

Mariana Vitule Brito de Souza

**Tipagem molecular de *Toxoplasma gondii*: análise de
líquidos amnióticos de gestações com diagnóstico de
toxoplasmose congênita**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de mestre em Ciências

Área de concentração: Pediatria

Orientadora: Profa. Dra. Thelma Suely Okay

SÃO PAULO
2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Souza, Mariana Vitule Brito de

Tipagem molecular de *Toxoplasma gondii* : análise de líquidos amnióticos de gestações com diagnóstico de toxoplasmose congênita / Mariana Vitule Brito de Souza. -- São Paulo, 2009.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina

da Universidade de São Paulo.

Departamento de Pediatria.

Área de concentração: Pediatria.

Orientadora: Thelma Suely Okay.

Descritores: 1.*Toxoplasma gondii* 2.Toxoplasmose congênita 3.Tipagem de DNA
4.Reação em cadeia da polimerase 5.Infecção

USP/FM/SBD-392/09

*À minha mãe “in memoriam” que, onde quer que esteja,
sempre me ilumina e me dá forças para realizar meus sonhos.*

Agradecimentos

À Profa. Dra. Thelma Suely Okay, minha orientadora, pela oportunidade de realizar esse trabalho, pelo apoio, supervisão e por todos os ensinamentos.

À minha querida Léa Campos de Oliveira, por toda paciência, dedicação, interesse, preocupação e motivação durante todo esse período. Obrigada por ter entrado em minha vida.

À Gilda Maria Barbaro Del Negro, por ter me ensinado os princípios da Biologia Molecular e me fazer me apaixonar cada vez mais por essa área.

À Karina, minha amiga e companheira das horas boas e difíceis do “mundo” científico.

Ao Wagner, companheiro de mestrado, por ter me ajudado na parte prática desse trabalho.

À Lidia Yamamoto e Maria Luisa Nunes, pelo apoio e contribuição para a realização desse trabalho.

Ao pessoal do DASA, em especial ao meu chefe Nelson Gaburo Júnior por me apoiar, e as meninas do sequenciamento Tomoko Sekiya, Patricia Yoshie, Fátima Gandufe e Flávia Frias por terem realizado os sequenciamentos desse trabalho.

À Professora Doutora Cristina Miuki Abe Jacob, coordenadora do programa de pós-graduação em pediatria da FMUSP, pelo apoio prestado.

Ao laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMT-SP) por ter cedido as cepas de *Toxoplasma gondii*.

Ao meu pai, Fernando, por sempre me incentivar e me apoiar nas minhas decisões.

À Marry, pelos “insights” que ajuram a trilhar meu caminho.

À minha irmã, Camila, por simplesmente existir e me acompanhar nas jornadas da vida.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente auxiliaram na execução deste trabalho.

"Aventure-se, pois da mais insignificante pista
surgiu toda riqueza que o homem já conheceu"

(MASEFIELD, John).

Normalização adotada

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia De A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2^a. ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index*

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas/siglas

Lista de Figuras, Tabelas e Gráficos

Resumo

Summary

1. Introdução	1
1.1. Considerações históricas.....	1
1.2. <i>Toxoplasma gondii</i>	2
1.3. Ciclo de vida.....	3
1.4. Transmissão.....	5
1.5. Formas da doença.....	6
1.5.1 Infecção Congênita.....	6
1.5.2 Infecção em pacientes imunocompetentes.....	7
1.5.3 Infecção em pacientes imunocomprometidos.....	8
1.5.4 Doença ocular.....	9
1.6. Diagnóstico laboratorial.....	9
1.7 Classificação das cepas de <i>T. gondii</i>	12
1.8 Características moleculares de <i>T. gondii</i>	14
1.9. Métodos de tipagem.....	16
2. Justificativa e Objetivos	19
2.1 Justificativa.....	19
2.2 Objetivo.....	20

3. Casuística e Métodos	21
3.1 Casuística.....	21
3.1.1 Critérios de inclusão.....	22
3.1.2 Critérios de exclusão.....	22
3.2 Métodos.....	23
3.2.1 Medidas para minimizar os riscos de contaminação das amplificações.....	23
3.2.2 Controle dos riscos ambientais.....	24
3.2.3 Extração de DNA das amostras de líquido amniótico.....	25
3.2.4 Extração de DNA das cepas de <i>Toxoplasma gondii</i>	26
3.2.5 Amplificações das amostras pelo PCR universal.....	27
3.2.6 Multiplex- <i>nested</i> -PCR para genotipagem do <i>T. gondii</i>	28
3.2.7 Restrição Enzimática (RFLP).....	31
3.2.8 Sequenciamento automático de DNA.....	35
3.3 Análise Estatística.....	36
4. Resultados	37
4.1 Multiplex- <i>nested</i> -PCR-RFLP.....	37
4.2 Sequenciamento.....	39
5. Discussão	41
6. Conclusões	51
7. Anexos	52
8. Referências bibliográficas	72

Apêndices

Lista de abreviaturas

DNA – do inglês “desoxiribonucleic acid”

dNTP – mistura dos quatro deoxinucleotídeos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)

EDTA – do inglês “Ethylene diamine tetracetic acid”

FISH – do inglês “*Fluorescent in Situ Hybridization*”

