR, foram realizados testes serológicos que revelaram IgG anti-*T. gondii* > 1200 U/L e IgM anti-*T. gondii* negativo.

Com recurso à Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foi possível detetar múltiplas lesões expansivas ao nível medular.

✓ **Diagnóstico**

Perante os achados no LCR, seguidos da confirmação da infecção por *T. gondii*, com níveis elevados de IgG anti-*T.gondii* revelados através de testes serológicos e da observação de lesões ao nível da medula, foi assumido tratar-se de um caso de toxoplasmose cerebral e medular.

✓ **Tratamento**

A terapêutica indicada foi a administração de sulfadiazina e pirimetamina (ver página 28) durante 6 semanas, sendo que o paciente apresentou melhorias consideráveis no seu quadro clínico, com normalização da força dos membros inferiores, com a manutenção de uma discreta hipoestasia na perna direita e no pé direito e disfunção erétil. Em paralelo, verificou-se uma melhoria significativa do quadro radiológico do paciente.

✓ **Conclusão**

Em pacientes imunodeprimidos infetados por VIH é relativamente comum o aparecimento de doenças com envolvimento do SNC, sendo que uma das causas mais frequentes de lesão cerebral é a toxoplasmose. No entanto, um quadro de toxoplasmose com envolvimento medular é raramente relatado e, como estamos perante um caso de imunossupressão associado à infecção por VIH, o diagnóstico diferencial das lesões na medula espinal deve ser considerado. Neste caso concreto, foi de grande utilidade para o diagnóstico a RMN, os exames no LCR com relevante contributo da pesquisa por *T. gondii* por PCR, bem como a resposta positiva por parte do paciente à terapêutica anti-toxoplásmica.

Caso clínico 7: Hepatite toxoplásmica em paciente imunocompetente

(Dogan *et al.*, 2007)

✓ **Apresentação clínica**

Paciente de 61 anos, do sexo feminino, apresentava nas últimas 5-6 semanas um histórico de perda de apetite, falta de energia e dor abdominal ao nível do hipocôndrio direito. A paciente sofria de *diabetes mellitus* há 10 anos e fazia tratamento com insulina. Não havia histórico de dependência de álcool, transfusões de sangue ou uso de drogas.

✓ **Exames físicos**

37,5 °C; pressão arterial: 140/80 mmHg; pulso: 80 bpm.

Os exames pulmonares e cardíacos eram normais. Não foram observadas linfadenopatias.

✓ **Exames laboratoriais**

Hb: 12 g/dL; Gb: 9800/mm³ (6% de linfócitos atípicos observados no exame microscópico); Pl: 240000/mm³; VS: 70 mm/h; Glucose: 160 mg/dL; AST: 90 U/L; ALT: 110 U/L (VR: 0-41 U/L); ALP: 495 U/L (VR: 98-270 U/L); gama-glutamil transpeptidase (GGT): 190 U/L (VR: 8-50 U/L); colesterol: 260 mg/dL; triglicerídeos: 225 mg/dL; proteínas séricas totais: 6.7 g/dL; albumina: 2.9 g/dL; electrólitos, ureia, creatinina e bilirrubina estavam dentro dos valores de referência.

A ultrassonografia abdominal revelou hepatomegalia. Não foi observada esteatose ou dilatação dos canais biliares.

Os testes serológicos para hepatite B, hepatite C, VIH, CMV, vírus Epstein-Barr e *Brucella* revelaram-se negativos. O teste serológico para anticorpos IgM anti-*T. gondii* foi negativo, enquanto anticorpos IgG anti-*T. gondii* foi positivo.

Foi realizada uma biópsia ao fígado que revelou uma lesão hepatocelular moderada com pequenos focos de tecido necrosado. O exame microscópico revelou ainda taquizoitos de *T. gondii* nas células do fígado e sinusóides. Devido aos achados histopatológicos, os exames serológicos foram repetidos após oito dias, com confirmação do resultado anterior: IgM anti-*T.gondii* negativo, IgG anti-*T.gondii* positivo e IgA positivo. A avidéz para IgG foi baixa (ver página 33) e não se detetou imunossupressão, coriorretinite por infeção ocular toxoplásmica não observada.

✓ **Diagnóstico**

Hepatite toxoplásmica aguda.

✓ **Conclusão**

A hepatite toxoplásmica, relatada neste caso, é um evento raro em pacientes imunocompetentes e surge normalmente como uma manifestação primária da infecção aguda por *T. gondii*. Quando a sua etiologia não está definida, a infecção por *T. gondii* deve ser considerada no diagnóstico diferencial da hepatite, sendo realizado através de uma biópsia hepática. Neste caso, os resultados apresentaram taquizoitos em cortes de tecido. O paciente em questão apresentou um quadro gripal com envolvimento hepático, sem linfadenopatia, ou seja, nenhum dos sintomas apresentados sugeriam infecções toxoplásmicas.

O estado imunológico do paciente é crucial no controlo da infecção aguda por *T. gondii*. Neste caso, os níveis de CD4⁺ e CD8⁺ estavam normais. Em indivíduos imunocompetentes a infecção aguda provocada por *T. gondii* é normalmente auto-limitada, pelo que não é necessário qualquer tipo de tratamento. No caso exposto, o paciente recebeu alta do hospital sem qualquer tipo de tratamento e o seu quadro clínico progrediu satisfatoriamente. Dois meses depois, foi realizado um teste da sua função hepática que acabou por se revelar normal.

Caso clínico 8: Uveíte toxoplásmica

(Kim *et al.*, 2000)

✓ **Apresentação clínica**

Indivíduo do sexo masculino, 60 anos, sem problemas graves de saúde anteriores, deu entrada nos serviços hospitalares com visão turva e diminuída no seu olho direito, dor muscular ligeira após ter vivenciado situações de grande stresse e fadiga nas semanas anteriores.

✓ **Exames físicos**

Com recurso a um exame ocular, foi detetada uma reação inflamatória ligeira na câmara anterior e corpo vítreo do olho direito. Ao mesmo tempo, foi observada, na área vascular temporal superior, uma infiltração na retina (ver página 30).

✓ **Tratamento e diagnóstico inicial**

Nesta primeira abordagem terapêutica foi administrada topicamente uma solução de 1% de acetato de prednisolona durante 10 dias (4 vezes ao dia). No entanto, a infiltração da retina continuou a progredir. Num diagnóstico inicial, suspeitou-se de necrose da retina, sendo prescrito agora a administração de 40 mg de prednisolona oralmente, 3 vezes ao dia. Duas semanas depois, o exame do fundo ocular direito revelou inflamação grave e confirmou a necrose da retina. A terapêutica com prednisolona oral foi encerrada.

Testes serológicos para pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* foram realizados através de *IgG-enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), com fortes resultados positivos. Nesta altura, iniciou-se uma terapêutica com a combinação de 25 mg de pirimetamina e 500 mg de sulfonamida, paralelamente à administração de prednisolona durante 8 semanas (ver página 31).

Cinco semanas após o início do tratamento, a reação inflamatória diminuiu e a lesão necrótica da retina observada em torno da área vascular temporal superior desapareceu.

Cerca de 8 meses mais tarde, a acuidade visual do olho direito melhorou significativamente e, apenas se observou a margem clara da lesão da retina, na área vascular temporal superior do olho direito. Os exames serológicos foram repetidos e verificou-se a persistência de títulos elevados de anticorpos anti-*T. gondii*.

✓ **Conclusão**

O paciente em questão pode ter sido infetado no passado por *T. gondii*, sem qualquer manifestação sintomática reconhecida. Contudo, e devido à presumida imunossupressão causada por situações de stresse e fadiga intensas, pode ter originado uma reativação da infeção crónica (ver página 34). Em pacientes com inflamação ocular deve ser considerada a realização de testes serológicos para um possível diagnóstico de toxoplasmose com comprometimento ocular.

