Lília Spaleta Targa

Estudo da carga parasitária e dos genótipos de *Toxoplasma gondii* na toxoplasmose congênita

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

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Profa. Dra. Thelma Suely Okay

São Paulo

2012

Ficha catalográfica

Preparada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da
Universidade de São Paulo

© Reprodução autorizada pelo autor

Targa, Lília Spaleta

Estudo da carga parasitária e dos genótipos de *Toxoplasma gondii* na toxoplasmose congênita / Lília Spaleta Targa. – São Paulo, 2012.

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

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: Thelma Suely Okay

Descritores: 1. TOXOPLASMOSE CONGÊNITA. 2. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR. 3. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE. 4. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL. 5. CARGA PARASITÁRIA. 6. TÉCNICAS DE GENOTIPAGEM.

USP/IMTSP/BIB-14/2012.

Universidade de São Paulo
Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

Candidata: Lília Spaleta Targa

Titulo da Dissertação: Estudo da carga parasitária e dos genótipos de *Toxoplasma gondii* na toxoplasmose congênita

Orientadora: Profa. Dra. Thelma Suely Okay

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado,
em sessão pública realizada em/...../....., considerou

() APROVADO(A) () REPROVADO(A)

Examinador(a) Assinatura _____

Nome _____

Instituição _____

Examinador(a) Assinatura _____

Nome _____

Instituição _____

Presidente Assinatura _____

Nome _____

Instituição _____

*“No que diz respeito ao desempenho, ao compromisso, ao esforço, à dedicação,
não existe meio termo. Ou você faz uma coisa bem feita, ou não faz.”*

Ayrton Senna da Silva

*“Não se contente em trilhar um caminho estabelecido. Ao contrário, vá para onde
não há caminho algum e deixe seu rastro”.*

Muriel Strode

Aos meus pais, Paulo e Cecília

Por todo o apoio e sacrifício que fizeram para que eu chegasse até aqui, por sempre apostarem em mim, por terem me ensinado a enfrentar todos os obstáculos da vida com muita força, fé, esperança e por todo amor, carinho e dedicação incondicional em todas as fases da minha vida

Ao meu irmão, Gabriel

Pelo imenso companheirismo, amizade, pelas longas conversas, risadas, conselhos e por estar sempre participando da minha história.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre presente no meu caminho.

À minha orientadora Profa. Dra. Thelma Suely Okay, pelas conversas, pelos ensinamentos, pelo apoio, mostrando os caminhos e tornando-se uma pessoa fundamental para a realização deste sonho. Apesar de todas as nossas diferenças durante essa jornada, o meu muito obrigada por tudo!

Ao Dr. Antonio Walter Ferreira, por todo o apoio, todos os conselhos, incentivo e motivação, por ser um homem tão especial que acabou se tornando dia a dia um grande amigo, que espero que continue presente em minha vida mesmo após o final desta jornada.

À Ms. Laura Masami Sumita, por me auxiliar nos experimentos, transmitir seus conhecimentos, incentivar-me nos momentos mais difíceis, tornando-se minha “mamãe do lab”, sempre tratando-me com muito carinho e paciência.

À Dra. Sandra do Lago Moraes, por todo incentivo, ajuda, motivação, por alegrar os meus dias no laboratório com suas histórias, tornando-se uma grande amiga que quero levar para a vida toda.

Ao Vagner Carvalho, pela amizade, conversas, risadas, por todos os ensinamentos de Biologia Molecular, que me acompanhou desde o início desse projeto, sempre com muita paciência e prestatividade.

À Dra. Kelly Kanunfre, por toda paciência, atenção e ajuda, principalmente nos últimos detalhes da tese.

Aos funcionários do Laboratório de Virologia, que sempre me receberam com muito carinho, atenção e me proporcionaram um ambiente agradável para a realização do Real Time PCR, fundamental para esse estudo.

À Camila Romano, pela troca de informação, dicas e toda a ajuda para a realização da análise do seqüenciamento.

Ao Daniel Granato pela ajuda mesmo que a distância para análise estatística.

Aos meus avós João e Josepha (*in memorian*), Nelson e Olga, por representarem meus referenciais de honra, coragem e determinação.

À toda minha família e Eliana que também já faz parte da família, pela força, incentivo e por sempre acreditarem em mim.

À minha amiga Clara, por estar sempre ao meu lado desde o início no laboratório, pelo apoio, conselhos, pelas conversas intermináveis, risadas, passeios, sendo uma pessoa muito importante nesta caminhada.

Aos meu amigos “do laboratório” Jonatas Cristian Rodrigues, Júlio César Rente Ferreira Filho, Leandro Emídio Teixeira, Lídia Yamamoto, Paulo Shimokawa Tadashi e Wilson Domingues, por toda ajuda, incentivo e momentos de desabafos, por sermos um grupo unido na alegria ou na tristeza, por todas as conversas, brincadeiras e risadas intermináveis que sentirei muita falta. Quero vocês sempre comigo!

As minhas amigas de longa data Fabiene e Lara, por sempre me apoiarem nos momentos difíceis, escutarem meus desabafos, choros, por me ajudarem no que fosse possível e por todas as nossas conversas, conselhos, risadas e loucuras que jamais vou esquecer!

As minhas amigas Jana, Carol, Camila, Camila Machado, Cinthia, Claudinha, Juliana, Sarita e Thaynan, pela amizade, pelas conversas, trocas de informações, por fazerem parte desta jornada em momentos diferentes, mas cada uma contribuindo com o seu jeitinho.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Virologia, meu segundo laboratório, em especial à Cris Oliveira, Carol, Funico, Dani, Michele, Luiz, Felipe, Cris Fink, Cyri, Renata, Thiaguinho e Paulo por me ajudarem em muitos momentos, pelo companheirismo, pela amizade, carinho, conversas e risadas.

À todos os funcionários, colegas e amigos que fiz no Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia, Nice, Egon, Dr. Paulo Cotrin, Edite, Marcela, Mussya, Marilda, Bete, Luciana, Lilian, Dra.Hiro, Edna, Cris, Bia (doida), Flaviane, Eduardo, Luiza, Dr. Angelo, Amandona, Amandinha, Ive, Sandra, Dra. Carmem, Willian, Aryane, Guita, pela prestatividade, consideração, pela convivência, amizade e momentos de descontração.

À Eliane, secretária da CPG, à Sônia da biblioteca, e ao Daniel da informática, por toda paciência, prestatividade e colaboração para a realização desse trabalho.

Aos todos os meus amigos de Jundiaí, que são muitos, por isso não vou citar um a um, por participarem dos meus momentos de alegria, bebedeiras e pelas nossas inúmeras histórias. À distância e o tempo nunca irão nos separar, vocês fazem parte do meu coração!

E finalmente, agradeço a todos que me ajudaram direta ou indiretamente para o desenvolvimento deste projeto. Um MUITO OBRIGADO a todos vocês!

“Descobri como é bom chegar quando se tem paciência, e para chegar onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso, antes de mais nada querer. Um dia é preciso parar de sonhar, tirar os planos das gavetas e de algum modo, partir.”

Amir Klink

RESUMO

Targa LS. Estudo da carga parasitária e dos genótipos de *Toxoplasma gondii* na toxoplasmose congênita (dissertação). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2012.

O genótipo e a carga parasitária constituem dois dos principais fatores associados à patogênese na toxoplasmose congênita. Na Europa e nos EUA, o genótipo II é o mais prevalente em infecções congênitas, enquanto que na América do Sul existem evidências apontando uma maior frequência de genótipos atípicos ou recombinantes, associados a casos mais graves. A carga parasitária também parece atuar como fator de risco independente associado ao prognóstico fetal. Os objetivos do estudo foram padronizar uma amplificação quantitativa (qPCR) com iniciadores do gene B1 para avaliar a carga parasitária; determinar o genótipo parasitário por multiplex-*nested*-PCR-RFLP dos marcadores 5'-SAG2, 3'-SAG2, SAG3 e GRA6, seguido de sequenciamento para confirmação da RFLP e análise de mutações; e verificar se existiria associação entre a carga parasitária e os genótipos parasitários nas mesmas gestações. Foram analisadas 76 amostras de líquido amniótico de gestações com toxoplasmose e 31 amostras controle. A qPCR apresentou LOD de 10 parasitos/mL, detectou as 76 amostras de estudo e nenhum controle. As cargas parasitárias variaram de 222 a 808.328 parasitos/mL. Houve duas amostras com valores acima de 10^4 parasitos/mL, apesar de todas as gestantes serem tratadas. Na genotipagem, SAG3 amplificou 55 amostras (54 tipo III e uma tipo II); 5' e 3'-SAG2 amplificaram 54 amostras (todas tipo I), e GRA6, amplificou 20 amostras (todas tipo III). A única amostra com genótipo parasitário SAG3-tipo II foi a que apresentou mais mutações (n=4), carga parasitária de 958 parasitos/mL, porém o recém-nascido foi assintomático. Houve diferença do número de amostras amplificadas por SAG3, e 5' e 3'-SAG2 em relação a GRA6 (McNemar, $p < 0,001$). Os sequenciamentos confirmaram 100% dos resultados de RFLP, e foram encontradas 24 amostras com e 52 sem mutações, não existindo diferenças entre as cargas parasitárias dos dois grupos (Mann-Whitney, $p = 0,085$). Mais de uma mutação foi observada em cinco amostras. Foram detectadas 37 mutações no estudo: 26 heterozigotas/sinônimas e 11 homozigotas/sinônimas, não havendo regiões *hot spot*. Quanto à correlação clínico-laboratorial, dos 76 recém-nascidos, todos apresentaram IgM positiva ao nascimento, e 75 eram

assintomáticos. O único recém-nascido sintomático apresentava tríade de Sabin e uma das duas cargas parasitárias mais elevadas do estudo (309.574 parasitos/mL), porém o genótipo não foi discriminante e não havia mutações. A outra amostra com carga parasitária acima de 10^4 parasitos/mL pertencia a recém-nascido assintomático, com genótipo não discriminante, e sem mutações. O estudo concluiu que a técnica de *Real Time* PCR (qPCR) foi padronizada com sucesso, usando os iniciadores B22 e B23 do gene B1 do parasito, podendo ser empregada na rotina diagnóstica. Além disso, foi possível realizar a genotipagem das amostras incluídas no estudo, com melhor desempenho de SAG3 e 5' e 3'-SAG2. O sequenciamento confirmou a confiabilidade da técnica de RFLP, e encontrou frequência elevada de mutações, todas sinônimas, sem regiões *hot spot*, e aparentemente sem associação com a carga parasitária. Houve elevada variabilidade das cargas parasitárias, porém grande homogeneidade dos genótipos parasitários, não tendo sido observada associação entre a carga parasitária e os genótipos de *T. gondii* no estudo.

Descritores: Toxoplasmose congênita; Técnicas de diagnóstico molecular; Reação em Cadeia da Polimerase; Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real; Carga parasitária; Técnicas de genotipagem.

ABSTRACT

Targa LS. Study of parasite load and genotypes of *Toxoplasma gondii* in congenital toxoplasmosis (dissertation). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2012.

The genotype and the parasite load are two of the main factors associated with pathogenesis in congenital toxoplasmosis. In Europe and the USA, genotype II is the most prevalent in congenital infections, while in South America there is evidence pointing to a higher frequency of atypical or recombinant genotypes associated with more severe cases. The parasite load also appears to act as an independent risk factor associated with fetal prognosis. The study objectives were to standardize a quantitative amplification (qPCR) with B1 gene primers to assess the parasite load; determine the genotype by multiplex-nested-PCR-RFLP of 5' and 3'-SAG2, SAG3 and GRA6 markers, followed by sequencing to confirm RFLP and analyze mutations, verifying whether there is association between parasite load and parasite genotypes in the same pregnancies. We analyzed 76 amniotic fluid samples from pregnancies with toxoplasmosis and 31 controls. The qPCR presented LOD of 10 parasites/mL, detected the 76 study samples and no control. Parasite loads ranged from 222 to 808,328 parasites/mL. There were two samples with values above 10^4 parasites/mL, despite all pregnant women be treated. In genotyping, SAG3 amplified 55 samples (54 type III and 1 type II); 5' and 3'-SAG2 amplified 54 samples (all type I); and GRA6, amplified 20 samples (all type III). The only sample with genotype SAG3-type II showed the highest number of mutations ($n=4$), parasite load of 958 parasites/mL, but the newborn was asymptomatic. There were differences in the number of samples amplified by SAG3, and 5' and 3'-SAG2 over GRA6 (McNemar test, $p < 0.001$). Sequencing confirmed 100% of the RFLP results; and found 24 samples with and 52 without mutations, with no difference between the parasite load of these two groups (Mann-Whitney, $p = 0.085$). More than one mutation was observed in five samples. A total of 37 mutations were detected in this study: 26 heterozygotes/synonymous and 11 homozygous/synonyms, with no hot spot regions. Regarding the clinical-laboratory correlation, among the 76 newborns, all showed positive IgM at birth, and 75 were asymptomatic. The only symptomatic newborn presented the Sabin's triad and one of the two higher parasite loads in the study (309,574 parasites/mL). However, the

genotype was not discriminant and no mutations were detected. The other sample with parasite load above 10^4 parasites/mL belonged to an asymptomatic newborn with a non-discriminating genotype, and no mutations. The study concluded that the Real Time PCR (qPCR) was successfully developed with primers B22 and B23 of the parasite B1 gene, and can be used in routine practice. Moreover, it was possible to perform the samples genotyping, with better performance of SAG3 and 5' and 3'-SAG2. Sequencing results confirmed the RFLP reliability, and found a high frequency of mutations, all synonymous, with no hot spot regions, and apparently not associated with the parasite load. There was a high variability in parasite load, however great homogeneity of parasite genotypes, with no association between the parasite load and *T. gondii* genotypes in the study.

Descriptors: Congenital toxoplasmosis; Molecular diagnostic techniques; Polymerase Chain Reaction; Real Time Polymerase Chain Reaction; Parasite load; Genotyping techniques.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estruturas e organelas de <i>T. gondii</i> .	25
Figura 2	(A) Taquizoítos presentes em líquido peritoneal de camundongo, corados pela técnica de Giemsa (B). Cisto observado em tecido muscular contendo bradizoítos, coloração de Giemsa 1.000 x (C) Oocisto esporulado contendo esporozoítos.	26
Figura 3	Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i> , contendo as diferentes etapas do ciclo biológico do parasito em suas três formas parasitárias, tanto no hospedeiro intermediário, quanto no definitivo.	30
Figura 4	Vias de transmissão de <i>T. gondii</i> .	31
Figura 5	Mapa genético dos 14 cromossomos de <i>Toxoplasma gondii</i> com a localização de diferentes genes e <i>loci</i> utilizados em estudos de genotipagem e de ligação.	45
Figura 6	Teste de qPCR realizado com 45 ciclos. O Ct das amostras positivas variou de 28 a 35.	76
Figura 7	Diagrama mostrando amostras contendo <i>T. gondii</i> que foram amplificadas na qPCR.	77
Figura 8	Curva de dissociação de amostras positivas (temperatura de <i>melting</i> entre 82,7 e 83,7°C), e de amostras negativas (temperatura de <i>melting</i> inferior ao intervalo estipulado).	77
Figura 9	Curva padrão com o teste de diluições de taquizoítos: 10 ⁴ , 10 ³ , 10 ² , 10.	78
Figura 10	Diagrama mostrando a inclinação da curva (slope) de - 3,53.	79
Figura 11	Diagrama representativo da variação de 1 grau (82,7°C a 83,7°C) tolerada para a temperatura de hibridização (<i>melting</i>) das amostras positivas.	79
Figura 12	Perfil de restrição enzimática de produto do gene SAG3 digerido com a enzima <i>NciI</i> que diferencia os genótipos I, II e III de <i>T.gondii</i> .	81

- Figura 13 Metade superior: perfil de restrição enzimática de produto do gene SAG2 (3'-SAG2 e 5'- SAG2) digerido com as enzimas *HhaI* e *Sau3aI*, respectivamente. Metade inferior: produto do gene GRA6 digerido com a enzima *MseI* que diferencia os genótipos I, II e III de *T.gondii*. 82
- Figura 14 Sequenciamento do produto de amplificação do gene SAG3 da amostra 194 comparada ao protótipo do genótipo III (VEG). Na posição nucleotídica indicada pela seta existe, na amostra 194, uma mutação heterozigota e sinônima Y (C ou T), enquanto nos três protótipos, representados pela cepa VEG, o nucleotídeo nesta posição é o T (alelo selvagem). 89
- Figura 15 Sequenciamento de produtos de amplificação do gene 5'-SAG2 das amostras 110 e 180. Na posição nucleotídica indicada pela seta existe uma mutação homozigota/sinônima com troca do alelo T, selvagem, representado em vermelho (amostra 180), pelo alelo C, mutado, em azul, presente na amostra 110. 90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Descrição dos iniciadores, temperaturas e ciclagem para padronização da qPCR.	62
Tabela 2	Marcadores moleculares utilizados na genotipagem de <i>T. gondii</i> , com seus respectivos genes e localização.	63
Tabela 3	Descrição dos iniciadores externos, peso molecular dos amplificados e referências.	65
Tabela 4	Descrição dos iniciadores internos, peso molecular dos amplificados e referências.	66
Tabela 5	Protocolo padronizado da qPCR.	75
Tabela 6	Frequência de detecção dos três sistemas testados no multiplex- <i>nested</i> -PCR para genotipagem de <i>T. gondii</i> em 76 amostras de líquido amniótico.	83
Tabela 7	Genótipos de <i>T. gondii</i> das 76 amostras de líquido amniótico analisadas no presente estudo.	84
Tabela 8	Frequência de mutações heterozigotas e sinônimas, e outras alterações.	91

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Distribuição das 76 amostras de líquido amniótico de acordo com a genotipagem pela multiplex- <i>nested</i> -PCR (SAG3, SAG2 e GRA6).	84
Gráfico 2	Agrupamento das amostras de líquido amniótico de acordo com o marcador (SAG3, 5' e 3' –SAG2 e GRA6) e a carga parasitária (log).	87
Gráfico 3	Comparação das medianas de carga parasitária do grupo formado pelas amostras com mutações em relação ao grupo sem mutações (Mann-Whitney, $p=0,085$).	92

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
°C	Graus Celsius
Ct	do inglês “threshold cycle”
DNA	do inglês “desoxyribonucleic acid”
dNTP	Mistura dos quatro deoxinucleotídeos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)
EDTA	do inglês “Ethylene diamine tetracetic acid”
EIA	Enzima imuno-ensaio
ELISA	do inglês “Enzyme-linked immunosorbent assay”
et al.	e outros
FISH	do inglês “Fluorescent in Situ Hybridization”
FRET	do inglês “Fluorescent Resonance Energy Transfer”
g	Aceleração da gravidade
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IgG	Imunoglobulina de classe G
IgM	Imunoglobulina de classe M
HLA	do inglês “Human Leukocyte Antigen”
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IMT	Instituto de Medicina Tropical
LA	Líquido Amniótico
LOD	do inglês “Limit of detection”
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
mL	Mililitros
MLEE	do inglês “Multi-Locus Enzyme Electrophoresis”
nd	Não determinado
ng	Nanogramas

TE	do inglês “Toxoplasmic encephalitis” ou neurotoxoplasmose
p	Índice de probabilidade
pb	Pares de base
PCR	do inglês “Polymerase Chain Reaction”
qPCR	PCR Quantitativa em Tempo Real
RFLP	do inglês “Restriction Fragment Length Polymorphism”
RNA	do inglês “ribonucleic acid”
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
Tm	do inglês “temperature of melting”
U	Unidades
UV	Ultravioleta
VZV	Varicella Zoster
PV	Parvovírus
CMV	Citomegalovírus
Rb	Rubéola
µg	Microgramas
µL	Microlitros
µM	MicroMolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	23
1.1 Considerações Históricas	23
1.2 Agente etiológico	24
1.3 Ciclo de vida	27
1.4 Transmissão	30
1.5 Formas de infecção	32
1.5.1 Infecção Congênita	32
1.5.2 Infecção em indivíduos imunocompetentes.....	34
1.5.3 Infecção em indivíduos imunodeficientes.....	35
1.5.4 Infecção ocular	36
1.6 Diagnóstico Laboratorial	37
1.6.1 Diagnóstico sorológico.....	37
1.6.2 Diagnóstico molecular.....	38
1.7 Tratamento	41
1.8 Classificação das cepas de <i>T.gondii</i>	42
1.8.1 Características moleculares de <i>Toxoplasma gondii</i> e genótipos parasitários.....	44
1.9 Métodos de tipagem de <i>T.gondii</i>	45
2 JUSTIFICATIVA.....	53
2.1 Hipótese	53
3 OBJETIVOS	56
4 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS	58
4.1 Aspectos éticos e grupo de estudo	58
4.1.1 Critérios de inclusão	59
4.1.2 Critérios de exclusão para o grupo de estudo	59
4.2 Grupo Controle	60
4.3 Amplificação das amostras de líquido amniótico para a detecção de DNA de <i>T.gondii</i>	60
4.4 Padronização da Real Time PCR (qPCR).....	61

4.5 Multiplex- <i>Nested</i> -PCR para genotipagem de <i>T.gondii</i>	62
4.5.1 Escolha dos marcadores moleculares.....	62
4.5.2 Validação da Multiplex- <i>Nested</i> -PCR-RFLP	63
4.5.3 Reação de Multiplex (primeira amplificação).....	63
4.5.4 Reação de Nested-PCR (segunda amplificação)	65
4.5.5 Restrição Enzimática (RFLP).....	66
4.6 Sequenciamento automatizado dos produtos de amplificação	68
4.7 Fluxograma das etapas desenvolvidas	70
4.8 Análise estatística	70
5. RESULTADOS	73
5.1 PCR convencional para <i>T. gondii</i>	73
5.2 Padronização da qPCR para <i>T. gondii</i>	73
5.2.1 Seleção e concentração dos iniciadores (primers)	73
5.2.2 Protocolo da reação de qPCR.....	74
5.2.3 Número de ciclos	75
5.2.4 Especificidade da reação	76
5.2.5 Estabelecimento da curva padrão da qPCR.....	78
5.2.6 Critérios de positividade para as amostras de líquido amniótico	80
5.3 Desempenho dos sistemas que compõem o multiplex- <i>nested</i> -PCR	80
5.3.1 Genotipagem das amostras de líquido amniótico de acordo com os sistemas SAG3, 5' e 3' - SAG2 e GRA6.....	83
5.4 Associação entre os genótipos parasitários e a carga parasitária	86
5.5 Sequenciamentos	88
6. DISCUSSÃO	94
7. CONCLUSÃO	105
REFERÊNCIAS	107
APÊNDICE A.....	122
ANEXO A	125

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 - Considerações históricas

As primeiras descrições do protozoário *Toxoplasma gondii*, agente etiológico da toxoplasmose, foram realizadas em 1908, por Nicolle e Manceux no Instituto Pasteur de Tunis, em células mononucleares de fígado e baço de um roedor africano, o *Ctenodactylus gundi*. Inicialmente o parasito ficou conhecido como *Leishmania gondii*; sendo denominado posteriormente *Toxoplasma gondii* devido ao seu aspecto morfológico. Também no ano de 1908, na Faculdade de Medicina de São Paulo, Splendore descreveu o parasito em coelhos, *Oryctolagus cuniculus* (Dubey, 2012).