HLA - do inglês “Human leukocyte antigen”

et al. – e outros

MgCl₂ – cloreto de magnésio

ng – nanogramas

p - índice de probabilidade

pb – pares de base

PCR - do inglês “Polymerase chain reaction”

RFLP- do inglês “Restriction Fragment Length Polymorphism”

TAE – tampão tris-acetato-EDTA

U – unidades

UV – ultravioleta

µL – microlitro

Lista de Figuras

Figura 1	Ciclo de vida do <i>T. gondii</i>	5
Figura 2	Mapa genético dos 14 cromossomos do <i>Toxoplasma gondii</i>	15
Figura 3	Restrição enzimática das cepas dos tipos I, II e III realizada pela enzima de restrição HhaI.....	31
Figura 4	Restrição enzimática das cepas dos tipos I, II e III realizada pela enzima de restrição Sau3AI.....	32
Figura 5	Restrição enzimática das cepas dos tipos I, II e III realizada pela enzima de restrição MseI.....	33
Figura 6	Restrição enzimática das cepas dos tipos I, II e III realizada pela enzima de restrição NciI.....	34
Figura 7	Resultado do seqüenciamento de uma amostra que apresentou “mistura” de bases em posições nucleotídicas em regiões não analisadas pelo RFLP.....	40

Lista de Tabela

Tabela 1	Iniciadores externos, gene alvo e peso molecular dos amplificados utilizados para a reação de multiplex-PCR.....	29
Tabela 2	Iniciadores internos, gene alvo e peso molecular dos amplificados utilizados para a reação de <i>nested</i> -PCR.....	30
Tabela 3	Frequência de detecção dos quatro sistemas testados no multiplex- <i>nested</i> -PCR para genotipagem de <i>T. gondii</i> em 76 amostras de líquido amniótico.....	38

Lista de Gráficos

Gráfico 1	Frequência dos genótipos do <i>T. gondii</i> em 76 amostras de líquido amniótico pela técnica de RFLP.....	38
-----------	--	----

Resumo

Souza MVB. Tipagem molecular de *Toxoplasma gondii*. Análise de líquidos amnióticos de gestações com diagnóstico de toxoplasmose congênita (dissertação). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 90p.

Toxoplasma gondii é o agente etiológico da toxoplasmose, podendo causar diferentes formas da doença, entre elas, a toxoplasmose congênita cuja frequência varia significativamente de acordo com o país estudado. Na França, foi estimada em 1-3 casos/1.000 nativos, enquanto nos EUA cerca de 1/10.000, porém não existem estimativas da prevalência de infecção congênita no Brasil. *Toxoplasma gondii* possui três linhagens clonais conhecidas como genótipos I, II e III que se relacionam aos três tipos descritos de acordo com a classificação da patogenicidade do parasita em camundongos, estando os três tipos associados a infecções humanas de maior patogenicidade, menor patogenicidade e patogenicidade intermediária, respectivamente. Os três genótipos já foram identificados na América do Norte e Europa, sendo o genótipo II predominante em infecções congênitas. O presente estudo teve como objetivo determinar a frequência dos genótipos I, II e III de *T. gondii* em 85 amostras de líquido amniótico de gestantes brasileiras com toxoplasmose confirmada e adquirida durante a gestação, todas oriundas de São Paulo. Para tal, foi utilizada a técnica de multiplex-nested-PCR-RFLP com amplificação simultânea de quatro fragmentos pertencentes a três genes do parasita: 3'-SAG2, 5'-SAG2, SAG3 e GRA6.

Das 85 amostras iniciais, 76 foram positivas pelo sistema de multiplex-*nested*-PCR (92,7%), tendo sido possível analisar o maior número de amostras no sistema que amplifica a região do gene SAG3 (69,7%), seguido do sistema 3'-SAG2 (44,7%), do sistema 5'-SAG2 (40,8%), e finalmente do sistema GRA6 (25%). Nas 76 amostras submetidas à genotipagem foram encontrados: 1,3% (1 amostra) do genótipo I; 71,1% (54 amostras) do genótipo II; 6,6% (5 amostras) do genótipo III; e 21% (16 amostras) para as quais não foi possível definir o genótipo parasitário após clivagem enzimática, tendo sido as mesmas submetidas ao sequenciamento. Das 16 amostras, duas não puderam seqüenciadas por falta de DNA remanescente e das 14 analisadas: duas foram definidas como tipo III, apresentando 100% de homologia com o protótipo VEG, e duas foram definidas como tipo II apresentando 100% de homologia com o protótipo ME49. Em 10 amostras foram observadas "misturas" de duas ou mais bases, em uma ou mais posições nucleotídicas da seqüência de DNA do fragmento amplificado, sendo identificadas como recombinantes. Além disso, seis amostras identificadas pela técnica de multiplex-*nested*-PCR-RFLP como tipo II foram selecionadas aleatoriamente para a confirmação dos resultados e, em quatro das seis amostras, foi observada "mistura" de bases em outras posições nucleotídicas do fragmento amplificado, regiões estas não analisadas pela RFLP. A técnica de multiplex-*nested*-PCR seguida de RFLP mostrou-se útil, porém apresenta limitações no que se refere à genotipagem de amostras de líquido amniótico, uma vez que, após sequenciamento, foram reveladas várias recombinações genéticas nos fragmentos amplificados que haviam

sido previamente identificados como tipo II. Sendo assim, sugerimos que, a genotipagem de *T. gondii*, diretamente de amostras biológicas ou após isolamento do parasita deva ser realizada pela amplificação de múltiplos genes de *T. gondii* e sequenciamento de todos os fragmentos amplificados.