Conclusão

O *Toxoplasma gondii* é um parasita ubíquo que pode infectar uma grande quantidade de hospedeiros, no entanto o principal objetivo deste trabalho foi descrever a infecção toxoplásmica nos seres humanos, através da descrição dos quadros de sintomatologia e tentar perceber quais metodologias de diagnóstico podem ser aplicadas, consoante cada caso. Para este efeito, na segunda parte do trabalho foram expostos oito casos clínicos com o intuito de demonstrar, na prática, todos os aspetos mencionados na primeira parte do trabalho.

A infecção toxoplásmica pode acarretar diversos quadros clínicos. Em indivíduos imunocompetentes muitas vezes a infecção é assintomática e quadros de toxoplasmose severa estão normalmente associadas estirpes particularmente virulentas do parasita. Em contraponto, crianças infectadas congenitamente e pacientes imunocomprometidos podem muitas vezes desenvolver quadros sintomatológicos mais graves.

Em relação à metodologia aplicada ao diagnóstico da infecção, foi possível concluir que o isolamento do parasita através de produtos biológicos é particularmente importante no diagnóstico definitivo de infecções congénitas e casos de infecção severa em pacientes imunocomprometidos. No entanto, a deteção direta do parasita nem sempre é possível e, como tal, a utilização de métodos serológicos revelou-se uma ferramenta essencial no diagnóstico de grande parte dos casos de infecção toxoplásmica. O futuro dos métodos serológicos aplicados comumente, nos dias de hoje, poderá passar, sobretudo, pela utilização de antigénios específicos como marcadores da infecção.

A genotipagem é de grande relevância na caracterização genética das populações de *T.gondii*, no entanto requer, antes de mais, o acesso a amostras biológicas de tecidos tais como: placenta, líquido amniótico, tecidos oculares, LCR, etc. para que seja possível o isolamento prévio do parasita, ou do seu ADN. Em pacientes com sinais clínicos da doença, as amostras infectadas são relativamente fáceis de obter. No entanto, as amostras biológicas para se efetuarem estes estudos nem sempre estão facilmente disponíveis, especialmente em pacientes assintomáticos, onde os isolados do parasita não podem ser obtidos a partir de todas as amostras biológicas.

Bibliografia

Abecassis MM. Unusual complications of bone marrow transplantation. Experience at the BMT Unit of the Francisco Gentil Portuguese Institute of Oncology, Lisbon Center. *Acta Med Port* 1991 Dec; 4: 37-38.

Achbarou A, Mercereau-Puijalon O, Sadak A, Fortier B, Leriche MA, Camus D, Dubremetz JF. Differential targeting of dense granule proteins in the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* 1991 Dec; 103: 321-329.

Ahn HJ, Kim S, Kim HE, Nam HW. Interactions between secreted GRA proteins and host cell proteins across the parasitophorous vacuolar membrane in the parasitism of *Toxoplasma gondii*. *Korean J Parasitol* 2006 Dec; 44 (4): 303-312.

Ajzenberg D, Bañuls AL, Su C, Dumètre A, Demar M, Carme B et al. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol* 2004 Sep; 34 (10): 1185-1196.

Ajzenberg D, Cogné N, Paris L, Bessièrès MH, Thulliez P, Filisetti D, et al. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. *J. Infect. Dis* 2002 Sep; 186 (5): 684-689.

Ajzenberg D, Dumetre A, Darde ML. Multiplex PCR for typing strains of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol* 2005 Apr, 43 (4): 1940-1943.

Ângelo H. Metodologia de identificação da infeção por *Toxoplasma gondii* no hospedeiro imunocomprometido [Dissertação de doutoramento]. Lisboa: Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa; 2000.

Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe (2010). Disponível em http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1011_SUR_Annual_Epidemiological_Report_on_Communicable_Diseases_in_Europe.pdf [acedido em 01/09/2012].

Bahia-Oliveira LM, Jones JL, Azevedo-Silva J, Alves CC, Oréface F, Addiss DG. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2003 Jan; 9 (1): 55-62.

Boothroyd JC. *Toxoplasma gondii*: 25 years and 25 major advances for the field. *Int J Parasitol* 2009 Jul; 39 (8): 935-946.

Bosch-Driessen LH, Plaisier MB, Stilma JS, Van der Lelij A, Rothova A. Reactivations of ocular toxoplasmosis after cataract extraction. *Ophthalmology* 2002 Jan;109 (1): 41-5.

Bou G, Figueroa MS, Martí-Belda P, Navas E, Guerrero A. Value of PCR for detection of *Toxoplasma gondii* in aqueous humor and blood samples from immunocompetent patients with ocular toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 1999 Nov; 37 (11): 3465-3468.

Bradley PJ, Boothroyd JC. The pro region of *Toxoplasma* ROP1 is a rhoptry-targeting signal. *Int J Parasitol* 2001 Sep; 31 (11): 1177-1186.

Carey KL, Donahue CG, Ward GE. Identification and molecular characterization of GRA8, a novel, proline-rich, dense granule protein of *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* 2000 Jan; 105 (1): 25-37.

Carme B, Bissuel F, Ajzenberg D, Bouyne R, Aznar C, Demar M et al. Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. *J. Clin. Microbiol* 2002 Nov; 40 (11): 4037-4044.

Carruthers VB, Sibley LD. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur J Cell Biol.* 1997 Jun; 73 (2): 114-123.

Cesbron-Delauw MF, Lecordier L, Mercier C. Role of secretory dense granule organelles in the pathogenesis of toxoplasmosis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 219: 59-65.

Cetinkaya Z, Yazar S, Gecici O, Namlı MN. Anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in patients with schizophrenia-preliminary findings in a Turkish sample. *Schizophr Bull* 2007 May; 33 (3): 789-791.

Choi WY, Nam HW, Kwak NH, Huh W, Kim YR, Kang MW, et al. Foodborne outbreaks of human toxoplasmosis. *J Infect Dis* 1997 May; 175 (5): 1280-1282.

Costa JM, Dardé ML, Assouline B, Vidaud M, Bretagne S. Microsatellite in the beta-tubulin gene of *Toxoplasma gondii* as a new genetic marker for use in direct screening of amniotic fluids. *J Clin Microbiol* 1997 Oct; 35 (10): 2542-2545.

Da Cunha S, Ferreira E, Ramos I, Martins R, De Freitas L, Borges JL, et al. Cerebral toxoplasmosis after renal transplantation. Case report and review. *Acta Med. Port* 1994 Dec; 7: 61-66.

Dardé ML. Genetic analysis of diversity in *Toxoplasma gondii*. *Ann Ist Super Sanita* 2004; 40 (1): 57-63.

Dardé ML, Bouteille B, Pestre-Alexandre M. Isoenzymic characterization of seven strains of *Toxoplasma gondii* by isoelectrofocusing in polyacrylamide gels. *Am J Trop Med Hyg* 1988 Dec; 39 (6): 551-558.

Dawson D. Foodborne protozoan parasites. *Int J Food Microbiol* 2005 Aug; 103 (2): 207-227.

De Carvalho KM, Minguini N, Moreira Filho DC, Kara-José N. Characteristics of a pediatric low-vision population. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 1998 May-Jun; 35 (3): 162-165.

De Souza W, Martins-Duarte ES, Lemgruber L, Attias M, Vommaro RC. Structural organization of the tachyzoite of *Toxoplasma gondii*. *Scientia Medica* 2010; 20 (1): 131-143.

De-la-Torre A, González G, Díaz-Ramírez J, Gómez-Marín JE. Screening by ophthalmoscopy for *Toxoplasma* retinochoroiditis in Colombia. *Am J Ophthalmol* 2007 Feb; 143 (2): 354-356.

Demar M, Ajzenberg D, Maubon D, Djossou F, Panchoe D, Punwasi W, et al. Fatal outbreak of human toxoplasmosis along the Maroni River: epidemiological, clinical, and parasitological aspects. *Clin Infect Dis* 2007 Oct; 45 (7): 88-95.