Em 1923, Janku, oftalmologista da cidade de Praga, descreveu o primeiro caso de toxoplasmose em humanos, relatando a presença de parasitos na retina de um lactente de 11 meses que evoluiu a óbito com alguns dos sintomas clássicos da toxoplasmose congênita, hidrocefalia e coriorretinite (Dubey, 2008).

No Brasil, na cidade do Rio de Janeiro, a toxoplasmose congênita foi relatada pela primeira vez em 1927 por Carlos Bastos Magarinos Torres, na autópsia de um recém-nascido do sexo feminino com dois dias de idade. Logo após o nascimento, a criança apresentou espasmos musculares generalizados e convulsões. As lesões predominantes eram meningo-encefalite, miocardite e miosite. Inúmeros protozoários foram encontrados em cortes histológicos do sistema nervoso central, coração, músculos esqueléticos e tecido subcutâneo. O pesquisador denominou o parasito, *Encephalitozoon chagasi*, porém, tanto as características morfológicas do parasito, quanto às histológicas das lesões eram indicativas de toxoplasmose (Dubey, 2012).

Wolf e Cowan, em 1937, identificaram casos de toxoplasmose em lactentes jovens por meio da inoculação em camundongos de fragmentos de placenta destes lactentes, e posterior isolamento do parasito, confirmando a presença do protozoário em placentas, e possível transmissão placentária da infecção (Dubey, 2008).

Em 1941, Sabin isolou a cepa mais virulenta do parasito, denominada RH, a partir de cistos presentes no cérebro de um recém-nascido com toxoplasmose congênita grave que apresentava lesões cerebrais (Sibley e Boothroyd, 1992; Ajioka et al., 2001; Ajzenberg et al., 2005)

O ciclo biológico completo do *Toxoplasma gondii* foi descrito em 1970, definindo os felídeos em geral, como hospedeiros definitivos, e os mamíferos, aves e roedores como hospedeiros intermediários (Dubey et al., 1970).

1.2 - Agente etiológico

O parasito *Toxoplasma gondii*, é o agente etiológico da toxoplasmose, zoonose de caráter cosmopolita, uma vez que um a dois terços da população humana apresenta anticorpos contra o mesmo (Weiss e Dubey, 2009).

O termo *Toxoplasma* deriva do grego e decorre de seu formato em arco (toxon = arco, plasma = forma), e a palavra *gondii* é uma referência ao roedor no qual foi inicialmente descrito, o *Ctenodactylus gundi* (Dubey, 2008).

O parasito pertence ao reino Protista, subreino Protozoa, filo Apicomplexa, classe Sporozoa, subclasse Coccidia, ordem Eucoccidia subordem Eimeriina, família Sarcocystidae, subfamília *Toxoplasmatinae*, gênero *Toxoplasma* e espécie *gondii* (Nicolle e Manceaux, 1909; Levine, 1977).

Toxoplasma gondii é caracterizado por uma extremidade pontiaguda apical e uma extremidade posterior arredondada, sendo delimitado por uma membrana complexa intimamente associada ao cito-esqueleto responsável pela integridade estrutural e motilidade do parasito. Ele possui núcleo, mitocôndrias, complexos de Golgi, retículo endoplasmático, além de roptrias, micronemas, grânulos densos e outros componentes do cito-esqueleto como o conóide, anéis polares, microtúbulos e o apicoplasto, organela composta por quatro membranas, semelhante aos plastídios encontrados em algas (Ajioka e Soldati, 2007; Robert-Gangneux e Darde, 2012).

Figura 1 - Estruturas e organelas de *T. gondii*. Adaptado de Ajioka et al. (2001).

Existem três formas biológicas de *Toxoplasma gondii*: taquizoítos ou trofozoítos, bradizoítos no interior dos cistos, e esporozoítos no interior de oocistos (Dubey, 1998; Peng et al., 2011) (Figura 2).

Figura 2: (A) Taquizoítos presentes em líquido peritoneal de camundongo, corados pela técnica de Giemsa http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/39/Toxoplasma_gondii_tachy.jpg (B) Cisto observado em tecido muscular contendo bradizoítos, coloração de Giemsa 1000x <http://www.ufrgs.br/para-site/siteantigo/Imagensatlas/Protozoa/Imagens/bradi3.jpg> (C) Oocisto esporulado contendo esporozoítos [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/5d/T._gondii_unsporulated_oocyst_differe ntial_interference_contrast_\(DIC\),_100%C3%97..jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/5d/T._gondii_unsporulated_oocyst_diffential_interference_contrast_(DIC),_100%C3%97..jpg)

Os taquizoítos são formas de replicação rápida (Figura 2A) presentes na infecção aguda, capazes de invadir praticamente todos os tipos de células dos vertebrados. Eles se multiplicam dentro de vacúolos parasitóforos. Possuem forma oval ou em crescente, medindo cerca de 4 μm de largura e 8 μm de comprimento (Dubey, 1991; Montoya e Liesenfeld, 2004; Robert-Gangneux e Darde, 2012).

Os bradizoítos (Figura 2B) são característicos de infecção crônica, constituindo formas de multiplicação lenta localizadas no interior de cistos de células musculares e do sistema nervoso central. Os cistos variam de 10 μm no caso dos mais jovens, contendo poucos bradizoítos, até 100 μm para os mais

antigos, contendo centenas a milhares de bradizoítos. A parede do cisto consiste de uma dupla membrana elástica e resistente, sendo a externa formada por substâncias do hospedeiro, isolando os bradizoítos da ação dos mecanismos imunológicos do mesmo. Sendo assim, os cistos permanecem no interior de células durante anos, ou até mesmo durante a vida do hospedeiro. Caso haja morte da célula hospedeira, ocorrerá rompimento da parede do cisto e consequente liberação de bradizoítos (Ferguson, 2004; Hill et al., 2005).

Os esporozoítos (Figura 2C) desenvolvem-se no interior dos oocistos, que são estruturas ovóides, com aproximadamente 13 μm . São as formas infectantes encontradas em fezes de felídeos domésticos e silvestres. No epitélio intestinal dos felídeos ocorre a reprodução sexuada com posterior eliminação de oocistos para o meio ambiente juntamente com as fezes, podendo ocorrer esporulação em até 21 dias. Após a esporulação há formação de dois esporocistos, cada qual contendo quatro esporozoítos (Dubey, 1998; Montoya e Liensefield, 2004; Mai et al., 2009).

1.3- Ciclo de vida

O ciclo vital do parasito é complexo, sendo os felídeos, incluindo o gato doméstico, os únicos hospedeiros definitivos conhecidos, enquanto aves, morcegos, animais herbívoros, carnívoros, animais aquáticos como as baleias, e o homem, os hospedeiros intermediários (Dubey, et al., 1970, Remington et al., 2001, Peng et al., 2011).

Nos hospedeiros definitivos ocorre reprodução sexuada ou entero-epitelial, e assexuada ou extra-intestinal, enquanto nos hospedeiros intermediários ocorre apenas a reprodução assexuada do parasito. Acredita-se que os gatos domésticos

constituam a maior fonte de contaminação para os seres humanos uma vez que a eliminação de oocistos ocorre com grande facilidade nesses animais. Após a ingestão de apenas um cisto contendo bradizoítos, os felídeos, sobretudo os jovens, são capazes de eliminar milhares de oocistos no meio ambiente. Apesar dos oocistos serem eliminados nas fezes dos felídeos por um período curto, em torno de uma a duas semanas, a transmissão é favorecida pela enorme quantidade eliminada, além da viabilidade dessas estruturas por longos períodos em condições de temperatura e umidade adequadas (Hill e Dubey, 2002; Montoya e Rosso, 2005; Jones e Dubey, 2010).

Nos hospedeiros intermediários, *T. gondii* é comumente adquirido pela ingestão de cistos teciduais contendo bradizoítos, ou de oocistos contendo esporozoítos. Outras formas menos frequentes de transmissão da infecção são as transfusões sanguíneas, transplantes de órgãos e acidentes de laboratório (Montoya e Rosso, 2005).

Após a ingestão, cistos teciduais liberam bradizoítos, ou oocistos liberam esporozoítos que invadem as células epiteliais e se diferenciam em taquizoítos, que se dividem rapidamente dentro de células e, juntamente com a resposta imune do hospedeiro dirigida contra os taquizoítos é responsável pelas manifestações clínicas da fase aguda da infecção. Os taquizoítos atravessam o epitélio intestinal, disseminam-se rapidamente nos tecidos transpondo as barreiras biológicas, como a placenta e a barreira hemato-encefálica causando as modalidades mais graves da infecção: a toxoplasmose congênita em fetos/recém-nascidos, e a toxoplasmose em pacientes imunodeficientes, com localização principalmente cerebral (Lopes et al., 2007, Weiss e Dubey, 2009).

Com o aparecimento da resposta imune do hospedeiro infectado, os taquizoítos se diferenciam em bradizoítos que ficam latentes, protegidos por uma parede cística rica em carboidratos, dentro do vacúolo parasitóforo. Essa

diferenciação pode ser revertida quando o indivíduo cronicamente infectado é submetido a diferentes condições de estresse, culminando com o retorno dos bradizoítos à forma taquizoítos, fenômeno denominado interconversão parasitária, que culmina com o reaparecimento de sintomas devido à reativação da infecção crônica. Os cistos teciduais podem persistir indefinidamente durante a vida do hospedeiro, provocando, esporadicamente, estimulação antigênica devido à ruptura de alguns cistos. Este fenômeno parece ocorrer em todos os indivíduos que já foram infectados por *T. gondii*, e teria como função, a estimulação esporádica da memória imunológica do hospedeiro. Entretanto, se o indivíduo for portador de alguma imunodeficiência primária ou secundária (HIV, transplantes, quimioterapia para tratamento de neoplasias), os cistos teciduais latentes podem se romper com maior frequência, provocando infecções locais ou disseminadas. Os cistos têm predileção por tecidos neurais, incluindo os oculares, tendo sido encontrados ainda em tecidos musculares, dentre outros (Weiss e Dubey, 2009; Peng et al., 2011).

Nos hospedeiros definitivos, quando os oocistos ou cistos são ingeridos, sua parede é desintegrada no estômago e intestino delgado por enzimas proteolíticas liberando os esporozoítos e bradizoítos, respectivamente (Montoya e Rosso, 2005) que por sua vez, penetram nas células epiteliais do intestino delgado e se multiplicam de forma bastante eficiente por meio de numerosos ciclos sexuais e assexuais (Dubey, 2008). Os parasitos se multiplicam sexualmente nas células do epitélio intestinal dando origem aos esquizontes durante processo de esquizogonia, que termina com a liberação de merozoítos após várias gerações, com diferenciação em macrogametas e microgametas que vão gerar o zigoto, o qual dará, posteriormente, origem a novos oocistos em processo denominado gametogonia, completando desta forma o ciclo sexuado (Hill et al., 2005; Robert-Gangneux e Darde, 2012) (Figura 3).

Figura 3 - Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*, contendo as diferentes etapas do ciclo biológico do parasito em suas três formas parasitárias, tanto no hospedeiro intermediário, quanto no definitivo (modificada de Robert-Gangneux e Darde, 2012)

1.4 – Transmissão

A transmissão do parasito na espécie humana pode ocorrer pela ingestão de água e alimentos contaminados por oocistos, ou de carne crua ou mal cozida contendo cistos, transfusão sanguínea ou em transplante de órgãos contaminados. A infecção também pode ser transmitida por via placentária, quando mulheres se infectam durante a gravidez (Figura 4). Os recém-nascidos podem também ser infectados pela amamentação caso a gestante se encontre na fase aguda da infecção (Hill et al., 2005; Kim e Weiss, 2008; Kaye, 2011).

Figura 4 - Vias de transmissão de *T. gondii*. (<http://2.bp.blogspot.com/>)

A toxoplasmose afeta por volta de dois bilhões de pessoas no mundo e costuma apresentar evolução benigna, assintomática, em 80 a 90% de indivíduos imunocompetentes (Tenter et al., 2000; Montoya e Liesenfeld, 2004). Em pacientes imunodeficientes tais como pacientes portadores de neoplasias, receptores de órgãos, portadores de imunodeficiências primárias ou secundárias, e ainda em gestantes que adquirem a primo-infecção na primeira metade da gestação com transmissão ao feto, a toxoplasmose pode ser grave e até mesmo fatal, lembrando que a gestação é considerada por alguns como um estado de imunotolerância, e por outros como um estado de imunossupressão, enquanto fetos apresentam imaturidade do sistema imunológico (Remington et al., 2001).

A partir de dados limitados extraídos de estudos sobre a triagem de crianças com anticorpos IgM anti-*T. gondii* ao nascimento, estima-se que 5 a 23 crianças nasçam infectadas por 10.000 nascidos vivos no Brasil. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) 2.649.396 crianças deverão nascer no Brasil em 2015. Considerando o nascimento de uma criança infectada por 1.000 nascimentos, 2.649 crianças com toxoplasmose congênita deverão nascer anualmente no Brasil, apresentando quadros clínicos variados, desde aquelas que deverão morrer logo após o nascimento, cerca de 35% apresentando comprometimento neurológico incluindo hidrocefalia, microcefalia e retardo mental, sendo que 80% destas crianças poderão apresentar alguma alteração ocular durante a vida e 40% perda auditiva (Dubey et al.,2012)

1.5- Formas de infecção

1.5.1- Infecção congênita

A toxoplasmose congênita ocorre com a transmissão do parasito ao feto via placentária, na quase totalidade dos casos quando a mulher adquire a infecção primária durante a gestação (Montoya e Remington, 2008). A frequência e a gravidade da doença dependem da idade gestacional na qual ocorreu a transmissão. Devido às características anatômicas da placenta, a chance de transmissão do parasito é menor no primeiro trimestre (cerca de 20%), porém as manifestações clínicas são significativamente mais graves, aumentando no segundo trimestre devido a maior permeabilidade da placenta (40%), resultando em infecções sintomáticas com manifestações menos graves, atingindo níveis máximos

de transmissão no terceiro trimestre (50-80%), com manifestações clínicas leves ou, na maior parte dos casos, infecções assintomáticas (Bonfioli e Orefice, 2005).

A tríade clássica, conhecida como Tríade de Sabin, caracteriza os casos mais graves de toxoplasmose congênita, e apresenta as seguintes manifestações: coriorretinite, hidrocefalia e calcificações cerebrais. Entretanto, existem outras manifestações clínicas e laboratoriais que podem ocorrer: crescimento intrauterino restrito, febre, icterícia, hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenomegalia, anemia, trombocitopenia, alterações líquóricas com aumento da celularidade e de proteínas, convulsões, surdez, déficit visual podendo chegar à cegueira, estrabismo, microftalmia, espasticidade, paralisias, macro ou microcefalia, déficit de desenvolvimento neuropsicomotor e retardo mental (Montoya e Liesenfeld, 2004; Diniz, 2006).

Os sintomas e a evolução da infecção dependem de muitos fatores, tais como a idade gestacional na qual a infecção foi transmitida, a patogenicidade da cepa infectante, fatores genéticos da gestante e do feto (Pradhan et al., 2007; Maubon et al., 2008, Okay et al., 2009).

A prevalência da toxoplasmose congênita varia significativamente de acordo com o país estudado. Na França já foi muito elevada, de 1-3 casos/1.000 nascidos vivos, enquanto nos EUA é de cerca de 1/10.000 (Remington et al., 2001). Estima-se que 500 a 5.000 crianças nasçam por ano com toxoplasmose congênita nos Estados Unidos (Montoya e Remington, 2008). No Brasil, os dados são escassos, e indicam frequência de 5 a 23 infecções congênicas por 10.000 nascimentos (Dubey et al., 2012).

Em estudo realizado na cidade de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, foi observado 1 caso/ 1.250 estudados (Mozzatto e Procianny, 2003). Em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, foram observados 5 casos/ 2.550 (Bahia-Oliveira et al., 2003). Em Ribeirão Preto, São Paulo, foram observados 7 casos/ 15.162

(Carvalho et al., 2005). Em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, foram observados 6 casos/ 10.000 em 2007, e 3 casos/ 2.476 em 2009 (Lago et al., 2007; Lago et al., 2009). No mesmo ano Varela et al. (2009), também realizaram estudo na cidade de Porto Alegre e observaram 37 casos/ 40.727. Em Belo Horizonte, Minas Gerais, Andrade et al., 2008, observaram 20 casos/ 31.808, enquanto Carellos et al. (2008), observaram 1 caso/ 420. Estudo realizado em 853 cidades do Estado de Minas Gerais, com 146.307 recém-nascidos de 1.560 centros públicos de saúde, confirmou 190 casos positivos de toxoplasmose congênita (Vasconcelos-Santos et al., 2009). Recentemente em Belém, Pará, foi observado 1 caso/ 1.000 nascidos vivos (Bichara et al., 2012)

O Brasil é um país de dimensões continentais, com diferentes níveis de atenção à saúde, características populacionais e hábitos distintos, além de diferenças sócio-econômicas consideráveis, o que pode explicar a grande variação dos resultados de prevalência da toxoplasmose em regiões distintas (Montoya e Liensfeldt, 2004).

1.5.2 - Infecção em indivíduos imunocompetentes

Na maioria dos casos a infecção primária por *T. gondii* é assintomática com evolução clínica favorável (Remington, 2004). A linfadenopatia é uma das manifestações mais comuns, presente em 10 a 20% de indivíduos infectados, podendo ser acompanhada de mialgia, astenia e febre. Em alguns casos, indivíduos imunocompetentes que se infectam com genótipos atípicos podem desenvolver infecções graves ou letais com manifestações de pneumonite, miocardite, encefalite, e infecção ocular. Em qualquer caso de toxoplasmose no período antenatal ou na infância a infecção é tratada, enquanto que em adultos

imunocompetentes, o tratamento é indicado apenas nos casos com manifestação de sistema nervoso central, incluindo formas oculares (Montoya e Liesenfield, 2004; Robert-Gangneux e Darde, 2012).

1.5.3 - Infecção em indivíduos imunodeficientes

Em pacientes imunodeficientes com alterações na imunidade celular tais como os portadores do HIV apresentando a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), portadores de neoplasias, transplantados, e pacientes submetidos à terapia imunossupressora, a toxoplasmose pode ser grave ou até mesmo fatal. O risco de reativação da infecção, que resulta da ruptura de cistos latentes provenientes de uma infecção pregressa e crônica, ocorre em 95% dos casos, sendo muito mais comum nesses indivíduos em relação a primo-infecção (Habegger de Sorrentino et al., 2005; Dubey et al., 2012).