Descritores: 1- *Toxoplasma gondii*; 2- Toxoplasmose congênita; 3- Tipagem de DNA; 4- Reação em Cadeia da Polimerase; 6- Infecção

Summary

Souza MVB. Molecular typing of *Toxoplasma gondii*. Analysis of amniotic fluid samples from pregnancies with diagnosis of congenital toxoplasmosis (dissertação). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 90p.

Toxoplasma gondii is the etiologic agent of toxoplasmosis and may cause different forms of the disease, including congenital toxoplasmosis whose frequency varies significantly according to the country. In France, it was estimated in 1-3 cases/1,000 live births, while in the U.S. it is 1/10.000. The prevalence of congenital infection in Brazil is unknown. *Toxoplasma gondii* has three clonal lineages known as genotypes I, II and III which are related to the three types described according to the pathogenicity in mice, associated with human infections of high pathogenicity, low pathogenicity and intermediate pathogenicity, respectively. The three genotypes have been identified in North America and Europe, and the genotype II is the predominant one in congenital infections. This study aimed at determining the frequency of genotypes I, II and III of *T. gondii* in 85 amniotic fluid samples from pregnant women living in Sao Paulo, Brazil who presented with seroconversion to *Toxoplasma gondii* during gestation. The multiplex-nested-PCR-RFLP was performed using four different markers: 3'-SAG2, 5'-SAG2, SAG3 and GRA6. Eighty-five samples were initially included, but only 76 were positive in the multiplex-nested-PCR (92.7%). It was possible to

examine the larger number of samples by the SAG3 gene system (69.7%), followed by 3'-SAG2 gene (44.7%), 5'-SAG2 gene (40.8%), and finally GRA6 gene (25%). From the 76 samples that were genotyped by the multiplex-nested-PCR-RFLP, 1.3% (1 sample) was genotype I; 71.1% (54 samples) were genotype II; 6,6% (5 samples) were genotype III, and 21% (16 samples) could not be identified by RFLP and were therefore sequenced. Sequencing analysis revealed: two genotype II samples, presenting with 100% of homology with the ME49 prototype, and two were genotype III showing 100% of homology with the VEG prototype. Ten samples presented with mixture of two or more nucleotide bases in one or more nucleotide positions of the total amplified DNA sequence, so they were classified as recombinant. In addition, six samples identified by the multiplex-nested-PCR-RFLP as type II were randomly selected to confirm the results, and in four of the six samples, we observed a mixture of nucleotide bases in positions that were not analyzed by the RFLP. The technique of multiplex-nested-PCR-RFLP has proved to be useful, however, it is limited when amniotic fluid samples genotyping is concerned because after sequencing, several genetic recombinations were evidenced in samples that had been previously identified as genotype II. Therefore, we suggest that the genotyping of *T. gondii*, directly from biological samples or after isolation of the parasite should be performed using different targets to amplify multiple *T. gondii* genes followed by sequencing of all amplified fragments.

Descriptors: 1. *Toxoplasma gondii* 2. Toxoplasmosis, congenital 3
Genotyping 4. Polymerase chain reaction 5. Infection

1.0 Introdução

1.1 Considerações históricas

O protozoário *Toxoplasma gondii* foi descrito pela primeira vez em 1908 por Splendore, na Faculdade de Medicina de São Paulo. Ele notificou a descoberta de um parasita, presente em formas livres e intracelulares em diversos tecidos de coelhos. Simultaneamente, no instituto Pasteur de Tunis, Nicolle e Manceaux, descreveram microrganismo similar ao descrito por Splendore, em células mononucleares de baço e fígado de um roedor norte-africano, o *Ctenodactylus gundi* (Dubey, 2008).

Em 1923, na cidade de Praga (Tchecoslováquia), Janku fez a primeira descrição de toxoplasmose congênita em lactente falecido aos 11 meses de idade com hidrocefalia e coriorretinite. Na necropsia, cortes do globo ocular direito evidenciaram a presença de parasitas na retina (Dubey, 2008).

A partir de 1937, Wolf e Cowan relataram vários casos de toxoplasmose em lactentes jovens, confirmando a ocorrência da passagem transplacentária por meio da inoculação de fragmentos da placenta em camundongos brancos de laboratório e obtendo o isolamento do *Toxoplasma* (Dubey, 2008).

Em 1939, Wolf e colaboradores realizaram a primeira transmissão experimental de toxoplasmose humana para animais, tendo ainda demonstrado, pela primeira vez, que um agente infeccioso pode produzir infecção intra-uterina (Dubey, 2008).

A partir de 1970, o ciclo biológico completo do *Toxoplasma gondii* foi descrito, definindo os felinos em geral, e não apenas o gato doméstico, como hospedeiros definitivos, e, ainda os mamíferos, aves e roedores como hospedeiros intermediários. (Frenkel, Dubey, 1970)

1.2 *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii, agente etiológico da toxoplasmose, é parasita intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, ordem Eucoccidia, família Sarcocystidae, gênero *Toxoplasma*. (Montoya e Liensenfeld, 2004).