Dixit PG, Umap PS, Bardale RV. *Toxoplasma myocarditis* presenting as myocardial infarction. *Indian J Med Sci* 2007 Apr; 61 (4): 218-220.

Dogan N, Kabukçuoglu S, Vardareli E. *Toxoplasmic Hepatitis* in an Immunocompetent Patient. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2007; 31 (4): 260-263.

Dubey JP. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 2009 Jul; 39 (8): 877-882.

Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev* 1998 Apr; 11 (2): 267-299.

Dubey JP, Patitucci AN, Su C, Sundar N, Kwok OC, Shen SK. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Chile, South America. *Vet Parasitol* 2006 Aug; 140 (1-2): 76-82.

Dubey JP, Sundar N, Gennari SM, Minervino AHH, Farias NAR, Ruas JL et al. Biologic and genetic comparison of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from the northern Pará state and the southern state Rio Grande do Sul, Brazil revealed highly diverse and distinct parasite populations. *Vet Parasitol* 2007 Jan; 143 (2): 182-188.

Dubremetz, JF. Rhoptries are major players in *Toxoplasma gondii* invasion and host cell interaction. *Cell Microbiol* 2007 Apr; 9 (4): 841-848.

Dumetre A, Ajzenberg D, Rozette L, Mercier A, Darde ML. *Toxoplasma gondii* infection in sheep from Haute-Vienne, France: seroprevalence and isolate genotyping by microsatellite analysis. *Vet Parasitol* 2006 Dec; 142 (3-4): 376-379.

Dziadek B, Dziadek J, Długowska H. Identification of *Toxoplasma gondii* proteins binding human lactoferrin: a new aspect of rhoptry proteins function. *Exp Parasitol* 2007 Mar; 115 (3): 277-282.

El Hajj H, Demey E, Poncet J, Lebrun M, Wu B, Galéotti N et al. The ROP2 family of *Toxoplasma gondii* rhoptry proteins: proteomic and genomic characterization and molecular modeling. *Proteomics* 2006 Nov; 6 (21): 5773-5784.

El Hajj H, Lebrun M, Arold ST, Vial H, Labresse G, Dubremetz JF. ROP18 is a rhoptry kinase controlling the intracellular proliferation of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog* 2007 Feb; 3 (2): 14.

EUROTOXO (2006). Disponível em http://eurotoxos.isped.u-bordeaux2.fr/WWW_PUBLIC/DOC/EUROTOXO_Panel_1_Survey_on_surveillance_systems_27-04-2006.pdf [acedido em 01/09/2012].

Evolução das imunoglobulinas G e M após a infeção por *T. gondii*. Disponível em <http://www.labmed.pt/NotasTecnicas07.asp> [acedido em 22/06/2012].

Falavigna DL, Roncada EV, Nakazora D, Pelloso MC, Falavigna LF, de Araújo SM, et al. Congenital toxoplasmosis in dizygotic twins, Paraná, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2007 Mar-Apr; 49 (2): 117-118.

Fazaeli A, Carter PE, Dardé ML, Pennington TH. Molecular typing of *Toxoplasma gondii* strains by GRA6 gene sequence analysis. *Int J Parasitol* 2000 Apr; 30 (5): 637-642.

Fekkar A, Ajzenberg D, Bodaghi B, Touafek F, Le Hoang P, Delmas J, et al. Direct Genotyping of *Toxoplasma gondii* in ocular fluid samples from 20 patients with ocular toxoplasmosis: Predominance of type II in France. *Journal of Clinical Microbiology* 2011 Apr; 49 (4): 1513-1517.

Garcia-Réguet N, Lebrun M, Fourmaux MN, Mercereau-Puijalon O, Mann T, Beckers CJ, et al. The microneme protein MIC3 of *Toxoplasma gondii* is a secretory adhesion that binds to both the surface of the host cells and the surface of the parasite. *Cell Microbiol* 2000 Aug; 2 (4): 353-364.

Genot S, Franck J, Forel JM, Rebaudet S, Ajzenberg D, de Paula AM, et al. Severe *Toxoplasma gondii* I/III Recombinant-Genotype Encephalitis in a Human Immunodeficiency Virus Patient. *J Clin Microbiol* 2007 Sep; 45 (9): 3138–3140.

Giannoulis C, Zournatzi B, Giomisi A, Diza E, Tzafettas I. Toxoplasmosis during pregnancy: a case report and review of the literature. Hippokratia 2008 Jul; 12 (3): 139-143.

Gilbert RE, Dunn DT, Lightman S, Murray PI, Pavesio CE, Gormley PD, et al. Incidence of symptomatic Toxoplasma eye disease: aetiology and public health implications. Epidemiol Infect 1999 Oct; 123 (2): 283-289.

Gilbert R & Gras L. Effect of timing and type of treatment on the risk of mother to child transmission of *Toxoplasma gondii*. BJOG 2003 Feb; 110 (2): 112-120.

Grigg ME, Ganatra J, Boothroyd JC & Margolis TP. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. J. Infect. Dis 2001 Sep; 184 (5): 633-639.

Grimwood J, Smith JE. *Toxoplasma gondii*: The role of a 30-kDa surface protein in host cell invasion. Exp Parasitol 1992 Feb; 74 (1): 106-111.

Grover CM, Thulliez P, Remington JS, Boothroyd JC. Rapid prenatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid. J Clin Microbiol 1990 Oct; 28 (10): 2297-2301.

Hager KM, Carruthers VB. MARveling at parasite invasion. Trends Parasitol 2008 Feb; 24 (2): 51-54.

Halonen SK & Weiss LM. *Toxoplasma gondii* presentations at the 10th international workshops on opportunistic protists: 100 years and counting. Eukaryotic Cell 2009 Apr; 8 (4): 437-440.

Hinze-Selch D, Däubener W, Eggert L, Erdag S, Stoltenberg R, Wilms S. A controlled prospective study of *Toxoplasma gondii* infection in individuals with schizophrenia: beyond seroprevalence. Schizophr Bull 2007 May; 33 (3): 782-788.

Holland GN. Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part I: epidemiology and course of disease. Am J Ophthalmol 2003 Dec; 136 (6): 973-988.

Howe DK, Honoré S, Derouin F, Sibley D. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. J Clin Microbiol 1997 Jun; 35 (6): 1411-1414.

Howe DK & Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. J. Infect. Dis 1995 Dez; 172 (6), 1561–1566.

Jones-Brando L, Torrey EF, Yolken R. Drugs used in the treatment of schizophrenia and bipolar disorder inhibit the replication of *Toxoplasma gondii*. Schizophr Res 2003 Aug; 62 (3): 237-244.

Joseph P, Calderon MM, Gilman RH, Quispe ML, Cok J, Ticona E et al. Optimization and evaluation of PCR assay for detecting toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. J Clin Microbiol 2002 Dec; 40 (12): 4499-4503.

Jung C, Lee CY, Grigg ME. The SRS superfamily of *Toxoplasma* surface proteins. Int J Parasitol 2004 Mar; 34 (3): 285-296.

Khan A, Jordan C, Muccioli C, Vallochi AI, Rizzo LV, Belfort JR et al. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains with ocular toxoplasmosis, Brazil. Emerg Infect Dis 2006 Jun; 12 (6): 942-949.

Kim MH, Choi YK, Park YK, Nam HW. A toxoplasmic uveitis case of a 60-year-old male in Korea 2000 Mar; 38 (1): 29-31.

Kim SK, Karasov A, Boothroyd JC. Bradyzoite-specific surface antigen SRS9 plays a role in maintaining *Toxoplasma gondii* persistence in the brain and in host control of parasite replication in the intestine. Infect immune 2007 Apr; 75 (4): 1626-1634.