Em pacientes infectados pelo HIV, a incidência da toxoplasmose está intimamente relacionada à contagem de células T CD4+, com risco crescente quando a contagem cai abaixo de 100 células/mm³. Neurotoxoplasmose (TE) é a manifestação mais frequente nesses pacientes, podendo conduzir a sintomas diversos que vão desde cefaléias, ataxia, convulsões, perda de memória, demência, hemiparesia, culminando com meningoencefalite que pode levar ao coma e óbito (Robert-Gangneux e Darde, 2012).

Em pacientes transplantados, a toxoplasmose grave ou disseminada pode ser resultado tanto da reativação de uma infecção latente do receptor, quanto de infecção pregressa do doador, com cistos de *T. gondii* presentes no órgão transplantado em receptor soronegativo. A reativação de uma infecção crônica pode ser desencadeada independentemente do órgão transplantado, pois o risco

está intimamente relacionado ao grau de imunossupressão do receptor. Depois do cérebro, os órgãos mais frequentemente acometidos são os pulmões, os olhos, o coração, o fígado, o pâncreas, a medula óssea, a bexiga, os nódulos linfáticos, o baço, os rins e a pele (Derouin e Pelloux, 2008; Martina et al., 2011).

1.5.4 – Infecção ocular

A infecção ocular pode fazer parte do quadro de infecção congênita, ou ocorrer em infecção adquirida após o nascimento, tanto em casos de infecção aguda, quanto de reativação da doença. No caso de infecção ocular adquirida congenitamente, lesões oculares podem ser diagnosticadas apenas na adolescência ou em idade adulta, mesmo após o tratamento na gestação e no primeiro ano de vida (Boothroyd e Grigg, 2002).

A manifestação ocular mais comum da toxoplasmose acomete a retina e a coróide sendo denominada retinocoroidite, ou coriorretinite granulomatosa necrotizante, que pode ser acompanhada de alterações características tais como o *headlight in the fog* com inflamação da retina vista através do humor vítreo opaco devido à infecção (Bonfioli e Orefice, 2005). O processo inflamatório agudo na infecção ocular dura cerca de seis semanas, tempo após o qual a lesão começará a regredir, com desaparecimento da pigmentação e formação de cicatriz na retina (Smith e Cunningham, 2002).

Quando a toxoplasmose ocular progride sem tratamento, pode acarretar efeitos devastadores muito tempo depois, como glaucoma, catarata, opacificação de vítreo, hemorragia, descolamento de retina, atrofia ótica, podendo levar a cegueira (Bonfioli e Orefice, 2005). Sendo assim, o acompanhamento desses

pacientes é de extrema importância para evitar sequelas oculares mais graves (Phan et al., 2008).

1.6 - Diagnóstico laboratorial

1.6.1 - Diagnóstico sorológico

O diagnóstico laboratorial da toxoplasmose é baseado na identificação de anticorpos especificamente dirigidos contra antígenos do parasito, principalmente de classes IgG e IgM. Desde que os primeiros testes sorológicos foram desenvolvidos, a P30, proteína mais abundante da superfície de taquizoítos, codificada pelo gene SAG1, têm sido a mais utilizada nos diversos kits comerciais existentes no mercado (Velge-Roussel et al., 1994; Remington et al., 2004).

Níveis elevados de anticorpos IgG confirmam que o indivíduo foi exposto ao parasito, mas muitas vezes não diferenciam entre uma exposição recente e uma exposição pregressa, tendo em vista a extrema sensibilidade dos kits comerciais utilizados atualmente (Jones et al., 2004). Uma vez infectado, o indivíduo apresentará títulos de IgG positivos por toda a vida, porém os títulos tenderão a se reduzir.

Para confirmar a ocorrência de uma infecção aguda, avalia-se a presença de anticorpos IgM, sendo possível e útil quantificar esses anticorpos.

Outro teste laboratorial que pode auxiliar o diagnóstico da infecção aguda é a determinação da avidéz de anticorpos IgG em ensaio imuno-enzimático após tratamento com substância caotrópica, com o objetivo de datar a infecção recentemente adquirida. Esta técnica é baseada na força de interação entre o antígeno e o anticorpo (Hedman et al., 1989; Joynson et al., 1990; Cozon et al.,

1998). Durante a resposta imune, o processo de maturação de anticorpos IgG é acompanhado pelo aumento de sua afinidade pelo antígeno. Anticorpos de baixa avidéz (30% ou menos) são produzidos em estágio precoce da infecção aguda, enquanto que anticorpos de alta avidéz (60% ou mais) refletem infecção adquirida há mais de três meses. Apesar de uma avidéz baixa nem sempre permitir a identificação de casos recentes de infecção, a avidéz alta de IgG exclui infecções primárias com menos de três meses de duração (Joynson et al., 1990; Lopez et al., 2000).

Os testes sorológicos de triagem são realizados com métodos automatizados, geralmente imuno-enzimáticos (ELISA), fluorimétricos ou luminescentes, seguido de confirmação por imunofluorescência ou testes de captura de anticorpos IgM (Wallon et al., 1999; Remington et al., 2004;). Entretanto, o teste sorológico de referência continua sendo a reação de Sabin-Feldman ou teste do corante ("*dye test*"), extremamente trabalhosa, requerendo a manutenção de taquizóitos vivos no laboratório, além de biólogos experientes para a leitura dos resultados (Remington et al., 2001; Kaye, 2011).

Para o diagnóstico da toxoplasmose congênita é realizada a triagem sorológica sistemática de gestantes, de preferência no período pré-concepcional, ou no mais tardar na primeira consulta pré-natal no início do primeiro trimestre para que se conheça o *status* sorológico da gestante, e que medidas preventivas possam ser adotadas (Diniz, 2006; Montoya e Remington, 2008).

1.6.2 - Diagnóstico molecular

Além das sorologias, outras técnicas laboratoriais devem ser associadas para aprimorar o diagnóstico laboratorial da toxoplasmose congênita, como a

técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em líquido amniótico ou, eventualmente, em sangue fetal, permitindo a confirmação da transmissão do parasito ao feto ainda no período antenatal, embasando o início do tratamento da gestante e sua continuidade até uma semana antes da data prevista para o parto (Diniz, 2006; Montoya e Remington, 2008).

Técnicas moleculares que empregam a PCR ou variantes da mesma têm sido consideradas referência (*gold standard*) para o diagnóstico da toxoplasmose congênita desde o final do século XX (Petersen, 2007).

A PCR já foi empregada para a detecção de DNA do parasito em pacientes imunodeficientes (AIDS) e em casos de infecção ocular. Entretanto, o uso mais comum da PCR no contexto da toxoplasmose é para o diagnóstico pré-natal da infecção congênita. A especificidade e o valor preditivo positivo da PCR em amostras de líquido amniótico aproximam-se de 100% na dependência do tipo de amplificação e gene amplificado. A sensibilidade analisada em um grande número de estudos variou de 70 a 95%. Sabe-se que a positividade da PCR em líquido amniótico depende do período gestacional no qual a infecção foi transmitida, com os melhores resultados obtidos durante o segundo trimestre, entre a 17^a e a 21^a semanas de gestação, quando comparados aos resultados de transmissões que ocorreram antes de 17^a semana, ou após a 21^a semana de gestação (Bastien, 2002; Saadatnia e Golkar, 2012).

Estudos realizados com o objetivo de comparar a sensibilidade de inúmeras sequências iniciadoras mostraram que o par B22-B23 do gene B1 do parasito apresentou a maior sensibilidade e especificidade quando comparado a outros iniciadores da sequência AF146527 de 529 pares de base, ou do rDNA, sendo os mais empregados no diagnóstico molecular (Brindley et al., 1993; Chabbert et al., 2004. Okay et al., 2009).

Nos últimos anos, a qPCR (*quantitative real time PCR*) foi introduzida para o diagnóstico molecular de diversas infecções (Espy et al., 2006; Bastien et al., 2008), e tem sido amplamente aplicada ao diagnóstico da toxoplasmose (Maubon et al., 2007).

A qPCR vem substituindo a PCR convencional no diagnóstico molecular da toxoplasmose devido a sua elevada sensibilidade e especificidade, além de rapidez, reproduzibilidade, menor risco de contaminação devido a “carry over”, e com a vantagem de fornecer a quantificação do número de parasitos ou do número de cópias de uma determinada sequência alvo em amostras biológicas (Espy et al., 2006; Bastien et al., 2008).

Estão descritos na literatura diversos pares de iniciadores utilizados para a qPCR na detecção de *T. gondii*, tendo como alvo, na maior parte dos estudos, o gene B1 ou a sequência AF146527 de 529 pares de base. Estes trabalhos utilizam as técnicas de qPCR com *SYBR Green* ou com sondas de hidrólise em sistemas *TaqMan* ou *Fluorecent Ressonance Energy Transfer* (FRET) (Costa et al., 2000; Reischl et al., 2003; Calderaro et al., 2006).

Em pacientes imunodeficientes, quer sejam gestantes ou fetos/recém-nascidos, a qPCR torna-se uma ferramenta valiosa, pois além de diagnosticar a presença de parasitos, permite a quantificação dos mesmos, tornando a técnica possivelmente útil ao monitoramento da terapia anti-*T.gondii* (Calderaro et al., 2006; Espy et al., 2006).

Hill et al. (2012), infectaram camundongos com cepas de *T. gondii*, tipo I (GT1), tipo II (PTG), tipo III (CTG) e após cinco dias da inoculação intraperitoneal com 500 taquizóitos, quantificaram a carga parasitária presente no baço dos camundongos. Os camundongos infectados com a cepa do tipo I apresentaram cargas parasitárias 1.000 vezes mais elevada em relação àqueles que receberam cepas do tipo II; e os que foram inoculados com o tipo II apresentaram cargas

parasitárias 20 vezes maiores que os animais que foram infectados com o tipo III. Neste estudo não houve associação entre a carga parasitária e o genótipo, tendo em vista que os animais com o genótipo II (teoricamente menos patogênico) apresentaram cargas parasitárias mais elevadas que àqueles com o genótipo III (patogenicidade intermediária).

Em estudo recente, Rico-Torres et al. (2012), determinaram o genótipo do parasito e a carga parasitária em quatro binômios mãe/recém-nascido com toxoplasmose perinatal no México. Dois casos mãe/filho eram causados por parasitos do tipo I, tendo sido a genotipagem realizada pela amplificação de ao menos um locus gênico, enquanto os outros dois casos foram causados por parasitos com genótipos diferentes, porém relacionados ao tipo I. Nesse estudo, concluiu-se que a carga parasitária não estava relacionada à transmissão vertical ou à gravidade da toxoplasmose nos fetos infectados congenitamente, muito embora um dos fetos tenha evoluído a óbito no segundo mês de vida. A carga parasitária nos quatro casos apresentou grande variação, de 5.3×10^3 a 2.7×10^6 parasitos/mL.

1.7- Tratamento

Sabe-se que os fármacos usados no tratamento da toxoplasmose possuem eficácia contra taquizoítos, sendo muito menos ativos contra as formas císticas (Montoya e Remington, 2008).

O tratamento recomendado para infecção por *Toxoplasma gondii* adquirida durante a gravidez é a espiramicina até 18ª semana de gestação e posteriormente, caso a infecção seja confirmada por PCR, ou existam alterações ultrassonográficas indicando maior gravidade da infecção fetal, a espiramicina pode ser substituída

pela associação de sulfadiazina e pirimetamina, com suplementações de ácido folínico, até uma semana antes da data prevista para o parto, pois os medicamentos podem aumentar o risco de sangramento (Montoya e Remington, 2008; Hotop et al., 2012).

Após o nascimento, recém-nascidos assintomáticos cujas mães tiveram diagnóstico confirmado na gravidez e receberam tratamento, são tratados com sulfadiazina, pirimetamina e ácido folínico por período mínimo de três meses. Recém-nascidos com sintomas discretos, como dilatações ventriculares menores ou calcificações intracranianas pequenas, desenvolvimento neurológico normal, e cicatrizes na retina sem focos inflamatórios ativos, são tratados com doses mais elevadas de sulfadiazina por período mínimo de seis meses. Em recém-nascidos com sintomas mais graves, como convulsões, desenvolvimento neurológico anormal e retinocoroidite são tratados por 12 meses. Em todos os casos está indicado acompanhamento sorológico no mínimo trimestral, inclusive nas crianças após a suspensão do tratamento para evitar casos de rebotes sorológicos (serological rebounds), caracterizados pelo aparecimento de anticorpos IgM na criança alguns meses após a suspensão da terapia (Hotop et al., 2012).

1.8 - Classificação das cepas de *T. gondii*

As cepas de *T. gondii* foram classificadas em três tipos, de acordo com a patogenicidade da cepa inoculada em camundongos brancos da linhagem “Swiss” (Dubey e Frenkel, 1976; Dubey et al., 1998; Literák et al., 1998; Remington et al., 2001; Grigg et al., 2001a; Sibley, 2003; Robert-Gagneux e Darde, 2012).

As cepas do tipo I são altamente patogênicas, provocando a morte dos camundongos em menos de 10 dias após a inoculação de 10 taquizoítos, com

elevado nível de parasitemia, acarretando a morte dos camundongos com formação de ascite contendo taquizoítos. O protótipo mais conhecido é a cepa RH, que foi isolada por Albert Sabin em 1941 a partir de cistos abundantes presentes no cérebro de um recém-nascido com toxoplasmose congênita grave que apresentava lesões cerebrais. Por ser inicialmente cistogênica, essa cepa foi considerada pouco patogênica. Entretanto, após inúmeras passagens em culturas de células, os parasitos perderam a capacidade de formar cistos e tornaram-se “virulentos”, passando a causar a morte de camundongos com presença de taquizoítos em abundância na cavidade peritoneal. A partir de então ficou conhecida como uma cepa altamente patogênica (Sibley e Boothroyd, 1992; Grigg et al., 2001b; Ajioka et al., 2001; Ajzenberg et al., 2005).

Cepas mais “virulentas”, tais como a RH foram classificadas como tipo I e apresentam diversas características que podem explicar a rápida disseminação dos parasitos em camundongos e outros hospedeiros suscetíveis: maior migração através de epitélios polarizados ou para a matriz extracelular, maiores taxas de penetração *ex vivo* da lâmina própria e submucosa, crescimento mais acelerado em cultura de células, e taxas reduzidas de interconversão de taquizoítos para bradizoítos (Saeij et al., 2005; Robert- Gangneux e Darde, 2012).

As cepas do tipo II são cistogênicas, ou seja, de menor patogenicidade, e mesmo após a inoculação de 10^3 taquizoítos, induzem infecção crônica em camundongos, com formação de cistos de *T. gondii* no cérebro dos animais, não interferindo com o tempo de vida normal dos mesmos que, no entanto, tornam-se soropositivos para *T. gondii*. O protótipo mais conhecido é a cepa ME49 (Dubey et al., 1998; Remington et al., 2001; Grigg et al., 2001a; Sibley, 2003; Darde, 2008).

As cepas do tipo III apresentam patogenicidade intermediária, e após a inoculação de 10^3 taquizoítos e várias passagens *in vivo* ou *in vitro*, reduzem o tempo de vida de camundongos brancos, que se tornam soropositivos para o *T.*

gondii. Em alguns casos, é possível encontrar ascite discreta contendo alguns taquizoítos e poucos cistos no cérebro dos animais (Dubey et al., 1998; Remington et al., 2001; Grigg et al., 2001a; Sibley, 2003; Darde, 2008). O protótipo mais conhecido é a cepa VEG.

1.8.1 – Características moleculares de *Toxoplasma gondii* e genótipos parasitários

Análises filogenéticas de cepas e isolados de *T. gondii* demonstraram que a espécie é composta por três ramos principais que representam as três linhagens clonais, tipos I, II e III que se são compatíveis com a forma de classificação antiga realizada em camundongos. Muito embora a maioria das cepas e isolados possa ser classificada em uma dessas três linhagens, estudos sobre mutações genéticas utilizando inúmeros marcadores revelaram que as cepas e isolados de *T. gondii* de maior patogenicidade, são todos provenientes de um único clone, enquanto àqueles de menor patogenicidade são mais polimórficos (Sibley e Boothroyd, 1992; Howe, 1995; Grigg et al., 2001b; Ajioka et al., 2001).

O genoma nuclear do parasito é composto por aproximadamente 87 Mb (megabase), e foi inicialmente determinado que seria composto por 11 cromossomos (Sibley e Boothroyd, 1992), com pouca variação entre as cepas. Khan et al. (2005) realizaram recombinações de cepas dos tipos II e III, além de cepas dos tipos I e III, elaborando um novo mapa genômico de *T. gondii*, utilizando 250 marcadores genéticos, e dividindo o genoma parasitário em 14 cromossomos designados por algarismos romanos (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VIIa, VIIb, VIII, IX, X, XI e XII) (Figura 5). Além do DNA genômico, o parasito possui DNA circular extra-cromossômico de 35 Kb, localizado no interior do apicoplasto (plastídeo), além de

genoma mitocondrial de 6 Kb. A capacidade limitada de codificação de proteínas do DNA extra-cromossômico sugere que as proteínas responsáveis pelas funções dessa organela sejam codificadas por genes nucleares (Ajioka et al., 2001; Montoya e Liensenfeld, 2004).

Figura 5 - Mapa genético dos 14 cromossomos de *Toxoplasma gondii* com a localização de diferentes genes e loci utilizados em estudos de genotipagem e de ligação (Khan et al., 2005).

1.9 – Métodos de tipagem de *T. gondii*

Uma variedade de métodos moleculares tais como *Multi-Locus Enzyme Electrophoresis* (MLEE), microssatélite, *Random Amplified Polymorphic DNA*

(RAPD), sequenciamento de introns, PCR seguida de Análise de Restrição de Fragmentos Polimórficos (RFLP) encontram-se disponíveis na atualidade para estudar a diversidade genotípica de *T. gondii* (Khan et al., 2007; Su et al., 2010; Vaudaux et al., 2010).

Para a identificação de genótipos parasitários, o método mais utilizado é a amplificação de DNA do parasito por PCR realizada em duas etapas (nested-PCR), seguida da RFLP, técnica baseada na digestão enzimática de DNA com enzimas de restrição que vão promover a clivagem de DNA em regiões específicas, gerando fragmentos de pesos moleculares diferentes e conhecidos, permitindo a caracterização e diferenciação de isolados e cepas (Howe et al., 1997; Khan et al., 2005; Grigg et al., 2001b; Vaudaux et al., 2010).

Inúmeros marcadores moleculares têm sido utilizados para realizar a diferenciação de cepas de *T. gondii* por meio da amplificação de fragmentos de genes do parasito. Os alvos mais comumente utilizados são:

- gene SAG1, localizado no cromossomo VIII, que codifica a proteína de superfície mais importante do *T. gondii*, a P30, expressa somente em taquizoítos (Weiss, 1995; Bulow e Boothroyd, 1991):

- gene SAG2, localizado no cromossomo VIII, que codifica a proteína de superfície P22, expressa tanto em taquizoítos quanto em bradizoítos (Howe et al., 1997);

- gene SAG3, localizado no cromossomo XII, que codifica proteínas expressas somente em taquizoítos, sendo a principal delas a P43 (Gross et al., 1996; Khan, 2005);

- GRA6, localizado no cromossomo X, que codifica proteínas de grânulo denso que parecem ser importantes para a estrutura da membrana do vacúolo parasitóforo e pelo recrutamento de nutrientes, sendo importante para o

desenvolvimento do parasita durante todos os estágios do seu ciclo de vida (Craver e Knoll, 2007).

Outros marcadores que também são utilizados para a tipagem de *T. gondii* pela técnica de PCR-RFLP são: β TUB localizado no cromossomo XI; C22-8 localizado no cromossomo Ib; C29-2 localizado no cromossomo III; L358 localizado no cromossomo V, PK1 localizado no cromossomo VI e APICO localizado no DNA extra-cromossômico (plastídeo). (Dubey et al., 2009; Yai et al., 2009; Dubey et al., 2010; Frazão-Teixeira et al., 2011).

Toxoplasma gondii utiliza uma família de proteínas de superfície que atua na invasão da célula do hospedeiro. SAG1, SAG2 e SAG3 são antigênicas e possuem papel importante nos mecanismos imunes de combate à infecção (Jung et al., 2004). Outras estruturas localizadas no interior de organelas específicas, as roptrias ROP1 e ROP2 (Martin et al., 1998), e os grânulos densos GRA1, GRA2, GRA4, GRA6 e GRA7 (Aubert et al., 2000), também têm sido consideradas, assim como os antígenos de superfície, alvos interessantes para o desenvolvimento de testes diagnósticos, genotipagem e vacinas.