Existem três formas biológicas de desenvolvimento do *Toxoplasma gondii*: taquizoíto (ou trofozoíto), bradizoíto e esporozoíto. Os taquizoítos são organismos de multiplicação rápida presentes durante a fase aguda da infecção, medindo de 4 a 6 μm (Montoya e Liensenfeld, 2004).

Os bradizoítos são organismos de multiplicação lenta que se localizam em número significativo (centenas a milhares) dentro de cistos do *Toxoplasma*, sendo característicos da infecção crônica, podendo medir até 20 μm . A membrana do cisto é resistente e elástica, formada por dupla membrana, sendo a externa formada de substâncias do hospedeiro, isolando os bradizoítos da ação dos mecanismos imunológicos do mesmo. Assim, os cistos persistem durante meses a anos, freqüentemente durante toda a vida do hospedeiro. (Montoya e Liensenfeld, 2004).

Os esporozoítos desenvolvem-se nos esporocistos, dentro dos

oocistos medindo de 2 por 8 μ m que são eliminados nas fezes de gatos. Por via oral, eles são altamente infectantes para aves e mamíferos, incluindo o homem. Os oocistos desenvolvem-se nos felinos durante a reprodução sexuada, com formação de gametócitos no intestino (ciclo enteroepitelial), sendo eliminados após intervalo de cerca de três semanas (Montoya e Liensenfeld, 2004).

1.3 Ciclo de vida

O ciclo de vida do *Toxoplasma gondii* prevê a alternância entre um hospedeiro intermediário (aves ou mamíferos) onde ocorre apenas a reprodução assexuada do parasita, e um hospedeiro definitivo (felinos) onde ocorrem as reproduções sexuada e assexuada. Os gatos domésticos constituem, provavelmente, a maior fonte de contaminação da doença, uma vez que a formação de oocistos ocorre com grande facilidade nos mesmos. Os gatos podem eliminar milhões de oocistos após a ingestão de apenas um bradizoíto ou de um cisto. Os oocistos são eliminados nas fezes dos gatos por curto período (uma a duas semanas), entretanto, o enorme número produzido e eliminado na natureza assegura a continuidade de transmissão da doença (Hill e Dubey, 2002).

Uma vez que o oocisto é ingerido pelo hospedeiro intermediário (incluindo o homem), ocorre liberação dos esporozoítos que invadem as células epiteliais sofrendo diferenciação para taquizoítos que, por sua vez, dividem-se rapidamente por bipartição, a cada seis horas, dentro das células

do hospedeiro, sendo responsáveis pelas manifestações clínicas da infecção, caracterizando a fase aguda (Kim e Weiss, 2008).

Após, os taquizoítos sofrem diferenciação transformando-se em bradizoítos, formas parasitárias de metabolismo mais lento que se agrupam aos milhares, envolvidos por parede rica em carboidratos dentro do vacúolo parasitário, formando o cisto. Essa diferenciação ocorre naturalmente na evolução da doença quando esta evolui da fase aguda para a fase crônica devido à atuação da resposta imune do hospedeiro. Esses cistos podem persistir indefinidamente no hospedeiro, e, anos mais tarde, em casos de comprometimento do sistema imunológico do mesmo, bradizoítos que persistiram dentro de cistos nos tecidos mais abrigados da resposta imune, tais como músculos e cérebro, podem sofrer alteração metabólica, saindo do estado latente no qual se encontravam, transformando-se em taquizoítos, provocando reativação da doença (Kim e Weiss, 2008).

Quando o oocisto é ingerido pelo hospedeiro definitivo (felino), sua parede é desintegrada no estômago e intestino delgado por enzimas proteolíticas liberando os esporozoítos. Esses, 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). O ciclo enteroepitelial da reprodução sexuada origina esquizontes que liberam merozoítos, que por sua vez formam os gametas, masculino e feminino. Após a fecundação dos gametas, há formação do zigoto (gametogônia) que dará origem ao oocisto (Hill et al., 2005).

Os gatos eliminam oocistos imaturos após a ingestão de qualquer

uma das três formas parasitárias (taquizoíto, bradizoíto ou esporozoíto), que, por sua vez, esporulam no meio ambiente após um a 21 dias, podendo sobreviver por meses, ou até anos em ambientes com condições de temperatura e umidade favoráveis (Hill et al., 2005). A figura 1 demonstra, resumidamente, esse ciclo.