Kompalic-Cristo A, Frotta C, Suárez-Mutis M, Fernandes O, Britto C. Evaluation of real-time PCR assay based on the repetitive B1 gene for the detection of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood. Parasitol Res 2007 Aug; 101 (3): 619-625.

Leal FE, Cavazzana CL, de Andrade HF, Galisteo AJ, de Mendonça JS, Kallas EG. *Toxoplasma gondii* Pneumonia in Immunocompetent Subjects: Case Report and Review. Clin Infect Dis 2007 Mar; 44 (6): 62–66.

Lehmann T, Blackston CR, Parmley SF, Remington JS, Dubey JP. Strain typing of *Toxoplasma gondii*: comparison of antigen-coding and housekeeping genes. J Parasitol 2000 Oct; 86 (5): 960-971.

Lekutis C, Ferguson DJ, Grigg ME, Camps M, Boothroyd JC. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. Int J Parasitol 2001 Oct; 31 (12): 1285-1292.

Leport C, Franck J, Chene G, Derouin F, Ecobichon J, Pueyo S, et al. Immunoblot profile as predictor of toxoplasmic encephalitis in patients infected with human immunodeficiency virus. Clin Diagn Lab Immunol 2001 May; 8 (3): 579-584.

Lin A, Shin EH, Kim TY, Park JH, Guk SM, Chai JY. Genetic characteristics of the Korean isolate KI-1 of *Toxoplasma gondii*. Korean J Parasitol 2005 Mar; 43 (1): 27-32.

Lopes FMR, Gonçalves DD, Mitsuka-Breganó R, Freire RL, Navarro IT. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy. Braz J Infect Dis 2007 Oct; 11 (5): 496-506.

Machado I, Sousa I, Angelo H. Congenital toxoplasmosis prevention in Portugal. Presented at the European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases organized by the ESCMID European Society of Clinical Microbiology and infectious diseases, Nice. France; 2006a.

Machado I, Sousa I, Angelo H. Pregnant women and toxoplasmosis. Presented at the European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases organized by the ESCMID European Society of Clinical Microbiology and infectious diseases, Nice. France; 2006b.

Mahalakshmi B, Therese KL, Shyamala G, Devipryia U, Madhavan HN. *Toxoplasma gondii* detection by nested polymerase chain reaction in lens aspirate and peripheral blood leukocyte in congenital cataract patients: the first report from a tertiary eye hospital in India. Curr Eye Res 2007 Jul- Aug; 32 (7-8): 653-657.

Martin FJS, Baptista T, Araujo C. Toxoplasmose cerebral e medular: a propósito

de um caso clínico revista da sociedade portuguesa de Medicina Interna 2008 Jul-Sep; 15 (3): 172-176.

McLeod R, Boyer K, Roizen N, Stein L, Swisher C, Holfels E, et al. The child with congenital toxoplasmosis. *Curr Clin Top Infect Dis* 2000; 20: 189-208.

McLeod R, Kieffer F, Sautter M, Hosten T, Pelloux H. Why prevent, diagnose and treat congenital toxoplasmosis? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009 Mar; 104 (2): 320-44.

Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, et al. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 1999 Sep-Oct; 5 (5): 607-625.

Mele A, Paterson PJ, Prentice HG, Leoni P, Kibbler CC. Toxoplasmosis in bone marrow transplantation: a report of two cases and systematic review of the literature. *Bone Marrow Transplant* 2002 Apr; 29 (8): 691-698.

Mercier C, Adjogble KD, Däubener W, Delauw MF. Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? *Int J Parasitol* 2005 Jul; 35 (8): 829-849.

Michelin A, Bittame A, Bordat Y, Travier L, Mercier C, Dubremetz JF, et al. GRA12, a *Toxoplasma* dense granule protein associated with the intravacuolar membranous nanotubular network. *Int J Parasitol* 2009 Feb; 39 (3): 299-306.

Mineo JR, McLeod R, Mack D, Smith J, Khan IA, Ely KH et al. Antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (SAG-1, P30) inhibit infection of host cells and are produced in murine intestine after peroral infection. *J Immunol* 1993 May; 150 (9): 3951-3964.

Montoya JG. Laboratory Diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. *J Infect Dis* 2002 Feb; 185: 73-82.

Montoya JG & Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet* 2004 Jun; 363 (9425): 1965-1976.

Mui EJ, Schiehser GA, Milhous WK, Hsu H, Roberts CW, Kirisits M. Novel triazine JPC-2067-B inhibits *Toxoplasma gondii* in vitro and in vivo. *PLoS Negl Trop Dis* 2008 Mar; 2 (3): 190.

Nam HW. GRA proteins of *Toxoplasma gondii*: maintenance of host-parasite interactions across the parasitophorous vacuolar membrane. Korean J Parasitol 2009 Oct; 47: 29-37.

Niebuhr DW, Millikan AM, Cowan DN, Yolken R, Li Y, Weber NS. Selected infectious agents and risk of schizophrenia among U.S. military personnel. Am J Psychiatry 2008 Jan; 165 (1): 99-106.

Owen MR, Trees AJ. Genotyping of *Toxoplasma gondii* associated with abortion in sheep. J Parasitol 1999 Apr; 85 (2): 382-384.

Paul M. Immunoglobulin G avidity in diagnosis of toxoplasmic lymphadenopathy and ocular toxoplasmosis. Clin Diagn Lab Immunol 1999 Jul; 6 (4): 514-518.

Pelloux H, Fricker-Hidalgo H, Pons JC, Bost-Bru C, Brenier-Pinchart MP, Jouk PS, Ambroise-Thomas P. Congenital toxoplasmosis: prevention in the pregnant woman and management of the neonate. Arch Pediatr 2002 Feb; 9 (2): 206-212.

Petersen E. Toxoplasmosis. Semin Fetal Neonatal Med 2007 Jun; 12 (3): 214-223.

Radke JR, Guerini MN, Jerome M, White MW. A change in the premitotic period of the cell cycle is associated with bradyzoite differentiation in *Toxoplasma gondii*. Mol Biochem Parasitol 2003 Oct; 131 (2): 119-127.

Remington JS, Thulliez P, Montoya JG. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. J Clin Microbiol 2004 Mar; 42 (3): 941-945.

Robert-Gangneux F, Gavinet MF, Ancelle T, Raymond J, Tourte-Schaefer C, Dupouy-Camet J. Value of prenatal diagnosis and early postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: retrospective study of 110 cases. J Clin Microbiol 1999 Sep; 37 (9): 2893-2898.

Robinson SA, Smith JE, Millner PA. *Toxoplasma gondii* major surface antigen (SAG1): in vitro analysis of host cell binding. Parasitology 2004 Apr; 128 (4): 391-396.

Romand S, Chosson M, Franck J, Wallon M, Kieffer F, Kaiser K, et al. Usefulness of quantitative polymerase chain reaction in amniotic fluid as early prognostic marker of fetal infection with *Toxoplasma gondii*. Am J Obstet Gynecol 2004 Mar; 190 (3): 797-802.

Romand S, Wallon M, Franck J, Thulliez P, Peyron F, Dumon H. Prenatal diagnosis using polymerase chain reaction on amniotic fluid for congenital toxoplasmosis. Obstet Gynecol 2001 Feb; 97 (2): 296-300.

Saejj JPJ, Coller S, Boyle JP, Jerome ME, White MW, Boothroyd JC. *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of polymorphic kinase homologue. Nature 2007 Jan; 445 (7125): 324-327.

San Martin FJ, Baptista T, Araújo C. Cerebral and spinal cord toxoplasmosis: a clinical case report. Revista da Sociedade Portuguesa de Medicina Interna 2008 Jul-Sep; 15 (31): 172-176.

Sibley LD, Håkansson S, Carruthers VB. Gliding motility: an efficient mechanism for cell penetration. Curr Biol 1998 Jan; 8 (1): 12-14.