Na América do Norte, Ásia e África, a maior parte dos isolados de *T. gondii* provenientes de animais domésticos foi classificada como tipo I ou III, com predominância do tipo I em pacientes com AIDS e toxoplasmose cerebral e naqueles com toxoplasmose ocular, e tipo II em infecções congênitas (Howe e Sibley, 1995; Ajzenberg et al., 2002; Boothroyd e Grigg, 2002; Lehmann et al., 2004; Peyron et al., 2006; Gallego et al., 2006; Ferreira et al., 2008).

Em estudo realizado no Estado de São Paulo com 125 isolados de *T. gondii* de galinhas, cães e gatos, foram encontrados 48 genótipos, sendo 26 provenientes de um único isolado, e os outros 22 genótipos provenientes de outros três isolados. Todos os genótipos foram agrupados em quatro linhagens consideradas típicas do

Brasil, e denominadas BrI, BrII, BrIII, BrIV. De acordo com a taxa de mortalidade em camundongos infectados, o tipo BrI foi classificado como o mais virulento, o tipo BrII como o menos virulento e os tipos BrIII e BrIV como de virulência intermediária (Pena et al., 2008).

Na ilha de Fernando de Noronha, Pernambuco, Brasil, foram analisados isolados de *T. gondii* de galinhas caipiras, Dubey et al. (2010) encontraram seis genótipos distintos incluindo o tipo II, tipo III, além de quatro novos genótipos, previamente não descritos no Brasil.

Mais recentemente, Pena et al. (2012), caracterizaram geneticamente isolados de *T. gondii* de galinhas caipiras do estado do Espírito Santo, região Sudeste do Brasil, utilizando PCR-RFLP de 12 marcadores: SAG1, SAG2, alt. SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico e CS3. Onze genótipos foram identificados, sendo que todos eles diferem dos tipos clonais I, II e III.

Em outro estudo recente, Bezerra et al. (2012), realizaram a genotipagem de isolados obtidos de cérebro e língua de suínos destinados ao consumo humano no nordeste do Brasil. A técnica utilizada foi PCR-RFLP analisando sete marcadores: SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, C22-8, PK1 e Apico, seguida de sequenciamento. Seis genótipos foram identificados, todos eles diferindo dos tipos clonais I, II e III, tendo sido denominados de atípicos ou recombinates. Os autores concluíram que o multilocus PCR-RFLP subestima a diversidade da população de *T. gondii* em relação ao sequenciamento, e que novos marcadores moleculares são necessários para agrupar e caracterizar isolados atípicos de *T. gondii* na América do Sul.

Em relação à genotipagem de *T. gondii* em humanos, Peyron et al. (2006), realizaram a sorotipagem de amostras de gestantes europeias e encontraram predomínio do sorotipo II, enquanto na Colômbia só foram encontrados sorotipos I e

III. Este estudo detectou anticorpos dirigidos contra polipeptídeos de antígenos das três linhagens clonais, derivados de GRA5 e GRA6.

Ferreira et al. (2008), investigaram as características genéticas de 87 pacientes com toxoplasmose cerebral e AIDS, tratados em São Paulo, Brasil. Quatro marcadores (5'-SAG2, 3'-SAG2, SAG3 e GRA6) foram escolhidos para analisar as amostras. Os resultados obtidos neste estudo foram que as amostras de 40 pacientes (46%) continham cepas do tipo I; quatro amostras eram do tipo III (4%); 13 (15%) eram polimórficas (genótipos raros); seis indivíduos possuíam parasitos do tipo I ou II; e 15 pacientes (17%) apresentavam parasitos não classificáveis por qualquer um dos quatro marcadores testados. A PCR-RFLP, classificou, inicialmente, nove amostras de pacientes (11%) como tipo II, o que é incomum na América do Sul. No entanto, após o sequenciamento, elas foram reclassificadas como recombinantes.

Ajzenberg et al. (2009) analisaram amostras de 88 pacientes imunodeficientes utilizando seis marcadores microssatélites e concluíram que as amostras do tipo II foram predominantes entre os pacientes que apresentaram primo-infecção na Europa, o tipo III foi o segundo genótipo mais comum, enquanto o tipo I foi raro nesta população.

Fekkar et al. (2011) realizaram estudo na França, caracterizando geneticamente isolados de *T. gondii* de 20 pacientes com toxoplasmose ocular utilizando marcadores microssatélites. As cepas do tipo II foram as mais frequentes.

Em estudo realizado na cidade de São Paulo, Brasil, foram analisadas 62 amostras de sangue, líquido ou líquido amniótico de pacientes com toxoplasmose aguda. Dentre os 62 pacientes, havia 25 com AIDS e toxoplasmose cerebral, 17 gestantes com primo-infecção, 12 com toxoplasmose ocular, seis recém-nascidos com toxoplasmose congênita e dois adultos com toxoplasmose aguda. As amostras foram testadas por PCR-RFLP utilizando 11 marcadores genéticos SAG1, SAG2

(5'-SAG2 e 3'-SAG2), SAG3, GRA6, BTUB, c22-8, c29-2, L358, PK1, novo SAG2 e Apico, porém apenas 20 puderam ser amplificadas (32,25%) em oito ou mais loci gênicos. Dessas 20 amostras, 18 pertenciam ao genótipo ToxoDB #65, e as outras duas aos genótipos ToxoDB #6 e #71 (<http://toxodb.org/toxo/>). Os pacientes portadores dos genótipos #6 e #71 apresentaram toxoplasmose cerebral grave com encefalite difusa e lesões cerebrais extensas (Ferreira et al., 2011). Dentre as 20 amostras genotipadas, havia dois casos de toxoplasmose congênita: uma amostra de recém-nascido sem caracterização clínica, e o caso de uma gestante assintomática. Essas duas amostras continham parasitos de genótipo DB#65. Os autores concluíram que o genótipo ToxoDB #65 parece ser bastante comum em infecções humanas da cidade de São Paulo, Brasil.

Kieffer et al., (2011) relataram um caso muito grave de toxoplasmose congênita adquirida no terceiro trimestre, na França, com quadro clínico mimetizando choque séptico. O recém-nascido apresentou, inicialmente, pneumonia grave, púrpura, hepatite e após 5 dias de tratamento e carga viral avaliada em soro e secreção traqueal indicando queda significativa da carga parasitária, evoluiu a óbito devido à hipoxemia refratária. Surpreendentemente, a genotipagem revelou parasitos de genótipo II.

Há oito casos na literatura relatando a gravidade da toxoplasmose congênita causada por parasitos com genótipos atípicos (Ajzenberg et al., 2010; Cneude et al., 2003; Demar et al., 2007;. Elbez-Rubinstein et al., 2009;. Delhaes et al., 2010). Os resultados sugerem que em seis dos oito casos, parasitos com genótipos atípicos foram mais patogênicos que os genótipos ancestrais, levando à interrupção da gravidez ou morte fetal dentro de poucos dias após o nascimento. Em três dos oito casos, a infecção materna ocorreu no início do terceiro trimestre de gravidez e, mesmo assim, resultou em doença fetal letal, exatamente como no caso relatado por Kieffer et al., (2011).

Com o tempo, a genotipagem de *T. gondii* passou a analisar um número cada vez maior de marcadores, por vezes gerando resultados inconclusivos. Tendo em vista que o sequenciamento de DNA é o método de referência para análises nucleotídicas, este, passou a ser realizado para confirmar os resultados de RFLP, gerando informações suplementares sobre as sequências, incluindo a presença de mutações genéticas. Sendo assim, a análise de mutações, foi incorporada à genotipagem de *T. gondii*. Para compreender melhor essas análises, é preciso relembrar alguns conceitos de genética. A genotipagem de *T. gondii* amplifica fragmentos de genes, e estes, ocupam posições em determinados cromossomos chamadas de *locus* (plural *loci*). Quando um gene não sofre variação, existindo apenas um tipo de sequência gênica que o representa, ele é dito não polimórfico. Ao contrário, quando existem variantes de um determinado gene, estas variantes são denominadas alelos, e o gene é considerado polimórfico. O alelo predominante na população é chamado de selvagem, e as variantes, os alelos polimórficos. Quando as mutações ocorrem com uma frequência de pelo menos 1% em uma população são denominados polimorfismos. As mutações são homozigotas, quando existe alteração dos dois alelos, isto é, nas duas fitas de DNA; ou heterozigota, com troca de nucleotídeo em apenas um dos alelos. Além disso, as mutações podem ocorrer sem que o códon resultante gere um aminoácido diferente (sinônima), ou, ao contrário, provocando troca do aminoácido (não sinônima) (Jamieson et al., 2009; Baker et al., 2012; Boots et al., 2012; Wang et al., 2012).

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

Tanto o genótipo parasitário, quanto a carga parasitária já foram relacionados à variação de patogenicidade em casos de toxoplasmose humana de diversos continentes. Na América do Sul, existe, aparentemente, maior contingente de parasitos com genótipos não clonais, chamados de atípicos ou recombinantes, associados a infecções de maior gravidade. Tendo em vista a existência de poucos trabalhos brasileiros sobre genotipagem em casos de toxoplasmose congênita, e o fato de nenhum desses estudos ter realizado a quantificação da carga parasitária de forma simultânea, nas mesmas gestações, julgamos oportuno realizar o presente estudo.

2.1 – Hipótese

É possível padronizar técnica de detecção de DNA de *T. gondii* por meio de amplificação em tempo real (*Real Time PCR* ou qPCR) com SYBR Green, tão sensível quanto as amplificações convencionais, inclusive do tipo *nested*, de forma mais rápida uma vez que a etapa de detecção do material amplificado é eliminada, com a vantagem de minimizar os riscos de contaminação (*carry-over*).

Além disso, a outra hipótese de trabalho seria que as gestantes com maior carga parasitária fossem aquelas com os parasitos mais "virulentos", no caso, pertencentes ao genótipo I parasitário. Caso fôssemos capazes de identificar as gestantes com carga parasitária mais elevada e associar este dado com a presença de genótipos parasitários mais patogênicos, esta abordagem poderia contribuir, por

exemplo, para a prescrição de esquemas terapêuticos diferenciados nessas gestantes.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

- a) Padronizar técnica de Real Time PCR (qPCR) com iniciadores do gene B1 para a determinação da carga parasitária em líquidos amnióticos de gestações com infecção comprovada por *T. gondii*.
- b) Realizar genotipagem das mesmas amostras de líquido amniótico por meio de multiplex-*nested*-PCR-RFLP seguida de sequenciamento automatizado para detalhar a análise das sequências, e analisar a frequência de mutações.
- c) Verificar a existência de associação entre a magnitude da carga parasitária e o genótipo do parasito nessas mesmas gestações.

CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

4. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Aspectos éticos e grupo de estudo

Esta pesquisa recebeu a aprovação da Comissão para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do HC/FMUSP, tendo recebido o protocolo de número 0347/11, seção de apêndices.

Os obstetras (especialistas em Medicina Fetal) foram os responsáveis pela obtenção do consentimento livre e esclarecido das gestantes para a realização da amniocentese guiada por ultrassom, e posterior encaminhamento para os diferentes laboratórios que deveriam realizar: cariótipo, FISH, testes bioquímicos e testes moleculares, tanto em laboratórios de rotina, quanto em nosso laboratório de pesquisa.

Os experimentos foram realizados utilizando-se 80 amostras de DNA extraídas de líquidos amnióticos (LA) pertencentes a um biorrepositório sob a responsabilidade da Profa. Thelma Okay. Ele é composto por remanescentes de amostras de líquido amniótico provenientes de gestações com suspeita de toxoplasmose congênita, enviadas ao longo da última década, por vários centros de Medicina Fetal do Estado de São Paulo, para a realização de amplificações com finalidade diagnóstica.

Todas as amostras de líquido amniótico foram testadas por três PCR convencionais realizados com iniciadores de genes distintos do parasito, e tiveram resultado positivo em pelo menos uma das três amplificações (Okay et al., 2009).

Trata-se de uma casuística de conveniência baseada em número de amostras existentes em nosso banco de líquidos amnióticos, e ainda com volume e

concentração de DNA suficientes para a realização dos testes moleculares previstos na pesquisa.

4.1.1 - Critérios de inclusão

Os líquidos amnióticos incluídos no estudo foram todos oriundos de gestações com soroconversão comprovada para toxoplasmose, detectadas por meio de teste de triagem automatizada para a detecção de anticorpos anti-*T. gondii* de classes IgG e IgM (enzima imunoensaio - EIA, fluorimetria ou quimiluminescência). Os testes foram confirmados por imunofluorescência indireta para IgG e IgM (em alguns casos por testes de captura de IgM). As gestantes foram submetidas a exames clínico, obstétrico e ultrassonográfico a critério do obstetra, e concordaram com o envio de alíquota de líquido amniótico ao nosso laboratório.

.

4.1.2 - Critérios de exclusão para o grupo de estudo

Foram excluídos do estudo os líquidos amnióticos de fetos apresentando cariótipo alterado, anormalidades detectadas por FISH (Fluorescent in Situ Hybridization), malformações, diagnóstico confirmado de outras infecções congênitas, ou alterações sorológicas e/ou bioquímicas que pudessem explicar os sinais e sintomas da gestante/feto, direcionando o diagnóstico para outra doença. Também foram excluídos os líquidos amnióticos contendo mecônio ou sangue (que poderia ser materno).

4.2- Grupo controle

Foi composto por 31 amostras de LA de gestantes que realizaram amniocentese em diferentes Centros de Medicina Fetal do Estado de São Paulo devido à idade materna avançada (colheita para realização do cariótipo fetal), ou amostras de LA de gestantes cujos fetos foram diagnosticados com doenças genéticas, ou ainda fetos malformados, porém com baixo risco infeccioso. Estas gestantes possuíam sorologia para toxoplasmose com resultados indicando que não haveria risco de transmissão do parasito ao feto (IgG e IgM negativos, ou IgG positivo em títulos baixos, com IgM negativo). O número de casos controle também foi arbitrário, e determinado como sendo o mínimo necessário para que fosse possível a aplicação de testes estatísticos.

4.3 - Amplificação das amostras de líquido amniótico para a detecção de DNA de *T. gondii*

Tendo em vista que foram utilizadas amostras de DNA que já haviam sido testadas pela PCR universal (β - actina), e também pelas PCR convencionais para o diagnóstico de infecção por *T. gondii*, realizados com três genes do parasito, este diagnóstico foi novamente confirmado uma vez que as amostras encontravam-se armazenadas em congelador -86°C por período prolongado. Sendo assim, foi realizada nova PCR com os iniciadores JW63/64 de *T. gondii*, de acordo com protocolo previamente descrito (Okay et al, 2009), antes da qPCR.

4.4 - Padronização da *Real Time* PCR (qPCR)

As reações foram realizadas em equipamento ABI 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems®) do Laboratório de Virologia do IMT. O mix de reação continha QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix, enzima Hot Start Taq Plus DNA, Quantifast SYBR Green PCR Buffer, dNTP mix, SYBR Green (QIAGEN), iniciadores B22 e B23 ou JW62 e JW63 (Tabela 1), água RNase-free (QIAGEN) e 100 ng de DNA genômico extraído dos líquidos amnióticos. Para cada lote de amostras testadas foi construída uma curva padrão dos controles positivos nas seguintes concentrações (10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 taquizoítos/mL) e dois controles negativos. Em um dos controles negativos adicionou-se DNA proveniente de um indivíduo sem toxoplasmose e em outro, água ultrapura que substituiu o DNA. As amostras e os controles positivos e negativos foram testados em duplicata.

O sistema ABI 7300 verifica o sinal fluorescente a cada segundo e calcula automaticamente o mean baseline, ou seja, o “sinal de fundo” da fluorescência gerado durante os ciclos iniciais (3 -15) da qPCR. Com base nessa fluorescência de fundo pode-se detectar a fluorescência gerada pelo acúmulo de DNA amplificado. O Ct (threshold cycle) é definido como o ciclo em que a fluorescência excede estatisticamente o mean baseline, sendo proporcional ao número de moléculas de DNA alvo presentes na amostra e representando a mesma quantidade de produtos amplificados presentes no tubo.

Tabela 1 – Descrição dos iniciadores, temperaturas e ciclagem para padronização da qPCR

Gene	Inicadores	Hibridização (annealing)	ciclos	amplificado	referência
DNA-PCR-B1	B22 - sense	50 - 62°C	40 -45	115 bp	Hohlfeld et al., 1994
	5'-AACGGGCGAGTAGCACCTGAGGAGA-3'				
	B23 - anti-sense	50 - 62°C	40 -45	286 bp	Hohlfeld et al., 1994
	5'-TGGGTCTACGTCGATGGCATGACAACT-3'				
	JW 63 - sense	50 - 62°C	40 -45	286 bp	Pelloux et al. 1997
	5'-GCACCTTTCGGACCTCAACAACCG-3'				
	JW 62 - anti-sense				
	5'- TTCTCGCCTCATTCTGGGTCTAC-3'				

4.5 - Multiplex-nested-PCR para genotipagem de *T. gondii*

4.5.1- Escolha dos marcadores moleculares

Apesar de contarmos com 11 pares de iniciadores para realizar a genotipagem de *T. gondii* (Su et al., 2006; Su et al., 2010), enfrentamos o problema de escassez de DNA das amostras de líquido amniótico, uma vez que o laboratório recebe apenas uma fração do total de líquido colhido, e elas já terem sido submetidas à pelo menos quatro amplificações (β -actina e três PCR convencionais com finalidade diagnóstica). Sendo assim, fomos obrigados a selecionar alguns dos marcadores dentre os 11 possíveis com base na experiência anterior do grupo, e nos trabalhos de Howe et al., 1997; Khan et al., 2005b e Ferreira et al. 2008, nos quais foram determinados àqueles com maiores chances de amplificação, considerando que nenhum deles é tão eficaz quanto o gene B1 que conta com 35 cópias por parasito, enquanto os genes envolvidos na genotipagem são genes de cópia única.

Os marcadores selecionados para a genotipagem, genes e localização nos cromossomos do parasito estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Marcadores moleculares utilizados na genotipagem de *T. gondii* com seus respectivos genes e localização

Marcador	Gene	Localização	Referências
5'+3' SAG 2	5'+3' SAG 2	cromossomo VIII	Howe et al., 1997; Khan et al., 2005a.
SAG 3	SAG 3	cromossomo XII	Grigg et al., 2001b; Khan et al., 2005a
GRA6	GRA6	cromossomo X	Khan et al., 2005a, Khan et al., 2005b

4.5.2- Validação da multiplex-nested-PCR-RFLP

Para a validação das reações foram utilizadas as cepas de *T. gondii* RH, Me49 e VEG. Esta amplificação também é chamada de multilocus ou multiloci, e foi seguida da análise do polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) dos genes SAG2 (extremidade 5' e 3'), SAG3 e GRA6 conforme descrito por Su et al., 2006.

4.5.3- Reação de multiplex (primeira amplificação)

Na reação de multiplex foram utilizados 0,25 µM de cada um dos quatro pares de iniciadores (Tabela 4), além de 2x QIAGEN multiplex PCR *master mix*, Q-*solution*, 10x primer mix e H₂O RNase-free (QIAGEN) para completar volume de 35 µL. Foram aplicados 100 ng de DNA das amostras de líquido amniótico e 30 ng de

DNA dos protótipos dos genótipos I, II e III de *T. gondii*, utilizados como controles positivos da reação, resultando em volume final de 50 µl (Tabela 3).

As amplificações foram realizadas em termociclador (Biometra), nas seguintes condições: uma etapa de desnaturação inicial de 95°C por 15 minutos, seguida de 40 ciclos de 95°C por 30 segundos (desnaturação), 57°C por 90 segundos (hibridização), e 72°C por 90 segundos (extensão), terminando com uma etapa de extensão final de 10 minutos a 72°C. Posteriormente, cinco microlitros dos amplificados das amostras ou um microlitro dos amplificados dos controles positivos foram transferidos para a 2ª etapa de amplificação (nested-PCR).

Os produtos amplificados foram aplicados em gel de agarose a 2% (Invitrogen) preparados em tampão TAE (Tris-acetato-EDTA 1M) e submetidos à eletroforese horizontal (HE-58, GE Healthcare), a 80 Volts por 30 minutos, sendo posteriormente corados com brometo de etídeo a 0,5 µg/ml (plusone, GE Healthcare). Os resultados foram visualizados em equipamento de foto documentação com luz ultravioleta (Benchtop e UV Transilluminator UVP) e fotografados.

Tabela 3 - Descrição dos iniciadores externos, peso molecular dos amplificados e referências.