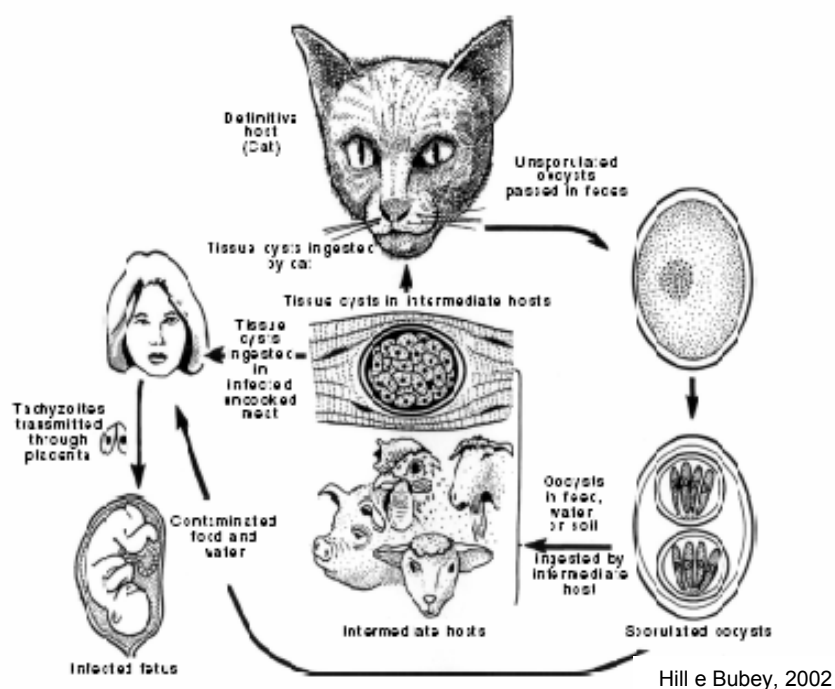


Figura 1. Ciclo de vida do *T. gondii*

1.4 Transmissão

Os humanos podem adquirir a infecção pela ingestão de carnes cruas ou mal cozidas contendo cistos, pela ingestão de água ou comida contaminada com oocistos eliminados nas fezes de gatos infectados (Kim e Weiss, 2008; Hill et al., 2005). A doença também pode ser transmitida por

órgãos transplantados contendo parasitas (principalmente coração, rins e medula óssea), pela amamentação (durante a fase aguda da infecção), por transfusão sanguínea, além da transmissão que ocorre por via placentária da gestante ao feto (Hill et al., 2005).

A toxoplasmose costuma apresentar evolução benigna, com exceção feita a primo-infecção materna que ocorre na primeira metade da gestação, com transmissão ao feto, ou ainda, a doença em pacientes imunocomprometidos, tais como portadores de neoplasias, receptores de órgãos e pacientes com imunodeficiências primárias ou secundárias, tais como portadores do HIV (Remington et al., 2001).

1.5 Formas da doença

1.5.1 Infecção congênita

Após a primo-infecção materna, o parasita entra na circulação fetal pela placenta (Montoya e Liensfeld, 2004). Devido a características anatômicas do órgão, a chance de transmissão do parasita via placentária (em gestantes não tratadas), é menor no primeiro trimestre (cerca de 20%), aumentando paulatinamente no segundo trimestre devido a aumento da permeabilidade da placenta (40%), atingindo níveis máximos no terceiro trimestre (50-80%). No entanto, as repercussões fetais são menos graves quando a transmissão ocorre no terceiro trimestre (icterícia, hepato-esplenomegalia), em relação àquelas que atingem o feto em formação (óbito

fetal, aborto espontâneo, coriorretinite, calcificações cerebrais, hidrocefalia, microcefalia). Felizmente, na maior parte dos casos de toxoplasmose congênita (75 a 85% dos casos), os recém-nascidos são assintomáticos (Remington et al., 2001).

Atualmente, estima-se que o *T. gondii* já tenha infectado 1/3 da população mundial (Kim e Weiss, 2008). A frequência de toxoplasmose congênita varia significativamente de acordo com o país estudado. Na França, foi estimada em 1-3 casos/1.000 nativos, enquanto nos EUA cerca de 1/10.000 (Remington et al., 2001), porém não existem estimativas da prevalência de infecção congênita no Brasil. Em nosso meio, os dados são escassos, e indicam frequência de soroconversão para *T. gondii* em gestantes da ordem de 0,5 a 1,0% (Guimarães et al., 1993). Porém, há diversos estudos sobre a soroprevalência materna em diferentes estados do Brasil, e eles indicam que há frequência de 59,8% em Porto Alegre - RS (Varella et al., 2003), de 76,1% Manaus - AM (Cavalcante et al., 2006), 75,1% no Rio Janeiro – RJ (Ribeiro et al., 2008), de 54,2% em Cascavel – PR (Mioranza et al., 2008) e de 66,3% em Natal - RN (Barbosa et al., 2009).

1.5.2 Infecção em pacientes imunocompetentes

A infecção primária por *T. gondii* em crianças e adultos (incluindo mulheres grávidas) é assintomática na maioria dos pacientes. Em cerca de 10%, ela causa doença auto limitada, com sintomatologia inespecífica. As manifestações clínicas mais comuns são febre e linfadenopatia cervical ou

occipital, fazendo parte das síndromes mononucleose-símile, sendo incomum que pacientes imunocompetentes apresentem miocardite, polimiosite, pneumonite, hepatite ou encefalite (Montoya e Liensenfeld, 2004). A toxoplasmose é sempre tratada em crianças, e em adultos, apenas quando acomete olhos ou sistema nervoso central.

1.5.3 Infecção em pacientes imunocomprometidos

Em pacientes imunocomprometidos tais como os portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), notadamente naqueles com número de linfócitos CD4 muito baixo, a toxoplasmose é uma das infecções oportunistas que podem ocorrer, afetando especialmente o sistema nervoso central (encefalite toxoplásmica), na maioria dos casos resultante não de primo-infecção, mas de reativação de infecção crônica (Habegger de Sorrentino et al., 2005; Montoya e Liensenfeld, 2004).