Sibley LD, Khan A, Ajioka JW, Rosenthal BM. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2009 Sep; 364 (1530): 2749-2761.

Silveira C, Belfort R Jr, Muccioli C, Abreu MT, Martins MC, Victora C, et al. A follow-up study of *Toxoplasma gondii* infection in southern Brazil. Am J Ophthalmol 2001 Mar; 131 (3): 351-354.

Sinai AP. The *Toxoplasma* kinase ROP18: an active member of a degenerate family. PLoS Pathog 2007 Feb; 3 (2): 16.

Soete M, Fortier B, Camus D, Dubremetz JF. *Toxoplasma gondii*: kinetics of bradyzoite-tachyzoite interconversion in vitro. Exp Parasitol 1993 May; 76 (3): 259-264.

Spalding SM, Amendoeira MR, Klein CH, Ribeiro LC. Serological screening and toxoplasmosis exposure factors among pregnant women in South of Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 2005 Mar-Apr; 38 (2): 173-177.

Strittmatter C, Lang W, Wiestler OD, Kleihues P. The changing pattern of human immunodeficiency virus-associated cerebral toxoplasmosis: a study of 46 postmortem cases. *Acta Neuropathol* 1992 ;83 (5): 475-481.

Su C, Zhang X, Dubey JP. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: A high resolution and simple method for identification of parasites. *Int J Parasitol* 2006 Jun; 36 (7): 841-848.

Suresh S, Nor-Masniwati S, Nor-Idahriani MN, Wan-Hazabbah WH, Zeehaida M, Zunaina E. Serological IgG avidity test for ocular toxoplasmosis. *Clin Ophthalmol* 2012; 6: 147-150.

Taila AK, Hingwe AS, Johnson LE. Toxoplasmosis in a patient who was immunocompetent: a case report. *J Med Case Rep* 2011 Jan; 5: 16.

Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* 2000 Nov; 30 (12-13): 1217-1258.

Tinti M, Possenti A, Cherchi S, Barca S, Spano F. Analysis of the SAG5 locus reveals a distinct genomic organization in virulent and avirulent strains of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 2003 Dec; 33 (14): 1605-1616.

Uchôa CM, Duarte R, Laurentino-Silva V, Alexandre GM, Ferreira HG, Amendoeira MR. Standardization of enzyme-linked immunosorbent assay ELISA to detect anti-*Toxoplasma gondii* IgM and IgG antibodies, and comparison with the indirect immunofluorescence technique. *Rev Soc Bra Med Trop* 1999 Nov-Dec; 32 (6): 661-669.

Vallochi AL, Goldeberg AC, Falcai A, Ramasawmy R, Kalil J, Silveira C, et al. Molecular markers of susceptibility to ocular toxoplasmosis, host and guest behaving badly. *Clin Ophthalmol* 2008 Dec; 2 (4): 837-848.

Webster JP. The effect of *Toxoplasma gondii* on animal behavior: playing cat and mouse. *Schizophr Bull* 2007 May; 33 (3): 752-756.

Weiss LM & Dubey JP. Toxoplasmosis: a history of clinical observations. *Int J Parasitol* 2009 Jul; 39 (8): 895-901.

Yunihastuti E, Imran D, Sukmana N. Toxoplasma Encephalitis in HIV-infected Person Acta Med Indones 2005 Jan-Mar; 37-1: 49-50.

Zinecker CF, Striepen B, Tomavo S, Dubremetz JF, Schwarz RT. The dense granule antigen, GRA2 of *Toxoplasma gondii* is a glycoprotein containing O-linked oligosaccharides. Mol Biochem Parasitol 1998 Nov; 97 (1-2): 241-246.

Zuther E, Johnson JJ, Haselkorn R, McLeod R, Gornicki P. Growth of *Toxoplasma gondii* is inhibited by aryloxyphenoxypropionate herbicides targeting acetyl-CoA carboxylase. Proc Natl Acad Sci USA 1999 Nov; 96 (23): 13387-13392.

Relatório de estágio

Laboratório de análises clínicas de rotina

Vicky Bakk

Relatório de Estágio do 2º Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre em Análises
Clínicas

Estágio realizado sob a orientação da Dr^a
Albina Filomena Marques

Setembro, 2012

Declaração de reprodução:

É autorizada a reprodução integral deste relatório de estágio apenas para efeitos de investigação mediante declaração escrita do interessado, que a tal se compromete.

Agradecimentos.

No âmbito da realização deste trabalho, gostaria de agradecer a todos as pessoas que contribuíram para a realização deste estágio curricular e, por conseguinte, para a realização deste relatório:

Ao Professor Agostinho Franklim Pinto Marques por me ter permitido a realização deste estágio.

Ao Laboratório de Análises Clínicas de Gaia Dr^a Albina Filomena Marques, na pessoa da própria Dr^a Albina Filomena Marques, o meu agradecimento pelo acolhimento, pela disponibilidade revelada, bem como pelos importantes conhecimentos transmitidos.

Agradeço de igual forma, a toda a equipa do laboratório pela prestatividade e empenho na minha formação.

E, por fim, um especial agradecimento a todos os meus familiares e amigos, que ao longo de vários meses de trabalho, manifestaram todo o seu carinho e apoio incondicional.

A todos, os meus sinceros agradecimentos.

Índice.

Agradecimentos	lxxiii
Índice de figuras	lxxvii
Lista de abreviaturas e símbolos	lxxix
1. Introdução	81
2. Fundamentação teórica	82
3. Caracterização do LAC-Gaia	83
3.1. História do laboratório	83
3.2. Estrutura organizacional	84
3.2.1. Organigrama funcional	84
3.3. Atividade do laboratório	85
3.4. Protocolos e acordos de prestação de serviços	86
3.5. Implementação do sistema de gestão da qualidade	86
4. Procedimentos técnicos	88
4.1. Colheita do material biológico	88
4.2. Receção e conferência das amostras	89
4.3. Elaboração das listas de trabalho	90
4.4. Processamento das amostras	91
4.5. Elaboração dos relatórios dos pacientes	91
5. Conclusão	93
Bibliografia	94
Anexos	96

Índice de figuras.

Figura 1. Instalações atuais do LAC-Gaia	83
Figura 2. Organigrama funcional do LAC-Gaia	84
Figura 3. Separação das amostras de urina consoante as análises requisitadas	90

Lista de abreviaturas e símbolos.

ACP: Automóvel clube de Portugal.

ADSE: Assistência na doença aos funcionários da administração pública.

APCER: Associação portuguesa de acreditação.

ARS: Administrações regionais de saúde.

CCD: Centro de cultura e desporto da câmara municipal de Vila Nova de Gaia.

CGD: Serviços sociais da caixa geral de depósitos.

CVP: Cruz vermelha portuguesa.

LAC: Laboratório de análises clínicas.

NP EN ISO 9001: Normas de standardização.

PT ACS: Portugal telecom, associação de cuidados de saúde.

SAMS SIB: Sindicato independente da banca.

SGQ: Sistema de gestão da qualidade.

SNS: Serviço nacional de saúde.

1. Introdução

O estágio que realizei, no âmbito do plano curricular do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, decorreu no Laboratório de Análises Clínicas de Gaia Albina Filomena Marques (LAC-Gaia), entre Fevereiro e Maio de 2011, sob a orientação da Dr^a Albina Filomena Marques.

A escolha deste laboratório recaiu sobre o fato deste ser um laboratório conceituado e polivalente, o que me permitiu contactar com a rotina de trabalho praticada neste meio, de modo a procurar a aquisição de competências técnicas, científicas e deontológicas, indispensáveis ao seu funcionamento, que jamais seriam obtidas por meio de conhecimentos teóricos.

O presente trabalho resultou da minha aprendizagem em contexto prático de alguns dos diversos procedimentos elaborados num laboratório de análises clínicas pretendendo descrever as atividades e competências por mim adquiridas ao longo deste estágio, tendo por base os objetivos inicialmente propostos, de modo a abordar de uma maneira global toda a metodologia de trabalho desenvolvida no LAC-Gaia.