Gene alvo	Iniciadores externos (multiplex)	Peso molecular do amplificado	Referência
5'-SAG2 (VIII)	SAG2.F4 (GCTACCTCGAACAGGAACAC) SAG2.R4 (GCATCAACAGTCTTCGTTGC)	340pb/540pb*	Howe et al., 1997
3'-SAG2 (VIII)	SAG2.F3 (TCTGTTCTCCGAAGTGAAGTCC) SAG.R3 (TCAAAGCGTGCATTATCGC)	340pb/540pb*	Howe et al., 1997
GRA6 (XI)	GRA6 F1x (ATTTGTGTTTCCGAGCAGGT) GRA6 R1 (GCACCTTCGCTTGTGGTT)	340pb/540pb*	Khan et al. 2005a
SAG3 (XII)	P43S1 (CAACTCTCACCATTCCACCC) P43AS1 (GCGCGTTGTTAGACAAGACA)	340pb/540pb*	Grigg et al. 2001b
* Somente na cepa do tipo I pb - pares de base			

4.5.4- Reação de *nested*-PCR (segunda amplificação)

Nesta segunda etapa, cada uma das quatro amplificações (5'-SAG2, 3'-SAG2, SAG3 e GRA6) foi realizada separadamente com solução de reagentes composta por: tampão 1x (GE Healthcare), 200µM de dNTP (GE Healthcare), 0,2 µM de primers (IDT, USA), 2,5U da enzima Taq DNA Polimerase (GE Healthcare), 5 µL do produto do primeiro multiplex PCR e água estéril para completar volume final de 50 µL (Tabela 4).

As reações foram realizadas em termociclador (Biometra), nas seguintes condições: uma etapa de desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos foi seguida de 40 ciclos de 95°C por 30 segundos (desnaturação), 55°C por 90 segundos (hibridização), e 72°C por 60 segundos (extensão), terminando com uma etapa de extensão final de 5 minutos a 72°C.

Os produtos amplificados foram aplicados em gel de agarose a 2% (Invitrogen) preparados em tampão TAE (Tris-acetato-EDTA 1M) e submetidos à eletroforese horizontal (HE-58, GE Healthcare), a 80 Volts por 30 minutos, sendo posteriormente corados com brometo de etídeo a 0,5 µg/ml (plusone, GE Healthcare). Os resultados foram visualizados em equipamento de foto documentação com luz ultravioleta (Benchtop e UV Transilluminator UVP) e fotografados.

Tabela 4 - Descrição dos iniciadores internos, peso molecular dos amplificados e referências.

Gene alvo	Iniciadores internos (nested-PCR)	Peso molecular do amplificado	Referência
5'-SAG2 (VIII)	SAG2.F (GAAATGTTTCAGGTTGCTGC) SAG2.R2 (GCAAGAGCGAACTTGAACAC)	241pb	Howe et al., 1997
3'-SAG2 (VIII)	SAG2.F2 (ATTCTCATGCCTCCGCTTC) SAG2.R (AACGTTTCACGAAGGCACAC)	221pb	Howe et al., 1997
GRA6 (XI)	GRA6 F1 (TTTCCGAGCAGGTGACCT) GRA6 R1x (TCGCCGAAGAGTTGACATAG)	344pb	Khan et al. 2005a
SAG3 (XII)	P43AS2 (TCTTGTCGGGTGTTCACTCA) P43S2 (CACAAGGAGACCGAGAAGGA)	311pb	Grigg et al. 2001b

pb - pares de base

4.5.5- Restrição Enzimática (RFLP)

Para realizar a genotipagem foram utilizadas quatro enzimas de restrição diferentes, escolhidas de acordo com a sequência nucleotídica dos fragmentos amplificados:

- HhaI 05U/uL (Biolabs) para o sistema 3'SAG 2 que cliva a sequência de DNA correspondendo a GCG↓C /C↑GCG somente no tipo II, gerando 2 fragmentos de 53bp e 169bp.
- SAU3AI 05 U/uL (Biolabs) para o sistema 5'SAG 2 que cliva a sequência de DNA correspondendo a ↓GATC /CTAG↑ somente do tipo III, gerando 2 fragmentos de 56bp e 186bp.
- MseI 05 U/uL (Biolabs) para o sistema GRA6 que cliva a sequência de DNA correspondendo a T↓TAA /AAT↑T no tipo II, gerando 2 fragmentos de 161bp e 190bp e no tipo III, gerando 3 fragmentos de 93 bp, 97bp e 161bp.
- NciI 05 U/uL (Biolabs) para o sistema SAG 3 que cliva a sequência de DNA correspondendo a CC↓SGG /GG↑CC no tipo I, gerando 3 fragmentos de 62bp, 64bp e 99bp e no tipo III, gerando 2 fragmentos de 64bp e 161bp.

Para a realização da RFLP foi preparada reação com volume de 10 µL contendo a enzima e seu tampão, aos quais foram adicionados 10 µL do amplificado para serem clivados em temperatura constante de 37° durante 3 horas. Todo o volume do produto de digestão foi aplicado em gel de agarose/nusieve a 2:1 (Invitrogen) preparado em tampão TAE (Tris-acetato-EDTA 1M) e submetido à eletroforese (80 volts por 30 minutos). O gel foi corado com brometo de etídio a 0,5 µg/ml (GE), as bandas visualizadas em luz ultravioleta no equipamento de foto-documentação (Vilber, France) e fotografadas.

4.6 - Sequenciamento automatizado dos produtos de amplificação

Os sequenciamentos foram realizados em todas as amostras genotipadas com sucesso, além dos protótipos RH, Me49 e VEG. para a confirmação dos genótipos parasitários determinados por multiplex-nested-PCR-RFLP, e para analisar a frequência de mutações nesses mesmos produtos de amplificação, tendo em vista que se trata do método de referência para análises nucleotídicas.

Os produtos de PCR foram purificados com o kit comercial “Wizard SV Gel and PCR Clean-up System” (PROMEGA). A cada produto de PCR foi adicionado o mesmo volume do tampão “Membrane Binding Solution” e a solução foi transferida para uma coluna de afinidade acoplada a um microtubo. Após a incubação por 1 minuto em temperatura ambiente, a coluna foi centrifugada a 16.000 x *g* por 1 minuto e o sobrenadante foi descartado. A seguir, a coluna foi lavada com 700µl da solução “Membrane Wash Solution” por centrifugação a 16.000 x *g* por 1 minuto. Posteriormente, lavada com 500 µl da solução “Membrane Wash Solution” por centrifugação a 16.000 x *g* por 5 minutos. A coluna foi deixada em banho seco a 60°C por 10 minutos, para a evaporação total do “Membrane Wash Solution”. O DNA foi eluído transferindo-se a coluna para um microtubo limpo, e adicionando-se 50 µl de água ultrapura diretamente no centro da coluna, incubando a amostra por 1 minuto em temperatura ambiente e centrifugando-a a 16.000 x *g* por 1 minuto. Este procedimento foi realizado para promover a retirada de resíduos de sais e produtos não incorporados durante a reação de PCR. A qualidade do produto foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 2%. A estimativa da concentração de DNA do produto de PCR foi feita com auxílio do reagente *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen - USA). As intensidades das bandas de DNA purificadas foram

comparadas visualmente com os padrões e a concentração de DNA das amostras em nanogramas foi determinada de acordo com a tabela fornecida pelo fabricante.

A reação de sequenciamento foi realizada em serviço contratado (Centro do Genoma Humano, IB, USP), com o kit *BigDye® Terminator Cycle Sequencing* (Applied Biosystems). Resumidamente, em 10 µl de reação contendo Mix BigDye 1:16; 1,5X 5X *Sequencing Buffer*, foram adicionados 5 µM de cada iniciador. A reação foi realizada em termociclador nas seguintes condições: 25 ciclos de 95°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos, 60°C por 2 minutos. Para a retirada de produtos não incorporados durante a reação de sequenciamento foi realizada a precipitação do DNA utilizando o reagente *BigDye® X Terminator™ Purification kit* (Applied Biosystems) seguindo as instruções descritas pelo fabricante.

Os eletroferogramas obtidos após sequenciamento foram editados manualmente utilizando o software *BioEDIT Sequence Alignment Editor*. As sequências foram alinhadas e analisadas no programa *Codon Code Aligner*. Após edição, as sequências, juntamente com as amostras positivas sequenciadas, foram submetidas à análise comparativa no site *Clustal W* <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> para verificar o grau de homologia entre elas.

4.7 - Fluxograma das etapas desenvolvidas

4.8 – Análise estatística

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a distribuição das variáveis numéricas (se apresentavam distribuição normal ou não). Caso a distribuição não fosse normal, seriam utilizados testes não paramétricos para a comparação de dados entre grupos (teste de Mann-Whitney).

Para realizar a comparação de resultados entre grupos com genótipos distintos foi adotado o teste de MacNemar que é capaz de determinar se existiu concordância ou discordância dos resultados.

Com o intuito de avaliar se a carga parasitária das amostras foi influenciada pelo genótipo do parasito, foi calculado o coeficiente de variação (CV) da variável ordinal, ou seja, da carga parasitária.

Todas as análises estatísticas consideraram intervalo de confiança de 95% e valor de $p \leq 0,05$, exceto o teste de normalidade, e foram realizadas com o auxílio do programa SigmaStat 1.0.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 - PCR convencional para *T. gondii*

Foram incluídas no estudo 80 amostras de líquido amniótico positivas por PCR convencional com finalidade diagnóstica. Todas as amostras foram positivas pela nova PCR do gene B1 realizada antes da qPCR. Somente as amostras positivas pela qPCR foram posteriormente analisadas pela multiplex-nested-PCR-RFLP para a determinação do genótipo parasitário, uma vez que necessitávamos dos dois parâmetros para cumprir os objetivos do estudo.

5.2- Padronização da qPCR para *T. gondii*

5.2.1- Seleção e concentração dos iniciadores (*primers*)

A seleção e concentração dos iniciadores foi o primeiro parâmetro a ser definido. Foi feito estudo com várias concentrações de iniciadores, variando de 0,05 μ M, 0,1 μ M, 0,2 μ M, até 0,4 μ M. A concentração que apresentou melhor desempenho foi a de 0,2 μ M, corroborando as instruções do fabricante do kit *QuantiFast SYBR Green PCR* (QIAGEN).

A porcentagem CG dos iniciadores, bem como a temperatura de hibridização (temperature of melting ou T_m) dos mesmos e o peso molecular dos amplificadores também foram avaliados.

- Porcentagem GC:

A porcentagem de guanina e timina para os iniciadores B22 (*sense*) foi de 60,0% e para o B23 (*anti-sense*) foi de 51,8%.

- Temperatura de hibridização:

Apesar da temperatura de hibridização teórica para os iniciadores B22 e B23 serem de 43,35°C e 44,72°C, respectivamente, a qPCR foi realizada com gradiente de temperatura entre 50-62°C para definir a melhor condição de amplificação. A temperatura de 62°C foi a que apresentou melhor especificidade, sem, no entanto, causar perda de sensibilidade.

- Peso molecular do amplificado

Os iniciadores escolhidos (B22 e B23) amplificam fragmento de 115 bp, peso molecular mais baixo em relação ao outro par de primers que amplifica fragmento de 286 bp.

5.2.2- Protocolo da reação de qPCR

Após o estudo das concentrações de iniciadores, volumes de reagentes e variações de temperaturas, foi padronizado o mix da reação de qPCR conforme descrito na tabela 5. Para a reação com volume total de 25,0 µL houve incubação inicial a 50°C por 2 minutos, 95°C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 62°C por 50 segundos, finalizando com a curva de dissociação (melting curve).

Tabela 5 - Protocolo padronizado da qPCR.

Reagentes	Mix/tubo (µL)	[] Final
Master Mix	12,5	
H ₂ O	6,5	
Iniciador B22 (10µM)	0,5	0,2µM
Iniciador B23 (10µM)	0,5	0,2µM
DNA	5,0	aprox.100ng
Volume Final:	25,0	

5.2.3 - Número de ciclos

Devido ao fato das pacientes já estarem recebendo tratamento para a toxoplasmose no momento da amniocentese, por períodos que variaram de uma a quatro semanas, é plausível esperar que a carga parasitária tenha sofrido redução. Sendo assim, com o intuito de tentar obter ganho de sensibilidade considerando a existência de amostras de líquido amniótico contendo poucos parasitos, foi realizado um estudo variando a quantidade de ciclos de 40 até 45 (Figuras 6). O objetivo desse estudo foi verificar se alguma amostra emitia fluorescência após o Ct 40, muito embora a maior parte dos trabalhos de qPCR utilize no máximo 40 ciclos. Após o teste, o número de 40 ciclos foi definido, pois nenhuma amostra apresentou reatividade após o mesmo.

Figura 6 - Teste qPCR realizado com 45 ciclos. O Ct das amostras positivas variou de 28 a 35.

Utilizando os iniciadores B22/B23, paralelamente aos iniciadores JW62/JW63 nas reações de qPCR (Okay et al., 2009), com amostras fortemente e fracamente positivas e amostras negativas para toxoplasmose, foram realizados testes de especificidade e de sensibilidade das duas reações.

5.2.4 – Especificidade da reação

Para testar a especificidade dos iniciadores, foram utilizadas amostras de DNA positivas de outros microrganismos que podem causar infecção congênita tais como Citomegalovírus (CMV), Parvovírus (PV), Varicella Zoster (VZV), ou amostras de cDNA provenientes de RNA vírus tais como o da Rubéola (Rb) e enterovírus, que se encontravam disponíveis no Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia (Figura 7). Tanto as amostras com teste positivo para outras infecções, quanto as provenientes do grupo controle (gestantes com idade avançada ou provenientes do pré-natal normal) utilizadas na qPCR como controles

negativos, foram previamente testadas por PCR convencional para *T. gondii* e tiveram resultados negativos. Na qPCR todas essas amostras apresentaram curva de dissociação diferente da curva padrão, possibilitando interpretá-las como verdadeiros negativos (Figura 8).

Figura 7 - Diagrama mostrando amostras contendo *T. gondii* que foram amplificadas na qPCR.

Figura 8 - Curva de dissociação de amostras positivas (temperatura de *melting* entre 82,7 e 83,7°C) e de amostras negativas (temperatura de *melting* inferior ao intervalo estipulado).

5.2.5- Estabelecimento da curva padrão da qPCR

Com o intuito de construir a curva padrão da reação de qPCR foram realizadas diluições seriadas de taquizoítos da cepa RH (ascites de camundongos), gentilmente cedidos pelo Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (Figura 9).

Um exemplo de curva padrão do estudo foi apresentado na Figura 10. Esta curva padrão apresentou *slope* de -3,53; *intercept* de 38,736 e eficiência de 91,99 %. Seguindo o que foi preconizado por Bustin et al. (2006), foram validadas apenas as reações com inclinação da curva (*slope*) entre -3,5 a 3,9. O limite de detecção (LOD) adotado para os experimentos foi de 10 parasitos/mL, isto é, após a realização de testes de reprodutibilidade, foi possível detectar 10 parasitos em 100% das vezes (10 em 10 experimentos). A qPCR foi capaz de detectar 1 parasito/mL, porém não em 100% dos testes, por esse motivo adotamos a LOD de 10.

Figura 9 – Curva padrão com o teste de diluições de taquizoítos: 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10.

Figura 10 – Diagrama mostrando a inclinação da curva (slope) de - 3,53.

Na curva de dissociação de cada reação observou-se uma variação de T_m (temperatura de hibridização) de 1 grau, ou seja, variando entre 82,7°C a 83,7°C (Figura 11). Para assegurar que todas as amostras apresentando T_m neste intervalo se tratavam de verdadeiros positivos, foram realizadas eletroforeses em géis de agarose a 2% nas quais o fragmento de 115 pb foi visualizado.

Figura 11 – Diagrama representativo da variação de 1 grau (82,7°C a 83,7°C) tolerada para a temperatura de hibridização (*mealing*) das amostras positivas.

5.2.6 - Critérios de positividade para as amostras de líquido amniótico

Foram consideradas positivas, amostras de DNA com Ct (*threshold cycle*) abaixo de 40, Tm entre 82,7°C a 83,7°C e carga parasitária ≥ 10 parasitos/mL nas duas avaliações (duplicata). Sendo assim, as 80 amostras de DNA dos líquidos amnióticos de gestantes com toxoplasmose apresentaram todos os critérios de positividade e as 31 amostras de DNA de líquidos amnióticos de gestantes sem toxoplasmose foram consideradas negativas, pois apresentaram temperatura de melting (Tm) geralmente $< 82,7^{\circ}\text{C}$, ou eventualmente $> 83,7^{\circ}\text{C}$, porém com discordância entre os dois resultados da duplicata.

Tendo em vista que o valor máximo de nossa curva padrão era 10^4 parasitos, e que houve duas amostras com valores acima deste patamar, o próprio software do equipamento ABI 7300 *Real-Time* PCR System (Applied Biosystems®) é capaz de executar um processo de extrapolação e estimar um valor para a carga parasitária baseando-se na curva padrão, porém, o mais correto seria repetir o teste fazendo diluições da amostra de DNA.

Todas as 76 amostras analisadas simultaneamente pela técnica de genotipagem foram positivas pela qPCR, e todas as 31 amostras do grupo controle foram negativas.

5.3 - Desempenho dos sistemas que compõem o multiplex-nested-PCR

Das 80 amostras de líquido amniótico positivas pela qPCR, 76 foram genotipadas com sucesso pela multiplex-nested-PCR-RFLP, gerando produtos de amplificação ao menos em um dos quatro marcadores SAG3, 5'SAG2, 3'SAG2 e

GRA6. Na análise dos resultados, os marcadores 5' e 3' do gene SAG2 foram utilizados em conjunto, tendo em vista que não são capazes de discriminar o genótipo parasitário isoladamente. Sendo assim, foram usados quatro marcadores e analisados três sistemas, a saber, SAG3, SAG2 e GRA6.

O marcador SAG3, amplifica uma região do gene SAG3 (Grigg et al., 2001b), e os produtos do 2ºPCR foram digeridos com a enzima de restrição *NciI* e analisados por eletroforese em gel de agarose/nusieve 2:1. Os fragmentos digeridos diferenciam os genótipos I, II e III. As amostras 215 e 221 apresentaram o mesmo padrão de restrição da cepa VEG (protótipo do genótipo III), isto é, o produto de amplificação de 225 bp foi digerido em dois fragmentos, um de 161 bp e outro de 64 bp. (Figura 12).

Figura 12 - Perfil de restrição enzimática de produto do gene SAG3 digerido com a enzima *NciI* que diferencia os genótipos I, II e III de *T.gondii*.

O marcador 5'- SAG2, amplifica uma sequência próxima à extremidade 5' do gene SAG2. Por outro lado o marcador 3'- SAG2 amplifica uma sequência próxima à extremidade 3' do mesmo gene (Howe et al., 1997). Os produtos do 2ºPCR foram digeridos com as enzimas de restrição *Sau3AI* e *HhaI*, respectivamente, e analisados em gel de agarose/nusieve 2:1. Os fragmentos obtidos na digestão do marcador 5'- SAG2 diferenciaram o genótipo III dos

genótipos I e II, conforme figura 13, na qual a amostra 188 não sofreu digestão, permanecendo o fragmento de 242bp enquanto o controle positivo VEG (protótipo do genótipo III) resultou em 2 fragmentos de 186 e 56bp. Na mesma figura, os fragmentos obtidos na digestão do marcador 3'- SAG2 diferenciaram o genótipo II dos genótipos I e III, uma vez que a amostra 188 e o controle positivo VEG não sofreram digestão. Sendo assim, a análise dos resultados dessas duas digestões em conjunto define o genótipo do parasito, neste caso genótipo I. O marcador GRA6, amplifica uma porção do gene GRA6 (Khan et al., 2005b). Os produtos do 2ºPCR foram digeridos com a enzima de restrição *MseI* e analisados em gel de agarose/nusieve 2:1 (Figura 13). Os fragmentos digeridos diferenciaram os genótipos I, II e III. No teste da amostra 188 e da cepa VEG (protótipo do genótipo III) o produto total de amplificação de 351 bp foi digerido em três fragmentos de 161, 97 e 93 bp, tanto na amostra 188, quanto na cepa VEG, resultando no genótipo III.

Figura 13 - Metade superior: perfil de restrição enzimática de produto do gene SAG2 (3'-SAG2 e 5'- SAG2) digerido com as enzimas *HhaI* e *Sau3aI*, respectivamente. Metade inferior: produto do gene GRA6 digerido com a enzima *MseI* que diferencia os genótipos I, II e III de *T.gondii*.

Os três sistemas de amplificação que compõem a multiplex-*nested*-PCR apresentaram desempenhos diferentes. O sistema no qual foi possível analisar o maior número de amostras foi o que amplifica a região do gene SAG3 (72,4%), seguido do sistema 5' e 3' SAG2 (69,7%) e finalmente do GRA6 (26,3%) (Tabela 6). A comparação dos desempenhos dos três sistemas mostrou que existe discordância entre os resultados, com diferença estatisticamente significativa (teste de McNemar, $p < 0,001$), apontando a superioridade da amplificação dos marcadores SAG3 e SAG2 (5' e 3') em relação ao GRA6.

Tabela 6 - Frequência de detecção dos três sistemas testados no multiplex-*nested*-PCR para genotipagem de *T. gondii* em 76 amostras de líquido amniótico.