As manifestações clínicas incluem rebaixamento do nível de consciência, dificuldades motoras, paralisia de nervos cranianos, anormalidades sensoriais, sinais cerebelares e alterações comportamentais que podem ser confundidas com sintomas psiquiátricos. A encefalite toxoplásmica é a maior causa de morbimortalidade neste grupo de pacientes (Habegger de Sorrentino et al., 2005; Montoya e Liensenfeld, 2004).

1.5.4 Doença ocular

A infecção ocular pode fazer parte do quadro de infecção congênita, ou ocorrer em infecção adquirida pós-natal, tanto em infecções agudas quanto em episódios de reativação da doença. Neste último caso, os parasitas permanecem sob forma latente durante anos, provocando lesões retinianas detectadas na segunda ou terceira décadas de vida (Boothroyd e Grigg, 2002).

As alterações típicas da toxoplasmose ocular incluem presença de lesão esbranquiçada focal com intenso processo inflamatório no vítreo. A clássica “aparência de neblina” é atribuída à presença de lesões ativas na retina acompanhadas de reação inflamatória grave (Montoya e Liensiefeld, 2004).

1.6 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial da toxoplasmose é baseado na identificação de anticorpos especificamente dirigidos contra antígenos do parasita, principalmente das classes IgG e IgM. Desde que os primeiros testes sorológicos foram desenvolvidos, a P30, proteína mais abundante da superfície dos taquizoítos e codificada pelo gene SAG1 têm sido a mais utilizada nos diversos kits comerciais existentes no mercado (Velge-Roussel et al., 1994; Seng et al., 2000; Remington et al., 2004)

Os testes sorológicos de triagem são realizados com método

automatizado, geralmente imunoenzimático ou luminescente, seguido de confirmação por imunofluorescência, testes de captura de anticorpos IgM ou teste de avidéz de anticorpos IgG, na dependência da experiência de cada laboratório (Wallon et al., 1999; Tuuminen et al., 1999; Aubert et al., 2000; Marcolino et al., 2000; Remington et al., 2004). Entretanto, o teste sorológico de referência continua sendo, até hoje, a reação de Sabin-Feldman (“dye-test” ou teste do corante), muito embora seja extremamente trabalhosa, requerendo a manutenção de taquizoítos vivos, além de biólogos experientes para a leitura dos resultados (Remington et al., 2001).

Quando o diagnóstico da toxoplasmose congênita tiver que ser definido com base em dados sorológicos, muitas vezes é necessário analisar ao menos duas amostras de soro de gestantes coletadas com intervalo de duas a três semanas e, ao nascimento, os títulos de anticorpos da mãe e do recém-nascido (RN) devem ser comparados, além do acompanhamento clínico, oftalmológico, ultrassonográfico e sorológico da criança por tempo mínimo de 12 meses (Remington et al., 2001). Além disso, as gestantes também devem realizar acompanhamento ultrassonográfico para avaliação do feto, com especial ênfase na medida dos ventrículos laterais do cérebro fetal, e ainda detecção de hepatomegalia, esplenomegalia, calcificações cerebrais, além de alterações placentárias.

Devido aos inconvenientes causados pela necessidade de período prolongado de acompanhamento da criança, à toxicidade do tratamento anti-*Toxoplasma*, e ainda, devido à maior sensibilidade e especificidade da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em relação aos métodos

convencionais de diagnóstico, a PCR é considerada o teste de referência (*gold standard*) para o diagnóstico da toxoplasmose congênita desde a década de 1990, devendo ser realizada preferencialmente em líquido amniótico e, eventualmente, em sangue fetal (Foulon et al., 1990; Grover et al., 1990; Hohlfeld et al., 1994; Foulon et al., 1999 a; Robert-Gangeux et al., 1999; Foulon et al., 1999 b).

Além das vantagens em termos de sensibilidade e especificidade, a PCR apresenta vantagens por ser mais rápida e versátil, podendo ser realizada com qualquer tipo de material biológico, requerendo ínfimas quantidades de amostra, o que é extremamente importante para fetos e recém-nascidos, não dependendo da capacidade imunológica do paciente (Foulon et al., 1990; Grover et al., 1990; Hohlfeld et al., 1994; Foulon et al., 1999 a; Robert-Gangeux et al., 1999; Foulon et al., 1999 b). No entanto, existem desvantagens devido ao custo elevado, pequeno número de laboratórios públicos aptos à realização dos testes e falta de padronização das amplificações, dificultando a comparação de resultados (Pelloux et al., 1997).

Existindo presunção clínica e laboratorial de infecção materna pelo *T. gondii*, a gestante passará a receber tratamento com espiramicina até a 18ª semana de gestação, podendo ou não ser trocada para sulfadiazina e pirimetamina, além de suplementação semanal com ácido fólico, até o final da gestação (Montoya e Remington, 2008). Entretanto, sabe-se que os fármacos usados no tratamento da toxoplasmose possuem eficácia contra taquizoítos, sendo muito menos ativos contra as formas císticas do parasita,

não existindo até o presente medicamento capaz de erradicar as formas císticas (Montoya e Remington, 2008).