2. Fundamentação teórica

Os laboratórios de análises clínicas contribuem de modo inquestionável para a eficiência dos serviços de saúde e para a qualidade de vida da população, ao prestarem auxílio no diagnóstico de patologias, ou mesmo na prevenção das mesmas (Barea Tejeiro, 2000). Os laboratórios devem disponibilizar todo um conjunto de técnicas e metodologias que sejam capazes de auxiliar no diagnóstico de cada paciente, tendo em conta o tempo de resposta necessário para cada caso. Os laboratórios são, então, imprescindíveis na melhoria da assistência ao paciente e da evolução favorável do seu quadro clínico (Plebani, 1999).

Os elementos operacionais essenciais ao bom funcionamento de um laboratório de análises clínicas incluem:

A estrutura organizacional do laboratório, sendo obrigatório que todos os elementos da equipa de trabalho possuam as competências e formação necessárias, de modo a garantir a eficácia das tarefas que executam (Ezzele *et al.*, 2008).

Todos os procedimentos operacionais devem estar documentados e os equipamentos utilizados nas análises aos produtos biológicos devem estar a funcionar dentro das especificações do fabricante, sendo necessária a manutenção preventiva diária, semanal ou mensal dos mesmos, de modo a fornecerem informações precisas e resultados fiáveis. Além disso, o laboratório deve documentar todas as manutenções e calibrações efetuadas aos seus equipamentos devendo esta informação estar disponível a todos os elementos da equipa de trabalho (Ezzele *et al.*, 2008).

Todos os reagentes utilizados nas análises devem seguir regras rigorosas de armazenamento e manuseamento. É necessário também que exista uma metodologia de trabalho que garanta a qualidade no processo de colheita, conservação, armazenamento e transporte dos produtos biológicos, de modo a que estes estejam em perfeitas condições para serem analisados com fiabilidade de resultados (Ezzele *et al.*, 2008).

3. Caracterização do LAC-Gaia

3.1. História do laboratório

Em 1981, o LAC-Gaia começou a fornecer os serviços à população, na sua antiga localização, sendo adquirido, pelos atuais sócios-gerentes, em 1989. Estes procuraram desde logo reorganizar e dinamizar a estrutura existente, através do alargamento do âmbito geográfico de atuação, como forma de responder às condições do mercado fortemente concorrencial, e da abertura de novos postos de colheita de produtos biológicos em diversas localidades, nomeadamente em Avintes, Oliveira do Douro, Torrados, Felgueiras, Vila Nova de Gaia (Gaia 2) e Airães.

Com vista à melhoria de condições, o LAC-Gaia deu seguimento ao seu progresso com aquisição de novos equipamentos, com a criação de um sistema informático de gestão da sua atividade e com a mudança, em 2005, para as instalações atuais (Figura 1), na Rua Álvares Cabral, 77 R/C.

Em Abril de 2003, este laboratório foi certificado após Auditoria de Concessão pela APCER para a norma de standardização (NPENISO 9001).



Figura 1. Instalações atuais do LAC-Gaia
(www.lacgaia.pt)

3.2. Estrutura Organizacional

3.2.1. Organigrama Funcional (Figura 2)

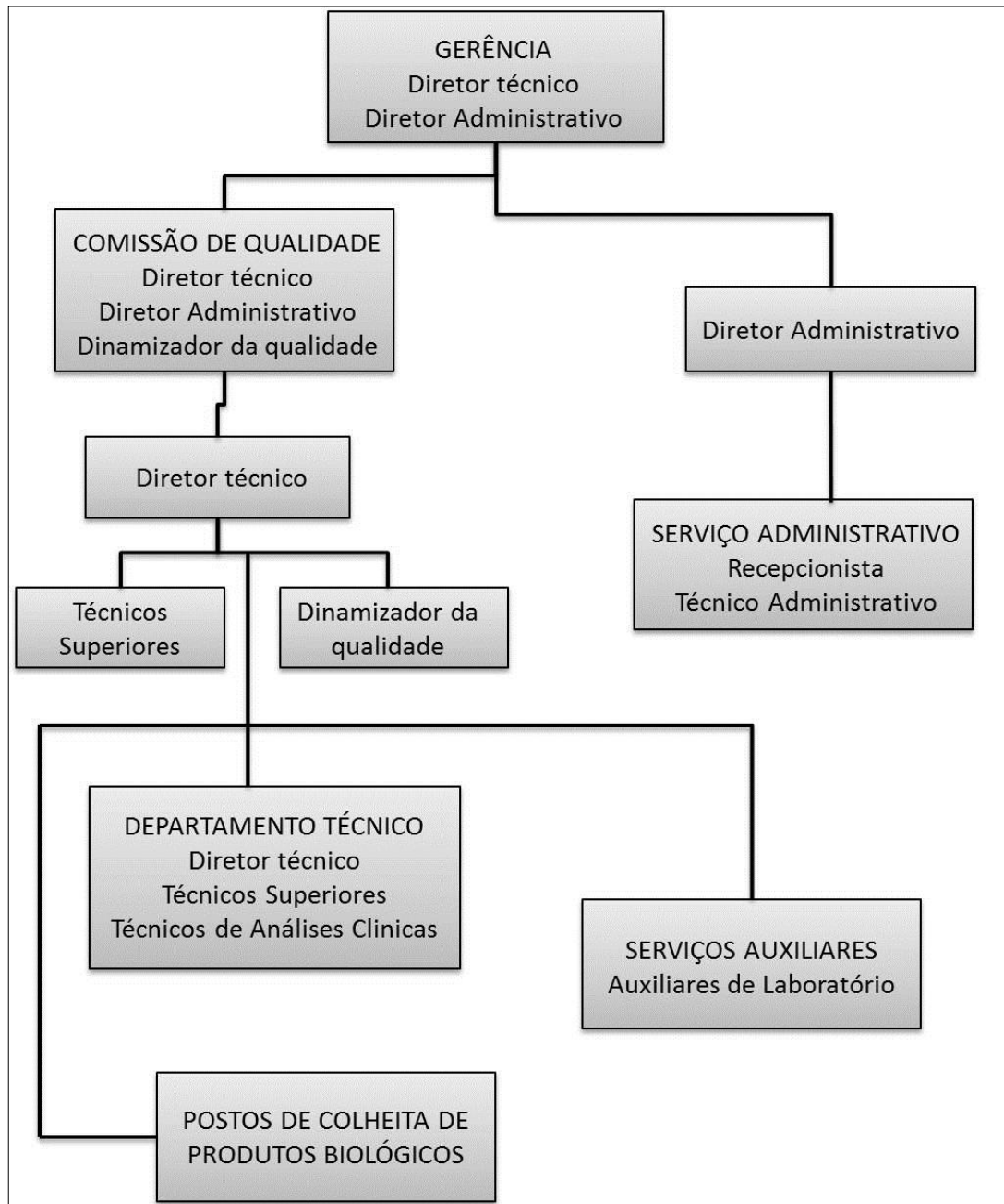


Figura 2. Organigrama funcional do LAC-Gaia (adaptada do Manual de Qualidade LAC-Gaia)

3.3. Atividade do laboratório

O LAC-Gaia é reconhecido pela sua vasta experiência na área das Análises Clínicas. É constituído por uma equipa de trabalho especializada que presta serviços aos seus clientes de acordo com os critérios de utilidade clínica reconhecidos pela comunidade científica. A atividade do LAC-Gaia incide sobre as seguintes valências técnicas: bioquímica, microbiologia, imunologia e endocrinologia.

Em termos funcionais, o laboratório encontra-se dividido em quatro setores, onde ocorrem respetivamente a receção e conferência das amostras, o processamento das mesmas, a aquisição e a análise/interpretação dos resultados e a elaboração dos relatórios dos pacientes.