Multiplex <i>Nested</i> PCR				
Localização	SAG 3	5' e 3' SAG2	GRA6	TOTAL
	n (%)	n (%)	n (%)	
Amostras amplificadas	55 (72,4)	53 (69,7)	20 (26,3)	76

McNemar - $p < 0,001$

5.3.1 - Genotipagem das amostras de líquido amniótico de acordo com o os sistemas SAG3, 5' e 3'-SAG2 e GRA6

Das 76 amostras genotipadas por RFLP após o multiplex-*nested*-PCR, 55 amostras foram genotipadas com sucesso pelo marcador SAG3, sendo 54 amostras do tipo III e apenas uma amostra do tipo II. Considerando as 53 amostras genotipadas pelos marcadores 5' e 3'- SAG2, verificamos que todas as 53 amostras pertenciam ao genótipo I. Em relação ao marcador GRA6, as 20 amostras genotipadas eram do tipo III (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Distribuição das 76 amostras de líquido amniótico de acordo com a genotipagem pelo multiplex-*nested*-PCR (SAG3, SAG2 e GRA6).

Das 76 amostras de líquido amniótico, 18 amostras (23,7%) foram genotipadas com sucesso por todos os quatro marcadores; 19 amostras (25,0%) amplificaram três marcadores; 27 amostras (35,5%) amplificaram dois marcadores e 12 amostras (15,8%) apenas um marcador (Tabela 7).

Tabela 7 - Genótipos de *T. gondii* das 76 amostras de líquido amniótico analisadas no presente estudo.

Amostras (LA)	Marcadores			
	SAG3	5' SAG2	3' SAG2	GRA6
11	III	I	I	III
12	III	nd	nd	nd
93	III	I	I	III
102	nd	I	I	nd
104	III	I	I	nd
105	III	I	I	III
110	nd	I	I	nd
118	III	nd	nd	nd
135	III	I	I	III
138	III	I/II	nd	nd
144	nd	I	I	nd
151	III	I	I	nd
152	III	nd	nd	nd

153	nd	I	I	nd
159	III	I	I	III
161	III	I	I	III
162	nd	I	I	nd
163	III	I	I	nd
164	III	I/II	nd	nd
165	III	I/II	nd	nd
167	III	I	I	nd
168	III	I	I	nd
170	III	I	I	nd
171	nd	I	I	nd
172	nd	I	I	nd
173	III	I	I	III
174	III	I	I	III
175	III	I	I	III
176	III	I/II	nd	nd
177	III	I	I	nd
179	III	I	I	III
180	III	I	I	nd
181	III	I	I	nd
182	III	I	I	III
183	III	I	I	III
184	III	I	I	III
186	III	I	I	III
188	nd	I	I	III
192	III	I	I	III
194	III	I	I	III
198	III	nd	nd	nd
200	III	I/II	nd	nd
201	nd	I	I	nd
202	nd	nd	I/III	nd
203	III	I/II	nd	nd
204	nd	I/II	nd	nd
205	III	nd	nd	nd
206	III	I	I	nd
207	III	nd	nd	nd
208	III	nd	I/III	nd
209	nd	I	I	nd
210	nd	I	I	nd
211	III	I	I	nd
212	III	I	I	nd
213	II	nd	nd	nd
214	III	I/II	nd	nd
215	III	I	I	III
216	III	I	I	nd
217	III	I	nd	nd
218	nd	I/II	I	nd
219	nd	I	I	nd
220	nd	nd	I	nd
221	III	I/II	I	nd

222	nd	I	I	nd
223	III	nd	nd	nd
224	III	I	I	nd
225	III	I	nd	nd
226	III	nd	I	nd
227	III	I	I	III
228	III	nd	nd	nd
229	III	I	I	nd
230	III	nd	I/III	nd
231	nd	I	I	nd
232	nd	I	I	nd
233	nd	I	I	nd
234	nd	I/II	nd	nd

nd = não determinado

5.4 - Associação entre os genótipos parasitários e a carga parasitária

Para todos os marcadores os valores mínimo e máximo das cargas parasitárias foram os mesmos, tendo em vista que as duas amostras que apresentaram estes valores foram genotipadas pelos quatro marcadores como apresentado na tabela no item 5.3.1.

Os genótipos parasitários determinados após RFLP do marcador SAG3 e a carga parasitária avaliada por qPCR, não apresentaram associação, visto que a quase totalidade das amostras (54/55) revelaram genótipo III do parasito, de patogenicidade intermediária, com carga parasitária variando de 222 parasitos/mL a 808.328,0 parasitos/mL, mediana de 1715 parasitos/mL, que não é diferente do valor da única amostra tipo II (958 parasitos/mL).

Os resultados da genotipagem do marcador SAG2 (3' e 5') e a carga parasitária determinada por qPCR também não apresentaram associação, pois todas as 53 amostras foram genotipadas como tipo I, ou seja, o genótipo mais virulento, porém as cargas parasitárias também variaram de 222 parasitos/mL a 808.328,0 parasitos/mL, com mediana de 1606 parasitos/mL.

Por fim, os resultados da genotipagem do marcador GRA6 e a carga parasitária determinada por qPCR, também não apresentaram associação, pois todas as 20 amostras foram genotipadas como tipo III, ou seja, o genótipo de patogenicidade intermediária, porém as cargas parasitárias também variaram de 222 parasitos/mL a 808.328,0 parasitos/mL, com mediana de 950 parasitos/mL.

Gráfico 2 – Agrupamento das amostras de líquido amniótico de acordo com o marcador (SAG3, 5' e 3' –SAG2 e GRA6) e a carga parasitária (log).

Com o intuito de avaliar se a carga parasitária das amostras foi influenciada pelo genótipo do parasito, foi calculado o coeficiente de variação (CV) da variável ordinal, ou seja, da carga parasitária. O CV foi de 602,80%, e sabe-se que valores acima de 20% indicam independência da variável, portanto a hipótese inicial de que o genótipo parasitário poderia influenciar a carga parasitária foi rejeitada.

5.5 – Sequenciamentos

Foram sequenciados 386 produtos de amplificação, ou seja, 55 amostras dos produtos gerados pelo multiplex-nested-PCR, nos dois sentidos, isto é, *sense* e *anti-sense* para o marcador SAG3; 53 amostras para o marcador 3'-SAG2; 53 amostras para o marcador 5'-SAG3, 20 amostras para o marcador GRA6, além das três cepas protótipo.

Considerando apenas os nucleotídeos presentes no sítio de restrição das quatro enzimas usadas no RFLP, os sequenciamentos confirmaram os genótipos determinados por RFLP em todos os 386 produtos de amplificação (100%) das amostras e protótipos.

Além disso, os sequenciamentos permitiram que realizássemos a comparação das sequências dos produtos de amplificação dos líquidos amnióticos com os três arquétipos ancestrais (linhagens clonais), e ainda a análise de outras alterações, tais como a presença de mutações ao longo de todo o fragmento amplificado.

A análise dos 110 eletroferogramas gerados pelas 55 amostras analisadas pelo marcador SAG3 revelou a existência de 14 mutações (14/55 ou 25,45%), sendo 8 mutações heterozigotas e sinônimas (Figura 14) e 6 mutações homozigotas e sinônimas. Do total de 55 amostras de líquido amniótico, 11 apresentaram mutações (20,0%): 8 apresentaram mutações heterozigotas e sinônimas (14,55%), e 3 amostras apresentaram mutações homozigotas e sinônimas (5,45%). Duas amostras apresentaram mais de uma mutação ao longo da sequência SAG3 (3,64%): a amostra 198 apresentou 1 mutação homozigota e sinônima e 1 mutação heterozigota e sinônima, com carga parasitária de 1.662 parasitos/mL. A outra amostra com mais de 1 mutação, de número 213, apresentou

4 mutações homozigotas e sinônimas, com carga parasitária de 958 parasitos/mL. Curiosamente, esta amostra contendo o maior número de mutações foi exatamente à única com genótipo II.

Figura 14 - Sequenciamento do produto de amplificação do gene SAG3 da amostra 194 comparada ao protótipo do genótipo III (VEG). Na posição nucleotídica indicada pela seta existe, na amostra 194, uma mutação heterozigota e sinônima Y (C ou T), enquanto nos três protótipos, representados pela cepa VEG, o nucleotídeo nesta posição é o T (alelo selvagem).

No sistema 3' e 5'- SAG2 foram analisados 106 eletroferogramas de 53 amostras. Foram identificadas 16 mutações (16/53 ou 30,19%), além de uma amostra com um *STOP* códon precoce seguido da inserção de elementos repetitivos que não puderam ser caracterizados, porém apenas no sequenciamento do fragmento 5'-SAG2. Esta amostra (número 162) terá que ser sequenciada novamente. Das 16 mutações observadas, 13 eram heterozigotas e sinônimas e 3 eram mutações homozigotas e sinônimas (Figura 15). Foram detectadas 14 amostras contendo mutações (26,41%): 11 amostras com mutações heterozigotas e sinônimas (20,75%) e 3 amostras com mutações homozigotas e sinônimas (5,66%). No sistema 3' e 5'-SAG2 somente 1 amostra (número 172), apresentou

mais de uma mutação ao longo do produto de amplificação (1,88%). Esta amostra continha 3 mutações heterozigotas e sinônimas, e apresentava carga parasitária de 4.904 parasitos/mL.

Figura 15 - Sequenciamento de produtos de amplificação do gene 5'-SAG2 das amostras 110 e 180. Na posição nucleotídica indicada pela seta existe uma mutação homozigota/sinônima com troca do alelo T, selvagem, representado em vermelho (amostra 180), pelo alelo C, mutado, em azul, presente na amostra 110.

No sistema GRA6, foram analisados 40 eletroferogramas de 20 amostras. Foram encontradas 7 mutações (7/20 ou 35,0%): 5 mutações heterozigotas e sinônimas, 2 mutações homozigotas e sinônimas. Neste grupo, 5 amostras apresentaram mutações (25,0%): 4 amostras apresentaram mutações heterozigotas e sinônimas (20,0%) e 1 amostra apresentou mutações homozigotas e sinônimas (5%). Além disso, 2 amostras apresentaram mais de um mutação ao longo do produto de amplificação (10%), a de número 179, com duas mutações heterozigotas e sinônimas e carga parasitária de 642 parasitos/mL; e a amostra 227, que apresentou duas mutações homozigotas e sinônimas e carga parasitária de 808.328 parasitos/mL.

Resumidamente, considerando os três sistemas analisados, isto é, SAG3, 5' e 3'- SAG2 e GRA6, foram observadas 24 amostras do total de 76 contendo mutações (24/76 ou 31,58%), pois foram encontradas mutações em marcadores diferentes de 6 amostras, além de 5 amostras apresentando mais de uma mutação (5/76 ou 6,58%). O número total de mutações observadas foi de 37 em 76 amostras (37/76 ou 48,68%), sendo 26 mutações heterozigotas/sinônimas e 11 homozigotas/sinônimas (tabela 6). Ademais, considerando todos os marcadores, as mutações foram encontradas em diferentes posições nucleotídicas ao longo dos fragmentos gênicos amplificados, não evidenciando a existência de regiões *hot spot* (Tabela 8).

Tabela 8 – Frequência de mutações heterozigotas e sinônimas, e outras alterações.

Localização	Sequenciamento		
	SAG3 n (%)	5' e 3'-SAG2 n (%)	GRA6 n (%)
Mutações heterozigotas e sinônimas	8/55 (14,5)	11/53 (20,75)	4/20 (20)
Mutações homozigotas e sinônimas	3/55 (5,45)	3/53 (5,66)	1/20 (5)
códon STOP precoce + elementos repetitivos	-	1/53 (1,89)	-

Quando foi realizada a comparação das medianas de carga parasitária do grupo formado pelas 24 amostras com mutações, em relação as 52 amostras sem mutações nos quatro marcadores investigados, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre estas medianas (Mann-Whitney, $p= 0.0849$) (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Comparação das medianas de carga parasitária do grupo formado pelas amostras com mutações em relação ao grupo sem mutações (Mann-Whitney, $p = 0.085$).

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A toxoplasmose é uma doença infecciosa que acomete grande parte da população mundial, geralmente sem produzir sintomas e com evolução benigna. No entanto, quando adquirida durante a gestação assume grande importância pelo fato de poder causar malformações congênitas graves, além de abortos espontâneos e natimortos (Remington et al., 2001, Dubey, 2012).

A gravidade da toxoplasmose tem sido associada a inúmeros fatores, com destaque para a idade gestacional na qual ocorreu a transmissão, a carga parasitária e o genótipo parasitário. A suscetibilidade individual de hospedeiros, diretamente relacionada à resposta imune, e a alelos do HLA ou MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade) de indivíduos infectados também parece atuar na patogênese da doença (Reikvam et al., 1976; Frenkel et al., 1997; Dubey et al., 1998; Remington et al., 2001; Montoya e Remington, 2008).

O primeiro objetivo da pesquisa foi a padronização da qPCR para *T. gondii* que possibilitaria a quantificação da carga parasitária e o acompanhamento da terapia anti-*Toxoplasma*. As principais vantagens da qPCR são: a capacidade de fornecer a quantidade de parasitos presentes na amostra, podendo detectar concentrações muito baixas de DNA, sendo teoricamente mais sensível que a PCR convencional de um *round*, e no mínimo tão sensível quanto a *nested*-PCR, não requeendo processamento pós-PCR, reduzindo o tempo de análise e a possibilidade de contaminação por carry-over (Peirson e Butler, 2007). Por outro lado, as desvantagens são o alto custo de equipamentos e reagentes, e a padronização do teste que necessita de conhecimentos prévios de biologia molecular para a manipulação correta das amostras. A reprodutibilidade da pipetagem do manipulador também é fundamental para que se possa interpretar os resultados da

qPCR, fato que é facilmente observado na avaliação dos resultados da duplicata ou triplicata das amostras.

Acreditamos que a qPCR proposta foi padronizada com sucesso uma vez que foi capaz de detectar todas as 76 amostras de líquido amniótico genotipadas, além de outras quatro, e não detectou nenhuma das 31 amostras do grupo controle. Ela poderá ser empregada não apenas para o diagnóstico e acompanhamento de gestantes, como também em qualquer paciente tratando uma toxoplasmose aguda, uma vez que se pode utilizar líquido amniótico para realizar a quantificação, como no presente estudo, assim como líquido céfalo-raquidiano de pacientes co-infectados pelo HIV, humor vítreo ou aquoso nos casos de toxoplasmose ocular, apenas para citar algumas das possibilidades. Apesar de existirem diversas sequências gênicas para a detecção de *T. gondii*, a mais utilizada na PCR convencional e na qPCR é o gene B1. Neste estudo foram realizados testes com dois iniciadores do gene B1, o B22/B23 e o JW63/JW 62. O B22/B23 foi o que apresentou o melhor desempenho, provavelmente por amplificar fragmento de menor peso molecular, corroborando estudos anteriores (Costa et al., 2000; Calderaro et al., 2006; Cassaing et al., 2006; Okay et al., 2009; Mesquita et al., 2010).

A LOD deste teste foi definida em 10 parasitos/mL, o mesmo nível de sensibilidade descrito por Nagy et. al., 2006, e melhor que o alcançado por Calderaro et.al., 2006, onde a LOD considerada foi de 10^3 parasitos/mL. Para melhorar ainda mais a LOD, chegando à detecção de um parasito/mL em 100% dos testes, temos como perspectiva a utilização de um sistema de amplificação quantitativa com sondas de hidrólise, ou ainda realizar a clonagem do fragmento de 115 pares de base (inserto) em vetor plasmidial, possibilitando a quantificação de cópias do fragmento de 115 pares de base/mL, em lugar de parasitos/mL.

Outro aspecto da qPCR que merece discussão é o fato de todas as 76 gestantes analisadas terem recebido espiromicina por períodos que variaram de uma a quatro semanas antes da amniocentese, e mesmo assim, todas elas apresentarem cargas parasitárias detectáveis por qPCR, sendo que em dois líquidos amnióticos a carga parasitária se encontrava acima de 10^4 parasitos/mL. Este fato pode ser importante para alertar os obstetras sobre a possibilidade de falha terapêutica (Gilbert, 2009; Peyron, 2009). A situação ideal seria, provavelmente, obter valores de carga parasitária indetectáveis em todos os líquidos amnióticos após alguns dias, ou semanas de tratamento, porém, até o presente, não se sabe qual deveria ser o nível de carga parasitária “aceitável”, ou se ela deveria ser sempre indetectável, caso o tratamento fosse adequado. Os resultados desta pesquisa nos levam a fazer algumas indagações com relação ao tratamento: seria o esquema terapêutico adotado atualmente, eficaz? Não seria prudente realizar um ou mais controles periódicos após o início do tratamento, muito embora sejam necessários procedimentos invasivos tais como a amniocentese? É possível realizar este controle com uma qPCR que quantifica DNA do parasito, ou teríamos que lançar mão de uma técnica de análise de expressão, uma vez que existe a possibilidade dos parasitos estarem presentes no líquido amniótico, porém não apresentarem replicação?

O presente estudo também tinha o objetivo de verificar a existência de associação entre a carga parasitária e o genótipo do parasito nas mesmas amostras de líquido amniótico, com o intuito de investigar se gestantes com carga parasitária mais elevada também apresentariam os genótipos parasitários mais patogênicos. Este tipo de abordagem poderia contribuir para a prescrição de esquemas terapêuticos diferenciados nessas gestantes (Gilbert, 2009; Peyron, 2009).

Nossa hipótese inicial era que as gestantes com maior carga parasitária fossem aquelas com os parasitos mais "virulentos", no caso, pertencentes ao genótipo I parasitário, porém os resultados obtidos na presente pesquisa demonstraram não existir associação entre a carga parasitária e o genótipo do parasito, muito embora tenhamos analisado apenas quatro marcadores.

Estudo realizado por Hill et al. (2012), também com o objetivo de comparar o genótipo e a carga parasitária em modelo experimental desenvolvido em camundongos, não encontrou associação entre a carga parasitária e o genótipo, assim como no presente estudo, tendo em vista que os animais com o genótipo I (GT1) apresentaram cargas parasitárias 1.000 vezes mais elevadas em relação àqueles que foram infectados com parasitos de genótipo II (PTG), teoricamente menos patogênicos, o que era esperado, porém, os animais que foram inoculados com o tipo II apresentaram cargas parasitárias 20 vezes superiores aos animais que foram infectados com a cepa CTG, classificada como tipo III, de patogenicidade intermediária, contrariando as expectativas.

Rico-Torres et al. (2012), determinaram o genótipo do parasito utilizando os marcadores SAG2, SAG3, GRA6 E BTUB, e a carga parasitária em quatro binômios mãe/recém-nascido com toxoplasmose perinatal no México. Em dois casos mãe/filho foram encontrados parasitos do tipo I e nos outros dois binômios as infecções foram causadas por parasitos com genótipos diferentes, porém relacionados ao tipo I. Houve grande variação da carga parasitária, de $5,3 \times 10^3$ a $2,7 \times 10^6$ parasitos/mL. Os autores concluíram que a carga parasitária não estava relacionada à transmissão vertical ou à gravidade da toxoplasmose nos fetos infectados.

O presente estudo é o primeiro a realizar genotipagem de *Toxoplasma gondii* no modelo de infecção congênita na América do Sul, de forma simultânea à determinação da carga parasitária, incluindo número significativo de gestantes,

muito embora tenhamos analisado apenas quatro marcadores. Após extensa pesquisa bibliográfica encontramos, em seres humanos, apenas o trabalho mexicano de Rico-Torres et al. (2012), que tentou associar a carga parasitária ao genótipo parasitário, porém em casuística muito mais restrita.

Tendo em vista que foi possível fazer o seguimento dos 76 recém-nascidos correspondendo às 76 gestações incluídas nesta casuística, fizemos a associação da carga parasitária e o desfecho clínico (gravidade da infecção fetal), e observamos que todos os recém-nascidos, com exceção de um que apresentava toxoplasmose congênita grave ao nascimento, com tríade de Sabin, eram assintomáticos e tiveram boa evolução, apesar de apresentarem sorologia para toxoplasmose com presença de IgM ao nascimento. Muito embora não tenhamos observado associação entre a carga parasitária e os genótipos parasitários; e tampouco entre a carga parasitária e a presença de mutações nas amostras de DNA extraídas dos líquidos amnióticos, a gestação que deu origem ao recém-nascido com tríade de Sabin (amostra número 226), foi uma das duas que apresentaram carga parasitária maior que 10^4 parasitos (309.574 parasitos/mL).