1.7 Classificação das cepas

As cepas de *T. gondii* são ainda hoje classificadas de forma arbitrária, de acordo com a patogenicidade em camundongos brancos de laboratório do tipo “Swiss”, em três tipos (Reikvam et al., 1976; Derouin et al., 1992; Frenkel et al., 1997; Dubey et al., 1998; Remington et al., 2001; Grigg et al., 2001a; Sibley, 2003):

- patogênicas, são aquelas que provocam a morte de camundongos, com formação de ascite contendo taquizoítos em período de 5 a 10 dias, chamadas de tipo I, cujo protótipo é a cepa RH.

- cistogênicas, são as que 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 o *T. gondii*, chamadas de tipo II, cujo protótipo é a cepa ME49.

- de patogenicidade intermediária são aquelas que, após várias passagens *in vivo* (camundongos) ou *in vitro*, reduzem o tempo de vida de camundongos brancos, que se tornam soropositivos para o *T. gondii*, chamadas de tipo III, cujo protótipo é a cepa VEG. Os animais podem apresentar quadro neurológico alguns meses após a infecção experimental.

Por vezes, é possível detectar ascite discreta com alguns taquizoítos, e cistos pouco numerosos no cérebro.

É bem conhecido o fato de uma mesma cepa se comportar de forma diferente dependendo das condições imunológicas do hospedeiro. A mesma cepa patogênica de *T. gondii* que mata o camundongo “Swiss” em alguns dias pode induzir infecção crônica com formação de cistos de *T. gondii* no cérebro do mesmo camundongo, caso o animal seja previamente tratado com sulfadiazina. Ao contrário, uma cepa pouco patogênica de *T. gondii* que induz a formação de cistos no cérebro do camundongo, pode ter seu comportamento totalmente modificado caso o animal se torne imunodeficiente, por exemplo, devido a injeções de cortisona ou ciclosporina. Neste caso, a cepa passaria a apresentar patogenicidade aumentada, matando o animal em poucos dias, com o desenvolvimento de ascite repleta de taquizoítos (Frenkel et al., 1997).

A cepa mais famosa de *T. gondii*, a RH, isolada em 1939, ilustra bem o quanto manipulações realizadas em laboratório podem modificar a patogenicidade das cepas de *T. gondii*. A cepa RH foi isolada sob a forma de cistos (contendo bradizoítos), do cérebro de um recém-nascido com toxoplasmose congênita grave, apresentando lesões cerebrais, que acabou sucumbindo à doença. Por ser cistogênica, foi inicialmente classificada como pouco patogênica. No entanto, após inúmeras passagens em culturas de células, verificou-se que a cepa RH havia perdido a capacidade de formar cistos e também oocistos em gatos (gametogênese). Ademais, havia se transformado em “virulenta” para camundongos brancos de laboratório,

ocasionando a morte dos animais com presença de taquizoítos em abundância na cavidade peritoneal. Desde então a cepa RH tem sido mantida em laboratório, e utilizada como cepa de referência do tipo I, ou seja, de maior patogenicidade (Guo et al., 1997; Grigg et al., 2001 b; Grigg et al., 2001 c; Ajzenberg et al., 2005).

1.8 Características moleculares do *T. gondii*

O genoma haplóide de *T. gondii* contém 8×10^7 pares de bases, exceto durante a divisão sexual que ocorre no intestino delgado de felinos (Montoya e Liensenfeld, 2004).

Toxoplasma gondii possui três linhagens clonais conhecidas como genótipos I, II e III que se relacionam aos três tipos descritos de acordo com a classificação em camundongos, associados a infecções humanas de maior patogenicidade, menor patogenicidade e patogenicidade intermediária, respectivamente. Os três genótipos já foram identificados repetidas vezes na América do Norte e Europa (Dardé et al., 1992; Howe et al., 1995), sendo o genótipo II (menor patogenicidade) predominante em infecções congênitas (Nowakowska et al, 2006), muito embora as infecções congênitas possam acometer gravemente fetos e recém-nascidos.

Estudos sobre polimorfismos genéticos de *T. gondii* utilizando inúmeros genes e diferentes loci, revelaram que as cepas e isolados de *T. gondii* de maior patogenicidade são todas oriundas de um único clone

ancestral, e que desde então, poucas recombinações genéticas ocorreram (Sibley e Boothroyd, 1992; Grigg et al., 2001 b).

Em 1992, Sibley & Boothroyd utilizaram cruzamentos entre cepas de *T. gondii* do tipo II e tipo III para definir o mapa genômico para *T. gondii*, constituído por 11 cromossomos, porém mais recentemente, Khan e colaboradores (2005) utilizando 250 marcadores genéticos e realizando recombinações entre as cepas dos tipos II e III, e dos tipos I e III, definiram um novo mapa genômico constituído por 14 cromossomos (figura 2). Atualmente, acredita-se que menos de 5% dos isolados de *T. gondii* apresente mistura dos padrões de alelos que caracterizam os três genótipos, portanto as recombinações parecem não ser freqüentes (Sibley e Boothroyd, 1992; Khan et al., 2007).