O LAC-Gaia trabalha em diversas áreas laboratoriais encontrando-se equipado com todos os instrumentos indispensáveis à sua rotina laboratorial, nomeadamente:

Bioquímica:

- Autoanalisador de bioquímica Integra 400 (Anexo 1);
- Autoanalisador de urinas Urisys (Anexo 2);
- Geniolab (Electroforeses) (Anexo 3);
- Autoanalisador de hemoglobina glicada Menarini A1 – Auto A1c HA – 8140 (Anexo 4).

Imunologia:

- Autoanalisador Elecsys 2010 (Anexo 5);
- Aparelho mini-VIDAS (Anexo 6).

Hematologia:

- Autoanalisador de hematologia Sysmex XT – 1800i (Anexo 7);
- Microscópio óptico Nikon com fluorescência;
- Coagulómetro Option 4 Plus;
- Coagulómetro Start 4;
- Sistema automático Ves – Matic 30 (Anexo 8).

Microbiologia:

- Câmara de fluxo laminar (Anexo 9);
- Estufa;
- Ansa de platina;
- Microscópio óptico Nikon com fluorescência;
- BioMérieux Vitek Compact 2 (Anexo 10).

3.4. Protocolos e acordos de prestação de serviços

O LAC-Gaia possui protocolos e acordos de prestação de serviços com várias entidades, nomeadamente:

- Serviço nacional de saúde (SNS), administrações regionais de saúde (ARS);
- Assistência na doença aos funcionários da administração pública (ADSE);
- Portugal telecom, associação de cuidados de saúde (PT ACS);
- Serviços sociais da caixa geral de depósitos (CGD);
- Centro de cultura e desporto da câmara municipal de Vila Nova de Gaia (CCD);
- Sindicato independente da banca (SAMS SIB);
- Medis seguros;
- Multicare seguros;
- Cruz vermelha portuguesa (CVP);
- Automóvel clube de Portugal (ACP);
- Empresas de medicina do trabalho;
- Outros laboratórios de análises clínicas privados;
- Clínicas veterinárias.

3.5. Implementação do sistema de gestão da qualidade

A implementação do sistema de gestão da qualidade (SGQ) é de suma importância na padronização e controlo de todos os procedimentos. Permite medir a eficiência e verificar a eficácia das ações implementadas, com vista a melhorar continuamente todo o processo e satisfazer as necessidades do cliente (Pinto e Pinto, 2011).

No caso do LAC-Gaia, todo o laboratório e atividades relacionadas com os processos de gestão, realização e suporte de análises clínicas foram abrangidos pelo SGQ. Este sistema está definido e implementado de acordo com os requisitos da NP EN ISO 9001, das normas para o Laboratório Clínico e do Manual de Boas Práticas Laboratoriais.

Decreto-Lei nº 217/99 de 15 de junho de 1999

Artigo 7.º

“Manual de boas práticas

1 - Dos manuais de boas práticas para os laboratórios de análises clínicas a que se refere o artigo 5.º constam, designadamente:

- a) A listagem das nomenclaturas a utilizar pelos profissionais de saúde;
- b) A indicação dos equipamentos específicos para cada valência laboratorial;
- c) As restrições à colheita de produtos biológicos;
- d) As regras a observar na colaboração com outros laboratórios, nacionais e estrangeiros, definindo neste último caso uma orientação para os casos excepcionais em que seja permitido o recurso a eles;
- e) A responsabilidade e a independência da direcção técnica do laboratório;
- f) Indicações pormenorizadas sobre os procedimentos operativos, designadamente quanto à identificação dos doentes, condições de colheita, etiquetagem, métodos a utilizar, validação dos resultados e sua transmissão, garantia de qualidade, confidencialidade dos resultados e requisitos dos relatórios;
- g) Instrução sobre a manutenção dos equipamentos e periodicidade das respectivas verificações, bem como sobre os reagentes;
- h) Orientações sobre armazenamento e segurança;
- i) Regras específicas quanto a organização, áreas e instalações;
- j) Normas relativas à instalação de postos de colheita;
- k) O número mínimo de técnicas que os laboratórios ficam obrigados a executar por cada valência;
- l) As regras sobre o sistema de gestão e recolha de resíduos.” (...)

O SGQ do LAC-Gaia abrange todos os requisitos da norma NP EN ISO 9001, exceptuando a cláusula 7.3, que neste caso não é aplicável.

4. Procedimentos técnicos

No decorrer de todo o estágio a minha preocupação fulcral foi observar de perto todo o procedimento que é executado desde a colheita do material ou receção do mesmo proveniente de outros postos de colheita associados, até ao registo dos resultados das análises obtidos de cada amostra e elaboração dos relatórios dos pacientes. Infelizmente, e numa área tão rica em conhecimentos e metodologias de trabalho, não me foi possível, num curto espaço de tempo aprofundar algumas delas.

Como tal, pude identificar várias etapas no procedimento laboratorial, sendo estas:

- 4.1. Colheita do material biológico;
- 4.2. Receção e conferência de amostras;
- 4.3. Elaboração das listas de trabalho;
- 4.4. Processamento das amostras;
- 4.5. Elaboração dos relatórios dos pacientes.

4.1. Colheita do material biológico

Esta primeira etapa do processo, inicia-se com a chegada do paciente, com a respetiva requisição médica, ao laboratório central ou a algum dos postos de colheita do LAC-Gaia. Mediante a análise da requisição é efetuada a colheita do material biológico que posteriormente será analisado. A colheita das amostras e o transporte das mesmas até ao laboratório central (nos casos em que a amostra é colhida no domicílio ou nos postos de colheita) são feitos por profissionais habilitados e com o máximo de rigor, seguindo protocolos específicos já estabelecidos, mediante cada tipo de material biológico requisitado.

4.2. Receção e conferência das amostras

Nesta etapa do processo as amostras provenientes dos diversos postos de colheita chegam ao laboratório central, armazenadas em contentores térmicos, para evitar a deterioração das mesmas e são acompanhadas pelas respetivas requisições médicas.

Nas requisições médicas é possível obter toda a informação necessária para separar as amostras consoante as análises que são requisitadas.

As amostras chegam com uma etiqueta identificativa gerada pelo sistema informático do laboratório, na qual consta um código de barras e um código alfanumérico que nos dá a informação de qual posto de colheita a amostra é proveniente e o número interno do paciente. Esta etiqueta identificativa também se encontra presente na requisição médica. Sendo assim, é possível confirmar que as amostras que são pedidas na requisição foram mesmo colhidas, identificá-las e ainda fazer a seleção dos procedimentos a aplicar nesta mesma amostra a partir das análises requisitadas pelo médico.

Perante a minha curta experiência, vou tomar como exemplo deste procedimento, a receção e conferência de amostras de urinas, que chegam ao laboratório central em grandes quantidades diariamente. Como tal, podem ser requeridas diversas análises a este tipo de material biológico, tais como: análise tipo II, análise bacteriológica ou análise ao sedimento.

Depois de conferidas as amostras que chegam ao laboratório central provenientes dos diversos postos de colheitas, as requisições médicas são introduzidas no sistema.

No sistema informático, cada paciente possui um número interno identificativo, já mencionado anteriormente e, na sua ficha constam, se for possível, os antigos resultados de análises realizadas no LAC-Gaia. Nesta mesma ficha serão introduzidos os resultados das futuras análises requeridas pelo médico.

No caso concreto das amostras de urina, após a sua conferência, estas são separadas por ordem alfanumérica, sendo que na linha da frente são colocados os frascos cujas análises a efetuar são bacteriológicas ou bacteriológicas e análise tipo II, seguidas das amostras cujas análises a efetuar são apenas tipo II e, por último, as amostras para análise ao sedimento urinário (Figura 3).