Os resultados encontrados nos quatro binôminos mãe/recém-nascidos do México, além do estudo realizado em modelo murino corroboram os resultados desta pesquisa, e nos fazem supor que a carga parasitária e o genótipo do parasito possam não ser os maiores determinantes da patogenicidade no modelo de toxoplasmose congênita humana. É plausível, portanto, que a resposta imune do hospedeiro, diretamente relacionada aos alelos do HLA, possa exercer papel central e determinante da gravidade na toxoplasmose congênita ou que vários fatores atuem simultaneamente para determinar a patogênese da doença fetal. (Habegger de Sorrentino et al., 2005; Hill et al., 2012),

O fato de quatro amostras, das 80 inicialmente incluídas no estudo, terem sido amplificadas com iniciadores do gene B1 de *Toxoplasma gondii*, na PCR com

finalidade diagnóstica, e não terem sido amplificadas pelo multiplex-*nested*-PCR para genotipagem, não é surpreendente, uma vez que existem 35 cópias do gene B1 por parasito, enquanto os marcadores analisados no multiplex-*nested*-PCR, são genes de cópia única (SAG3, SAG2 e GRA6) (Jamieson et al., 2009; Baker et al., 2012; Boots et al., 2012; Wang et al., 2012). Em comparação a outros trabalhos descritos da literatura, tais como o de Ferreira et al., 2011, que analisaram 62 amostras das quais apenas 20 (32,25%) puderam ser genotipadas, tivemos aproveitamento maior (95%), provavelmente por termos optado pela triagem de amostras realizada pela qPCR. Como a LOD da qPCR foi de 10 parasitos, foram selecionadas amostras de líquido amniótico contendo mais de 10 parasitos/mL. Muito embora possa ter ocorrido este viés de seleção, não teria sido possível realizar a genotipagem parasitária com amostras contendo quantidade inferior de parasitos, ao menos com os marcadores empregados atualmente.

Outra diferença de nosso estudo em relação a trabalhos mais antigos da literatura tais como o de Ajzenberg et al., (2002) é termos analisado as amostras de líquido amniótico diretamente, sem passar pelo isolamento em camundongos ou em cultura de células. Apesar do isolamento do parasito propiciar a recuperação de concentrações mais significativas de DNA de *T. gondii*, facilitando a realização da genotipagem, as amplificações com finalidade diagnóstica, em especial a qPCR deveriam ser realizadas diretamente do DNA extraído das amostras de líquido amniótico. Além disso, até mesmo para a realização da genotipagem, o isolamento em camundongos ou em cultura de células poderia favorecer a ocorrência de recombinações gênicas, uma vez que a pressão seletiva *in vitro*, ou mesmo *in vivo*, no camundongo que é mais suscetível à toxoplasmose que o homem, seria diferente da que ocorre no organismo humano intacto, com sistema imunológico funcionando (Siqueira et al., 1985; Yano et al., 1987; Gissot et al., 2007).

Os trabalhos pioneiros de genotipagem de cepas de *T.gondii* empregavam a PCR-RFLP com um único marcador. Posteriormente, em estudos mais recentes, foram incluídos outros marcadores, totalizando atualmente 11, além de marcadores microssatélites, que foram empregados para a descrição de recombinações entre as três cepas clonais. Com essa evolução foi possível notar que os parasitos da América do Sul são aparentemente diferentes daqueles da Europa e Estados Unidos, onde há predominância do genótipo II clonal em infecções congênitas (Ajzenberg et al., 2004, Ferreira et al., 2006; Su et al., 2006; Belfort-Neto et al., 2007; Dubey et al., 2007; Su et al., 2010; Dubey et al., 2012).

Estudos realizados em nosso continente, mostraram que os genótipos parasitários são mais “virulentos” e predominantemente do tipo I e III, com um contingente significativo de amostras recombinantes ou atípicas, notadamente nos modelos de co-infecção com o HIV e na toxoplasmose ocular, corroborando os resultados do presente estudo tendo em vista que nossas amostras são, na quase totalidade, SAG3 e GRA6 - genótipo III e 5' e 3'-SAG2- genótipo I (Dubey et al., 2003; Dardé, 2004; Da Silva et al., 2005; Khan et al., 2006; Lehmann et al., 2006; Pena et al., 2006; Ferreira, 2011).

Dubey et al. (2007) em um estudo realizado em 84 amostras de DNA provenientes de galinhas, sendo 34 do Estado do Pará e 50 do Rio Grande do Sul, identificaram que em 11 amostras do Pará havia recombinações entre as três linhagens clonais clássicas: I, II e III. Por outro lado, em 19 amostras do Rio Grande do Sul foram identificados sete genótipos: cinco genótipos com recombinações das três linhagens clonais, um genótipo I, e dois genótipos III.

No mesmo ano, Belford-Neto et al. (2007) estudando 50 amostras de diafragma e 33 amostras de língua de porcos provenientes de Erechim, no Rio Grande do Sul, identificaram o tipo I em todas as amostras que amplificaram o marcador SAG2. Porém, quando essas amostras foram analisadas por outros

marcadores, foram classificadas como tipo III, concordando novamente com nossos resultados, muito embora os autores tenham trabalhado com animais.

Em 2008, Gilbert et al. mostraram que o *T. gondii* provoca doença ocular mais grave em crianças infectadas congenitamente no Brasil em comparação a crianças europeias, sugerindo que as diferenças possam ser devidas à infecção com genótipos mais “virulentos” do parasito que parecem predominar no Brasil, mas que raramente são encontrados na Europa, visto que a predominância na Europa é do genótipo II clonal.

Na Tunísia, país da África setentrional, Boughattas et al. (2010), identificaram o genótipo de 14 amostras de vários materiais biológicos tais como líquido amniótico, placenta e líquido céfalo-raquidiano de casos de toxoplasmose congênita. A caracterização genotípica foi feita com seis marcadores genéticos, 3'-SAG2, 5'-SAG2, SAG3, BTUB, GRA6 e APICO. A análise revelou uma amostra do tipo I, sete amostras contendo parasitos recombinantes I e III, três amostras contendo parasitos recombinantes I e II e três amostras com parasitos recombinantes I/II e III. Caso utilizássemos o mesmo tipo de análise para as nossas 76 amostras, teríamos 75 contendo parasitos portando genótipos recombinantes I e III, e apenas uma amostra do tipo II, que só amplificou o marcador SAG3.

Em estudo realizado na cidade de São Paulo, Brasil, foram analisadas 62 amostras de sangue, líquido ou líquido amniótico de pacientes com toxoplasmose aguda. Dentre os 62 pacientes, havia 25 com AIDS e toxoplasmose cerebral, 17 gestantes com primo-infecção, 12 com toxoplasmose ocular, seis recém-nascidos com toxoplasmose congênita e dois adultos com toxoplasmose aguda. Das 62 amostras, 20 foram genotipadas com sucesso, sendo 18 pertencentes ao genótipo ToxoDB #65, e as outras duas aos genótipos ToxoDB #6 e #71 (<http://toxodb.org/toxo/>). Os pacientes portadores dos genótipos #6 e #71 apresentaram toxoplasmose cerebral grave com encefalite difusa e lesões cerebrais

extensas. Dentre os 20 casos genotipados havia uma gestante assintomática com toxoplasmose aguda e um recém-nascido do qual não temos a descrição clínica. Nestes dois casos o genótipo parasitário foi ToxoDB #65. Os autores concluíram que o genótipo ToxoDB #65 parece ser bastante comum em infecções humanas da cidade de São Paulo, Brasil (Ferreira et al., 2011). Nesse estudo, foram avaliados 11 marcadores, enquanto no presente estudo foram avaliados apenas quatro marcadores, impossibilitando a classificação de nossas amostras pelo Toxo DB. No entanto, quando analisamos cada marcador individualmente, e comparamos nossos resultados com os de Ferreira et al., 2011, verificamos que os três genótipos identificados naquele estudo, isto é, ToxoDB #65 em 18 amostras, além de ToxoDB #6 e #71 em outras duas amostras, apresentam alelos do tipo III no sistema SAG3; do tipo I no 5' e 3'-SAG2; e do tipo III no GRA6, que foram exatamente os alelos encontrados em nosso estudo. Apesar de não termos, ao menos por enquanto, como classificar nossas amostras pelo ToxoDB, nossos resultados até o momento indicam que em nosso meio, ao contrário da Europa e Estados Unidos onde existe prevalência de parasitos do tipo II na toxoplasmose congênita, parece existir predomínio de parasitos com genótipo III. O único caso que apresentou genótipo diferente no sistema SAG3 (tipo II), não apresentava características clínicas diferentes da maioria, isto é, o recém-nascido também foi assintomático ao nascimento, apesar de apresentar sorologia com presença de IgM anti-*T. gondii* e carga parasitária de 958 parasitos/mL.

Recentemente, Pena et al. (2012) e Bezerra et al. (2012), realizaram estudos em animais no Brasil, utilizando 12 e 7 marcadores, respectivamente, com a técnica de PCR-RFLP e encontraram somente genótipos diferentes dos clonais I, II e III. Os autores concluíram que estes resultados demonstram que o multilocus PCR-RFLP subestima a verdadeira diversidade da população de *T. gondii*. Assim, o sequenciamento de DNA seria a técnica preconizada para inferir a diversidade

genética e estrutura populacional de *T. gondii* no Brasil. Além disso, o desenvolvimento de novos marcadores moleculares é necessário para agrupar e caracterizar isolados atípicos de *T. gondii* na América do Sul.

Este estudo mostrou que é possível genotipar *T. gondii* diretamente das amostras de líquido amniótico de gestantes tratadas, atendidas em centros de medicina fetal do Estado de São Paulo, por meio da multiplex-*nested*-PCR-RFLP, muito embora tenhamos amplificado poucos marcadores, e mesmo os quatro selecionados não foram amplificados com sucesso na maior parte das amostras. Não obstante, todos os produtos de amplificação foram sequenciados, nos dois sentidos, confirmando os resultados do PCR-RFLP em todos os casos, e caracterizando 75 das 76 amostras com o genótipo SAG3 e GRA6 tipo III e 5' e 3'-SAG2 tipo I. A única exceção foi uma amostra SAG3 tipo II que apresentou desfecho clínico semelhante às demais. Estes resultados chamam a atenção para a grande homogeneidade dos genótipos dos parasitos causadores de toxoplasmose congênita em nosso meio. Ademais, foi observada elevada frequência de mutações, variando de 14,5 a 24,5% no caso de heterozigotas e sinônimas; e de 5,66 a 10,9% para as mutações homozigotas e sinônimas, sem presença de regiões *hot-spot* sofrendo pressão seletiva. Todavia, não foi possível encontrar diferenças entre as 24 amostras contendo mutações, em relação àquelas 52 amostras sem mutações, no que se refere à carga parasitária e ao genótipo parasitário.

Tendo em vista não termos encontrado associação entre a carga parasitária e o genótipo do parasito no presente estudo, frustamos nossa proposta inicial de utilizar esta abordagem para o planejamento de esquemas terapêuticos diferenciados em gestantes.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo permitiram as seguintes conclusões:

- a) A técnica de *Real Time* PCR (qPCR) para a determinação da carga parasitária em líquidos amnióticos de gestações com infecção comprovada por *T. gondii* foi padronizada com sucesso usando os iniciadores B22/B23 do gene B1 do parasito, podendo ser empregada na rotina diagnóstica.
- b) Foi possível realizar a genotipagem de 76 amostras de líquido amniótico, com maior frequência usando os marcadores SAG3 e 5' e 3'-SAG2 em relação ao GRA6. Houve grande homogeneidade dos genótipos parasitários, com predomínio do genótipo SAG3 e GRA6 tipo III e 5 e 3'-SAG2 - tipo I. O sequenciamento automatizado confirmou a confiabilidade da técnica de RFLP e encontrou frequência elevada de mutações, todas sinônimas, sem regiões *hot spot*, e aparentemente não associadas à carga parasitária.
- c) No presente estudo não houve associação entre a magnitude da carga parasitária e os genótipos de *T. gondii* nas amostras de líquido amniótico.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ajioka JW, Fitzpatrick JM, Reitter, CP. *Toxoplasma gondii* genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy. Expert Rev Mol Med. 2001;3:1-19.

Ajioka JW, Soldati D. *Toxoplasma: molecular and cellular biology*. Horizon Biosciences, United Kingdom. 2007.205p

Ajzenberg D, Ban˜uls AL, Su C, Dume`tre A, Demar M, Carme B, et al. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol. 2004;34:1185-96.

Ajzenberg D, Cogné N, Paris L, Bessieres MH, Thulliez P, Fillisetti D, et al. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis and correlation with clinical findings. J Infect Dis. 2002;186:684-9.

Ajzenberg D, Collinet F, Mercier A, Vignoles P, Darde M-L. Genotyping of *Toxoplasma gondii* Isolates with 15 Microsatellite Markers in a Single Multiplex PCR Assay. J Clin Microbiol, 2010;48: 4641-5.

Ajzenberg D, Dume`tre A, Darde ML. Multiplex PCR for typing strains of *Toxoplasma gondii*. J Clin Microbiol. 2005;43:1940-43.

Ajzenberg D, Yera H, Marty P, Paris L, Dalle F, Menotti J, et al. Genotype of 88 *Toxoplasma gondii* isolates associated with toxoplasmosis in immunocompromised patients and correlation with clinical findings. J Infect Dis. 2009;199 :1155-67

Andrade GMQ, Resende LM, Goulart EMA, Siqueira AL, Vitor RWA, Januario JN. Deficiência auditiva na toxoplasmose congênita detectada pela triagem neonatal. Rev Bras Otorrinolaringol. 2008;74:21-8.

Aubert D, Maine GT, Villena I, Hunt JC, Howard L, Sheu M, et al. Recombinant antigens to detect *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin M in human sera by enzyme immunoassay. J Clin Microbiol. 2000;38:1144-50.

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

Baker C, Antonovics J. Evolutionary determinants of genetic variation in susceptibility to infectious diseases in humans. *PLoS One*. 2012;7:29089.

Bastien P. Molecular diagnosis of toxoplasmosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2002;9:205–15.

Bastien P, Procop GW, Reischl U. Quantitative real-time PCR is not more sensitive than ‘‘Conventional’’ PCR. *J Clin Microbiol*. 2008;46:1897-900.

Belford-Neto R, Nussenblatt V, Rizzo L, Muccioli C, Silveria C, Nussenblatt, et al. High prevalence of unusual genotypes of *Toxoplasma gondii* infection in pork meat samples from Erechim, Southern Brazil. *An Acad Bras Cienc*. 2007;79:111-4.

Bezerra RA, Carvalho FS, Guimarães LA, Rocha DS, Silva FL, Wenceslau AA, et al. Comparison of methods for detection of *Toxoplasma gondii* in tissues of naturally exposed pigs. *Parasitol Res*. 2012;110:509-14

Bichara CN, Canto GA, Tostes Cde L, Freitas JJ, Carmo EL, Póvoa MM, et al. Incidence of congenital toxoplasmosis in the City of Belém, State of Pará, Northern Brazil, determined by a neonatal screening program: preliminary results. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012;45:122-4

Bonfioli AA, Orefice F. Toxoplasmosis. *Semin Ophthalmol*. 2005;20:129-41.

Boothroyd JC, Grigg ME. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? *Curr Opin Microbiol*. 2002;5:438-42.

Boots M, White A, Best A, Bowers R. The importance of who infects whom: the evolution of diversity in host resistance to infectious disease. *EcolLett*. 2012;15:1104-11.

Boughattas S, Ben-Abdallah R, Siala E, Souissi O, Aoun K, Bouratbine A. Direct genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with congenital toxoplasmosis in Tunisia (North Africa). *Am J Trop Med Hyg*. 2010;82:1041-6.

Brindley PJ, Gazzinelli RT, Denkers EY, Davis SW, Dubey JP, Belfort R Jr, et al. Differentiation of *Toxoplasma gondii* from closely related coccidia by riboprint analysis and a surface antigen gene polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*. 1993;48:447-56.

Bulow R, Bootheroyd JC. Protection of mice from fatal *Toxoplasma gondii* infection by immunization with p30 antigen in liposomes. J Immunol. 1991;147:3496-500.

Bustin SA editor. A-Z of Quantitative PCR. California: IUL Biotechnology Series. 2006.1v.

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

Carellos EV, Andrade GM, Aguiar RA. Avaliação de triagem pré-natal para toxoplasmose em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil: um estudo transversal de mulheres pós-parto em duas maternidades. Cad Saúde Pública. 2008;24:391-401.

Carvalho CG, Mussi-Pinhata MM, Yamamoto AY, De Souza CB, Maciel LM. Incidence of congenital toxoplasmosis estimated by neonatal screening: relevance of diagnostic confirmation in asymptomatic newborn infants. Epidemiol Infect. 2005;133:485-91.

Cassaing S, Bessires MH, Berry A, Berrebi A, Fabre R, Magnaval JF. Comparison between two amplification sets for molecular diagnosis of toxoplasmosis by real-time PCR. J Clin Microbiol. 2006;44:720-4.

Chabbert E, Lachaud L, Crobu L, Bastien P. Comparison of two widely used PCR primer systems for detection of toxoplasma in amniotic fluid, blood, and tissues. J Clin Microbiol. 2004;42:1719-22.

Cneude F, Delge R, Barbier C, Durand-Joly I, Bourlet A, Sonna M, et al. Septic shock due to congenital disseminated toxoplasmosis. Arch Pediatr. 2003;10:326-8.

Costa JM, Pautas C, Ernault P, Foulet F, Cordonnier C, Bretagne S. Real-time PCR for diagnosis and follow-up of Toxoplasma reactivation after allogeneic stem cell transplantation using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. J Clin Microbiol. 2000;38:2929-32.

Cozon GJ, Ferrandiz J, Nebhi H, Wallon M, Peyron F. Estimation of the avidity of immunoglobulin G for routine diagnosis of chronic *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1998;17:32-6.

Craver MPJ, Knoll LJ. Increased efficiency of homologous recombination in *Toxoplasma gondii* dense granule protein 3 demonstrates that GRA3 is not necessary in cell culture but does contribute to virulence. Mol Biochem Parasitol.

2007;153:149-57.

Dardé ML. Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. Ann Ist Super Sanità. 2004; 40: 57-63.

Darde ML. *Toxoplasma gondii*, “new” genotypes and virulence. Parasite. 2008;15:366-71.

Da Silva AV, Pezerico SB, de Lima VY, d’Arc Moretti L, Pinheiro JP, Tanaka EM, et al. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains isolated from dogs with neurological signs. 2005; 127: 23-7.

Delhaes L, Ajzenberg D, Sicot B, Bourgeot P, Darde M-L, Dei-Casand E, et al. Severe congenital toxoplasmosis due to a *Toxoplasma gondii* strain with an atypical genotype: case report and review. Prenat Diagn. 2010;30:902-5.

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;45:88-95.

Derouin F, Pelloux H. Prevention of toxoplasmosis in transplant patients. Clin Microbiol Infect. 2008;14:1089 –101

Diniz EMA. O diagnóstico da toxoplasmose na gestante e no recém-nascido. Pediat. 2006;28:222-5.

Dubey JP. Toxoplasmosis - an overview. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1991;22:Suppl:88-92.

Dubey JP. The history of *toxoplasma gondii* – The first 100 years. J Eukaryot Microbiol. 2008;55:467-75.

Dubey JP, Frenkel JK. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. J Protozool. 1976;4:537-46.

Dubey JP, Miller NL, Frenkel JK. *Toxoplasma gondii* life cycle in cats. J Am Vet Med Assoc. 1970;157:1767-70.

Dubey JP, Lago EG, Gennari SM, Su C, Jones JL. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology*. 2012;139:1375-424.

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;11:267-99.

Dubey JP, Navarro IT, Graham DH, Dahl E, Freire RL, Prudêncio LB, et al. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free range-chickens from Paraná, Brazil. *Vet Parasitology*. 2003;117:229-34.

Dubey JP, Rajendran C, Ferreira LR, Kwok OC, Sinnett D, Majumdar D, et al. A new atypical highly mouse virulent *Toxoplasma gondii* genotype isolated from a wild black bear in Alaska. *J Parasitol*. 2010;96:713-6.

Dubey JP, Sundar N, Gennari SM, Minervino AH, Farias NA, 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;143:182-8.

Dubey JP, Velmurugan GV, Alvarado-Esquivel C, Alvarado-Esquivel D, Rodríguez-Peña S, et al. Isolation of *Toxoplasma gondii* from animals in Durango, Mexico. *J Parasitol*. 2009;95:319-22.

Elbez-Rubinstein A, Ajzenberg D, Dardé M-L, Cohen R, Dumètre A, Yera H, et al. Congenital Toxoplasmosis and Reinfection during Pregnancy: Case Report, Strain Characterization, Experimental Model of Reinfection, and Review. *J Infect Dis*. 2009;199:280-5.

Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, et al. Real-Time PCR in clinical microbiology: Applications for routine laboratory testing. *J Clin Microb*. 2006;19:165-256.

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. *J Clin Microbiol*. 2011; 49:1513-7.

Ferguson DJ. Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host. *Int J Parasitol*. 2004;34:347-60.

Ferreira AM, Vitor RWA, Gazzinelli RT, Melo MN. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR - RFLP. *Inf Gen Evolut.* 2006;6:22-3.