Figura 3 – Separação das amostras de urina consoante as análises requisitadas

De seguida, as amostras são transferidas para tubos de ensaio, pela mesma ordem que foram separadas, para que não haja qualquer tipo de falha no decorrer do processo, e são identificadas com as respetivas etiquetas com os números e códigos internos.

4.3. Elaboração das listas de trabalho

Após a conclusão da conferência e separação das amostras são elaboradas as listas de trabalho, pelas quais os técnicos de análises clínicas do laboratório guiam o seu trabalho.

As análises efetuadas às amostras de urina distinguem-se em duas listas de trabalho:

- **Lista 1:** incluem-se os códigos identificativos internos das amostras que serão submetidas a análise tipo II, microalbuminúria das amostras de urina 24 horas e das análises apenas ao sedimento.

- **Lista 2:** incluem-se os códigos identificativos internos das amostras que serão submetidas apenas a exame bacteriológico e, ainda, das amostras que serão submetidas a análise tipo II e análise bacteriológica.

4.4. Processamento das amostras

A realização das análises aos produtos biológicos/processamento das amostras, na sua maioria, é feita nos diversos equipamentos laboratoriais referidos anteriormente. No caso das amostras de urina, estas são introduzidas no autoanalisador de Urinas Urisys (permite a avaliação standardizada às tiras-teste de urina, para determinação de certos constituintes na urina indicativos de alterações renais, hepáticas ou metabólicas, com rapidez e eficácia) pela mesma ordem com que foram separadas previamente. O aparelho fornece-nos, no final da análise, a lista das amostras consideradas “patológicas” e a lista das amostras consideradas “normais”. Relativamente às amostras patológicas, estas devem sofrer uma centrifugação prévia para depois o seu sedimento ser analisado criteriosamente ao microscópio, com o intuito de identificar possíveis alterações com interesse clínico para o diagnóstico de uma possível patologia.

4.5. Elaboração dos relatórios dos pacientes

Após todo o trabalho descrito anteriormente, a última etapa é registar os resultados provenientes das diversas análises realizadas ao material biológico. Os resultados considerados “normais” são enviados pelos aparelhos diretamente para a ficha do paciente no sistema informático. No entanto, os resultados de análises elaboradas manualmente, devem ser introduzidos cautelosamente nas fichas dos pacientes, para que não ocorra nenhuma falha ou troca de informação. Tanto os resultados enviados automaticamente para o sistema informático, como os resultados introduzidos manualmente devem ser validados antes de serem entregues os boletins aos pacientes.

5. Conclusão

O estágio que realizei no LAC-Gaia correspondeu às minhas expectativas iniciais, embora não me tenha sido possível, num curto espaço de tempo, aprofundar algumas das metodologias de trabalho desenvolvidas.

Contudo, ao longo destes três meses, consegui contactar com todo o processo global de funcionamento de um laboratório de análises clínicas de rotina, desde a colheita das amostras de produtos biológicos até ao registo dos resultados das análises nas fichas dos pacientes.

Este estágio possibilitou-me compreender quais as competências e responsabilidades necessárias que cada elemento que compõe a equipa de trabalho deve ter. Deste modo, pude perceber a importância da atividade desenvolvida pelo LAC-Gaia, no âmbito da bioquímica, microbiologia, imunologia, endocrinologia e hematologia.

No que diz respeito à rotina laboratorial tive a oportunidade de desempenhar diversas tarefas, desde a introdução no sistema informático das requisições médicas, receção, conferência e processamento das amostras, até à interpretação de resultados.

Por fim, considero que este estágio teve um contributo importantíssimo na minha formação académica e científica, através da experiência prática que me proporcionou, consolidando muitos dos conhecimentos teóricos por mim adquiridos ao longo do meu percurso académico.

Bibliografia

Barea Tejeiro J. El Hospital, empresa de servicios. Gestión y Evaluación de Costes Sanitarios. Fundación Signo 2000; 1: 93-100.

Ezzelle J, Rodriguez-Chavez IR, Darden JM, Stirewalt M, Kunwar N, Hitchcock R, et al. Guidelines on good clinical laboratory practice: bridging operations between research and clinical research laboratories. J Pharm Biomed Anal 2008 Jan; 46 (1):18-29.

IAPMEI – Instituto de Apoio às Pequenas e Médias Empresas e à Inovação. Disponível em <http://www.iapmei.pt/iapmei-leg-03.php?lei=2381> [acedido em 05/09/2012].

LAC-Gaia. Disponível em <http://www.lacgaia.pt> [acedido em 05/09/2012].

Manual da qualidade – LAC-Gaia.

Pinto, JC e Pinto, AL. A importância da certificação de sistemas de gestão da qualidade em Portugal. Rev. Portuguesa e Brasileira de Gestão 2011, 10 (1-2): 48-61.

Plebani M. The Changing Face of Clinical Laboratories. Clin Chem Lab Med 1999; 37: 711-717.

Anexos

Autoanalizador de bioquímica Integra 400



Autoanalizador de urinas Urisys



Aparelho de eletroforeses Geniolab



Autoanalizador de hemoglobina glicada Menarini A1 – Auto A1c HA – 8140



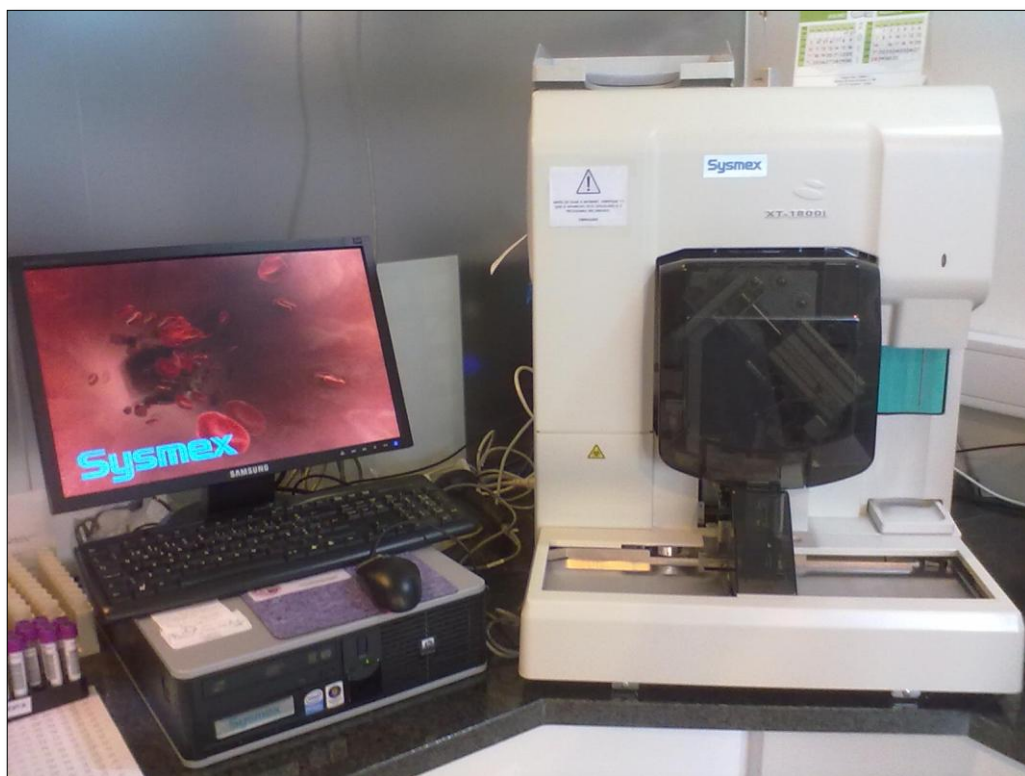
Autoanalizador Elecsys 2010



Aparelho mini-VIDAS



Autoanalizador de hematologia Sysmex XT – 1800i



Sistema automático Ves – Matic 30



Câmara de fluxo laminar



BioMérieux Vitek Compact 2