Ferreira IM, Vidal JE, Costa-Silva TA, Meira CS, Hiramoto RM, Penalva de Oliveira AC, et al. *Toxoplasma gondii*: genotyping of strains from Brazilian AIDS patients with cerebral toxoplasmosis by multilocus PCR-RFLP markers. *Exp Parasitol.* 2008;118:221-7.

Ferreira IM, Vidal JE, Mattos Cde C, Mattos LC, Qu D, Su C, Pereira-Chiocola VL. *Toxoplasma gondii* isolates: multilocus RFLP-PCR genotyping from human patients in Sao Paulo State, Brazil identified distinct genotypes. *Exp Parasitol.* 2011;129:190-5.

Frazão-Teixeira E, Sundar N, Dubey JP, Grigg ME, Oliveira FC. Multi-locus DNA sequencing of *Toxoplasma gondii* isolated from Brazilian pigs identifies genetically divergent strains. *Vet Parasitol.* 2011;175:33-9.

Frenkel JK, Ambroise-Thomas P. Genomic drift of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res.* 1997;83:1-5.

Gallego C, Saavedra-Matiz C, Gómez-Marín JE. Direct genotyping of animal and human isolates of *Toxoplasma gondii* from Colombia (South America). *Acta Tropica.* 2006;97: 161-7.

Gilbert R. Treatment for congenital toxoplasmosis: finding out what works. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104:305-11.

Gilbert RE, Freeman K, Lago EG, Bahia-Oliveira LM, Tan HK, Wallon M, et al . Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2008;2:277.

Gissot M, Kelly KA, Ajioka JW, Grealley JM, Kim K. Epigenomic modifications predict active promoters and gene structure in *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.* 2007;3:77.

Grigg ME, Bonnefoy S, Hehl AB, Suzuki Y, Boothroyd JC. Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. *Science.* 2001a;294:161-65.

Grigg ME, Boothroyd JC. Rapid identification of virulent type I strains of the protozoan pathogen *Toxoplasma gondii* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis at the B1 gene. *J Clin Microbiol.* 2001b;39:398-400.

Gross U, Bohne W, Soete M, Dubremetz JF. Developmental differentiation between tachyzoites and bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Today*. 1996;12:30-3.

Habegger de Sorrentino A, Lopez R, Motta P, Marinic K, Sorrentino A, Iliovich E, et al. HLA Class II involvement in HIV associated Toxoplasmic encephalitis development. *Clin Immunol*. 2005;115:133-7.

Hedman K, Lappalainen M, Seppä I, Mäkelä O. Recent primary toxoplasma infection indicated by a low avidity of specific IgG. *J Infect Dis*. 1989;159:736-40.

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

Hill DE, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect*. 2002;8:634-40.

Hill RD, Gouffon JS, Saxton AM, Su C. Differential gene expression in mice infected with distinct *Toxoplasma* strains. *Infect Immun*. 2012;80:968-74.

Hohlfeld P, Daffos F, Costa J-M, Thulliez P, Forestier F, Vidaud M. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase-chain-reaction test on amniotic fluid. *N Engl J Med*. 1994;15:695-9.

Hotop A, Hlobil H, Gross U. Efficacy of rapid treatment initiation following primary *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin Infect Dis*. 2012;54:1545-52.

Howe DK, Honoré S, Deourin F, Sibley D. Determination of genotypes of *T. gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*. 1997;35:1411-4.

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

Jones JL, Dubey JP. Waterborne toxoplasmosis—recent developments. *Exp. Parasitol*. 2010;124:10-25.

Jones JL, Lopez A, Wahlquist SP, Nadle J, Wilson M. Emerging Infections Program FoodNet Working Group. Survey of clinical laboratory practices for parasitic diseases. *Clin Infect Dis*. 2004;38:198-02.

Joynson DH, Payne RA, Rawal BK. Potential role of IgG avidity for diagnosing toxoplasmosis. *J Clin Pathol.* 1990;43:1032-3.

Jung C, Lee CY, Grigg ME. The SRS superfamily of *Toxoplasma* surface proteins. *Int J Parasitol.* 2004;34:285-96

Khan A, Fux B, Su C, Dubey JP, Darde ML, Ajioka JW, et al. Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104:14872-7.

Khan A, Jordan C, Muccioli C, Vallochi AL, Rizzo LV, Belfort Jr, et al. Genetic divergenci of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2006;12:942-9.

Khan A, Taylor S, Su C, Mackey AJ, Boyle J, Cole R, et al. Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. *Nucleic Acids Res.* 2005a;33:2980-92.

Khan A, Su C, German M, Storch GA., Clifford DB., Sibley LD. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from immunocompromised patients reveals high prevalence of type I strains. *J Clin Microbiol.* 2005b;43:5881-7.

Kaye A. Toxoplasmosis: diagnosis, treatment, and prevention in congenitally exposed infants. *J Pediatr Health Care.* 2011;25:355-64.

Kieffer F, Rigourd V, Ikounga P, Bessieres B, Magny JF, Thulliez P. Disseminated congenital *Toxoplasma* infection with a type II strain. *Pediatr Infect Dis J.* 2011;30:813-5.

Kim K, Weiss LM. *Toxoplasma*: the next 100 years. *Microbes infect.* 2008;10:978-84.

Lago EG, Carvalho RL, Jungblutn R, Silva VB, Fiori RM. Screening for *Toxoplasma gondii* antibodies in 2,513 consecutive parturient women and evaluation of newborn infants at risk for congenital toxoplasmosis. *Sci Med.* 2009;19:27-34.

Lago EG, Neto EC, Melamed J, Rucks AP, Presotto C, Coelho JC, et al. Congenital toxoplasmosis: late pregnancy infections detected by neonatal screening and maternal serological testing at delivery. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2007;21:525-31.

Lehmann T, Graham DH, Dahl ER, Bahia-Oliveira LM, Gennari SM, Dubey JP. Variation in the structure of *Toxoplasma gondii* and the roles of selfing, drift, and epistatic selection in maintaining linkage disequilibria. *Infect Genet Evol.* 2004;4:107-14.

Lehmann T, Marcet, PL; Graham DH, Dahl ER, Dubey JP. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. *Proc Nat Acad Sci USA.* 2006;103:11423-8.

Levine ND. Taxonomy of *Toxoplasma*. *J Protozool.* 1977;66:830-4.

Literák I, Rychlík I, Svobodová V, Pospíšil Z. Restriction fragment length polymorphism and virulence of Czech *Toxoplasma gondii* strains. *Int J Parasitol.* 1998;28:1367-74.

Lopes FM, Gonçalves DD, Mitsuda-Breganó R, Freire RL, Navarro IT. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy. *Braz J Infect Dis.* 2007;11:496-06.

Lopez A, Dietz VJ, Wilson M, Navin TR, Jones JL. Preventing congenital toxoplasmosis. *MMWR Recomm Rep.* 2000;49(RR2):59-68

Mai K, Sharman PA, Walker RA, Katrib M, Souza D, McConville MJ, et al. Oocyst wall formation and composition in coccidian parasites. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2009;104:281-9.

Martin V, Arcavi M, Santillan G, Amendoeira MR, Souza Neves E, Griemberg G, et al. Detection of human *Toxoplasma*-Specific immunoglobulins A,M, and G with a recombinant *Toxoplasma gondii* rop2 protein. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1998;5:627-31.

Martina MN, Cervera C, Esforzado N, Linares L, Torregrosa V, Sanclemente G, et al. *Toxoplasma gondii* primary infection in renal transplant recipients. Two case reports and literature review. *Transpl Int.* 2011;24:6-12.

Maubon D, Ajzenberg D, Brenier-Pinchart MP, Dardé ML, Pelloux H. What are the respective host and parasite contributions to toxoplasmosis? *Trends Parasitol.* 2008;24:299-303.

Maubon D, Brenier-Pinchart MP, Fricker-Hidalgo H, Pelloux. Real Time PCR in the diagnosis of toxoplasmosis: the way to standardization? *Pathol Biol.* 2007;55:304-11.

Mesquita RT, Ziegler AP, Hiramoto RM, Vidal JE, Pereira-Chiocola VL. Real-time quantitative PCR in cerebral toxoplasmosis diagnosis of Brazilian human immunodeficiency virus-infected patients. *J Med Microbiol.* 2010;59:641-7.

Montoya JG, Liensenfeld O. Toxoplasmosis. *The Lancet.* 2004;363:1965-76

Montoya JG, Remington JS. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clinical Practice.* 2008;47:554-66.

Montoya JG, Rosso F. Diagnosis and management of toxoplasmosis. *Clin Perinatol.* 2005;32:705-26.

Mozzatto L, Procianoy RS. Incidence of congenital toxoplasmosis in southern Brazil: a prospective study. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2003;45:147-51.

Nicolle C, Manceaux L. Sur un protozoaire nouveau du gondi. *C R Séances Acad Sci.* 1909;148:369-72.

Nagy B, Ban Z, Beke A, Nagy G R, Lazar L, Papp C, Toth-Pal E. & Papp Z. Detection of *Toxoplasma gondii* from amniotic fluid, a comparison of four different molecular biological methods. *Clin. Chim.* 2006;368:131-7.

Okay TS, Yamamoto L, Oliveira LC, Manuli ER, de Andrade Junior HF, Del Negro GM. Significant performance variation among PCR systems in diagnosing congenital toxoplasmosis in São Paulo, Brazil: analysis of 467 amniotic fluid samples. *Clinics.* 2009;64:171-6.

Pelloux H, Dupouy-camet J, Derouin F, Alboulker J-P, Raffi F & Bio-Toxo Study Group. A multicentre prospective study for the polymerase chain reaction detection of *Toxoplasma gondii* DNA in blood samples from 186 AIDS patients with suspected toxoplasmic encephalitis. *AIDS.* 1997;11:1888-90.

Pena HFJ, Gennari SM, Dubey JP, Su C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *Int J Parasitol.* 2008;38:561-9.

Pena HF, Soares RM, Amaku M, Dubey JP, Gennari SM. *Toxoplasma gondii* infection in cats from Sao Paulo state, Brazil: seroprevalence, oocyst shedding, isolation in mice, and biologic and molecular characterization. *Rev Vet Sci* 2006;81:58-67.

Pena HF, Vitaliano SN, Beltrame MA, Pereira FE, Gennari SM, Soares RM. PCR-RFLP genotyping of *Toxoplasma gondii* from chickens from Espírito Santo state,

Southeast region, Brazil: New genotypes and a new SAG3 marker allele. *Vet Parasitol.* 2012;11:551-61

Peng HJ, Chen XG, Lindsay DS. A review: Competence, compromise, and concomitance-reaction of the host cell to *Toxoplasma gondii* infection and development. *J Parasitol.* 2011;97:620-28.

Peirson SN, Butler JN. Quantitative polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol.* 2007;362:349-62.

Petersen E. Toxoplasmosis. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2007;12:214-23.

Peyron F. When are we going to celebrate the centenary of the discovery of efficient treatment for congenital toxoplasmosis? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104:316-9.

Peyron F, Lobry JR, Musset K, Ferrandiz J, Gomez-Marin JE, Petersen E, et al. Serotyping of *Toxoplasma gondii* in chronically infected pregnant women: predominance of type II in Europe and types I and III in Colombia (South America). *Microbes Infect.* 2006;8:2333-40.

Phan L, Kasza K, Jalbrzikowski J, Noble AG, Latkany P, Kuo A, et al. Longitudinal study of new eye lesions in children with toxoplasmosis who were not treated during the first year of life. *Am J Ophthalmol.* 2008;146:375-84.

Pradhan S, Yadav R, Mishra VN. Toxoplasma meningoencephalitis in HIV-seronegative patients: clinical patterns, imaging features and treatment outcome. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007;101:25-33.

Reikvam A, Lorentzen-Styr AM. Virulence of different strains of *Toxoplasma gondii* and host response in mice. *Nature.* 1976;261:508-9.

Reischl U, Bretagne S, Kruger D, Ernault P, Costa JM. Comparison of two DNA targets for the diagnosis of Toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *BMC Infect Dis.* [Internet] 2003 May 2 [cited 2011 July 9]; 3: Article 7 [9p]. Available from: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2334-3-7.pdf>

Remington JS, McLeod R, Thulliez P, Desmonts G. Toxoplasmosis: Infectious diseases of the fetus and newborn infant. *WB Saunders.* 2001;5:205-346.

Remington JS, Thulliez P, Montoya JG. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*. 2004;42:941-5.

Rico-Torres CP, Figueroa-Damián R, López-Candiani C, Macías-Avilés HA, Cedillo-Peláez C, Cañedo-Solares I, et al. Molecular diagnosis and genotyping of cases of perinatal toxoplasmosis in Mexico. *Pediatr Infect Dis J*. 2012;31:411-3.

Robert-Gangneux F, Dardé ML. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev*. 2012;25:264-96.

Saadatnia G, Golkar M. A review on human toxoplasmosis. *Scand J Infect Dis*. 2012;44:805-14.

Saeij JP, Boyle JP, Boothroyd JC. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *Trends Parasitol*. 2005;21:476-81.

Sibley LD. *Toxoplasma gondii*: perfecting an intracellular life style. *Traffic*. 2003;4:581-86.

Sibley LD, Boothroyd JC. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature*. 1992;359:82-5.

Siqueira M, Drumond LS, Gennari M, Ferreira VC, Reis MH, Biozzi G. Effect of genetic modification of antibody responsiveness on resistance to *Toxoplasma gondii* infection. *Infect Immun*. 1985;48:298-302.

Smith JR, Cunningham ET Jr. Atypical presentations of ocular toxoplasmosis. *Curr Opin Ophthalmol*. 2002;13:387-92.

Su C, Shwab EK, Zhou P, Zhu XQ, Dubey JP. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol*. 2010;137:1-11.

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;36:841-8.

Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol*. 2000;30:1217-58.

Varella IS, Canti IC, Santos BR, Coppini AZ, Argondizzo LC, Tonin C, et al. Prevalence of acute toxoplasmosis infection among 41,112 pregnant women and the mother-to-child transmission rate in a public hospital in South Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104:383-8

Vasconcelos-Santos DV, Machado Azevedo DO, Campos WR, Oréfice F, Queiroz-Andrade GM, Carellos EV, et al. Congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil: results of early ophthalmologic examination of a large cohort of neonates. *Ophthalmology*. 2009;116:2199-205.

Vaudaux JD, Muccioli C, James ER, Silveira C, Magargal SL, Jung C, et al. Identification of an atypical strain of *Toxoplasma gondii* as the cause of a waterborne outbreak of toxoplasmosis in Santa Isabel do Ivaí, Brazil. *J Infect Dis*. 2010;202:1226-33.

Velge-Roussel F, Chardès T, Mélévec P, Brillard M, Hoebeke J, Bout D. Epitopic analysis of the *Toxoplasma gondii* major surface antigen SAG1. *Mol. Biochem. Parasitol*. 1994;66:31-8.

Wallon M, Dunn D, Slimani D, Giraut V, Gay-Andrieu F, Peyron F. Diagnosis of congenital toxoplasmosis at birth: what is the value of testing for IgM and IgA? *Eur J Pediatr*. 1999;158:645-9.

Wang X, Morris NJ, Schaid DJ, Elston RC. Power of single- vs. multi-maker tests of association. *Genet Epidemiol*. 2012;36:480-7.

Weiss JB. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. *Clin Microbiol Rev*. 1995;113-30.

Weiss LM, Dubey JP. Toxoplasmosis: a history of clinical observations. *Int J Parasitol*. 2009;39:895-901.

Yai LE, Ragozo AM, Soares RM, Pena HF, Su C, Gennari SM. Genetic diversity among capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) isolates of from Brazil. *Vet Parasitol*. 2009;162:332-7.

Yano K, Nakabayashi T, Inoki S. Modification of growth rate of *Toxoplasma gondii* by continuous passage in immune mice. *ZentralblBakteriolMikrobiolHygA*. 1987;264:455-63.

Toxoplasma gondii. Wikipedia: la encyclopedia livre [Internet]. [consultado en 26 de Noviembre de 2012]. Disponible em: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/39/Toxoplasma_gondii_tachy.jpg

Toxoplasma gondii. Portal da UFRG [Internet]. [consultado em 26 de Novembro de 2012]. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/para-site/siteantigo/Imagensatlas/Protozoa/Imagens/bradi3.jpg>

Toxoplasma gondii. Portal da Wikipedia [Internet]. [consultado em 26 de Novembro de 2012]. Disponível em: [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/5d/T._gondii_unsporulated_oocyst_differential_interference_contrast_\(DIC\),_100%C3%97.jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/5d/T._gondii_unsporulated_oocyst_differential_interference_contrast_(DIC),_100%C3%97.jpg)

Toxoplasma gondii. [consultado em 10 de Fevereiro de 2012]. Disponível em: <http://2.bp.blogspot.com>.

APÊNDICE

APÊNDICE A – TABELA DAS AMOSTRAS COM GENÓTIPO E CARGA PARASITÁRIA

Marcadores					
Amostras (LA)	SAG3 (RFLP/Seq.)	5´ SAG2 (RFLP/Seq.)	3´SAG2 (RFLP/Seq.)	GRA6 (RFLP/Seq.)	Carga parasitária (parasitos/mL)
11	III	I	I	III	8140,0
12	III	nd	nd	nd	6002,0
93	III	I	I	III	2066,0
102	nd	I	I	nd	1048,0
104	III	I	I	nd	4144,0
105	III	I	I	III	1984,0
110	nd	I	I	nd	330,0
118	III	nd	nd	nd	2010,0
135	III	I	I	III	830,0
138	III	-	nd	nd	3334,0
144	nd	I	I	nd	3292,0
151	III	I	I	nd	2016,0
152	III	nd	nd	nd	806,0
153	nd	I	I	nd	1868,0
159	III	I	I	III	482,0
161	III	I	I	III	2094,0
162	nd	I	I	nd	382,0
163	III	I	I	nd	2592,0
164	III	-	nd	nd	1882,0
165	III	-	nd	nd	936,0
167	III	I	I	nd	3466,0
168	III	I	I	nd	6860,0
170	III	I	I	nd	7318,0
171	nd	I	I	nd	978,0
172	nd	I	I	nd	4904,0
173	III	I	I	III	520,0
174	III	I	I	III	752,0
175	III	I	I	III	3010,0
176	III	-	Nd	nd	7980,0
177	III	I	I	nd	7368,0
179	III	I	I	III	642,0
180	III	I	I	nd	7420,0
181	III	I	I	nd	1898,0
182	III	I	I	III	1070,0
183	III	I	I	III	552,0
184	III	I	I	III	4384,0
186	III	I	I	III	3736,0
188	nd	I	I	III	1768,0
192	III	I	I	III	222,0
194	III	I	I	III	406,0
195	nd	nd	nd	nd	472,0
196	nd	nd	nd	nd	362,0
197	nd	nd	nd	nd	1154,0
198	III	nd	nd	nd	1662,0

199	nd	nd	nd	nd	626,0
200	III	-	nd	nd	1322,0
201	nd	I	I	nd	906,0
202	nd	nd	-	nd	352,0
203	III	-	nd	nd	938,0
204	nd	-	nd	nd	1182,0
205	III	nd	nd	nd	1028,0
206	III	I	I	nd	1026,0
207	III	nd	nd	nd	1938,0
208	III	nd	-	nd	2102,0
209	nd	I	I	nd	954,0
210	nd	I	I	nd	2506,0
211	III	I	I	nd	318,0
212	III	I	I	nd	1104,0
213	II	nd	nd	nd	958,0
214	III	-	nd	nd	234,0
215	III	I	I	III	352,0
216	III	I	I	nd	1808,0
217	III	I	nd	nd	1964,0
218	nd	-	I	nd	2826,0
219	nd	I	I	nd	332,0
220	nd	nd	I	nd	2466,0
221	III	-	I	nd	3362,0
222	nd	I	I	nd	1440,0
223	III	nd	nd	nd	604,0
224	III	I	I	nd	1606,0
225	III	I	nd	nd	1322,0
226	III	nd	I	nd	309.574,0
227	III	I	I	III	808.328,0
228	III	nd	nd	nd	938,0
229	III	I	I	nd	334,0
230	III	nd	-	nd	640,0
231	nd	I	I	nd	1100,0
232	nd	I	I	nd	764,0
233	nd	I	I	nd	1390,0
234	nd	I	nd	nd	2782,0

nd = não determinado

- = amostras que amplificaram somente no multiplex-nested-PCR para o 5' ou 3' SAG2 e por isso não foram sequenciadas.

ANEXO

ANEXO A – Parecer de aprovação do Comitê de Ética - CAPPesq

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 08/06/2011, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0347/11**, intitulado: **"ESTUDO DA CARGA PARASITÁRIA E DOS GENÓTIPOS DE TOXOPLASMA GONDII NA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA"** apresentado pelo Departamento de **MEDICINA TROPICAL**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Thelma Suely Okay**

Pesquisador (a) Executante: **Lília Spaleta Targa**

CAPPesq, 08 de Junho de 2011

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492
e-mail: cappesq@hcnet.usp.br