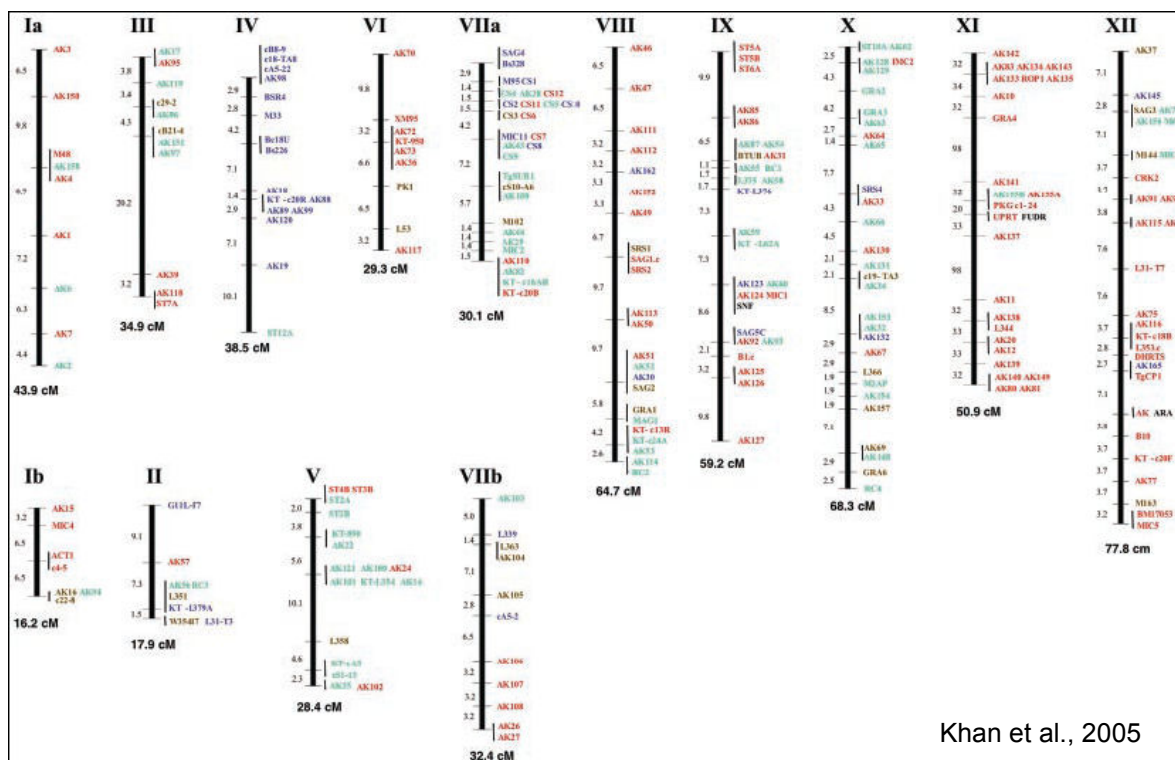


Figura 2. Mapa genético dos 14 cromossomos do *Toxoplasma gondii*.

1.9 Métodos de Tipagem

Qualquer método de identificação molecular deve permitir a diferenciação correta de espécies e subtipos e, principalmente, deve apresentar elevada reprodutibilidade. Assim, a escolha do método a ser aplicado deve ser feita de acordo com a finalidade pretendida (p.ex. identificação, diferenciação), entre outros aspectos (reprodutibilidade, poder discriminatório, custos envolvidos etc). (Chen et al., 2002; Hsu et al., 2003).

Um dos métodos de tipagem mais utilizado é a Análise de Restrição de Fragmentos Polimórficos (*Restriction Fragment Length Polymorphism* ou RFLP). Esse método é baseado na clivagem enzimática do DNA com endonucleases de restrição. As enzimas ou endonucleases de restrição são classificadas de acordo com a estrutura, atividade e sítios de reconhecimento e clivagem de DNA. O sítio de reconhecimento é normalmente uma seqüência palindrômica, isto é, possui um eixo de simetria onde a seqüência de bases da fita “sense” do DNA é a complementar na fita “anti-sense”. Sendo assim, o método consiste em clivar o DNA em pontos específicos, gerando fragmentos de pesos moleculares diferentes, permitindo a caracterização e diferenciação dos tipos de cepas (Howe et al., 1997; Khan et al., 2005; Grigg et al., 2001b).

Os primeiros estudos sobre o polimorfismo de cepas de *T. gondii* foram relatados por Dardé et al. (1988) que analisaram isoenzimas parasitárias por meio da técnica de isoeletrofocalização, estabelecendo vários zimodemos (nome dado ao perfil de bandas obtido para cada cepa

parasitária de acordo com a isoenzima analisada). A seguir, com o advento das primeiras técnicas para análise de DNA, as diferentes cepas de *T. gondii* foram cultivadas em animais de laboratório para a obtenção de quantidades significativas de DNA parasitário (da ordem de microgramas), necessárias à realização da análise genômica das cepas por meio da técnica de RFLP. Desta forma, Cristina et al., 1991a e Cristina et al., 1991b estabeleceram a existência de inúmeros esquizodemos do parasita (nome dado ao perfil de bandas obtido para cada cepa parasitária após clivagem do DNA genômico parasitário com enzimas de restrição). A análise crítica dos diferentes zimodemos e esquizodemos revelou intenso polimorfismo entre cepas de *T. gondii*, sem, no entanto, evidenciar relação entre os perfis obtidos e a patogenicidade das mesmas. Todavia, estes estudos apontaram a existência de maior polimorfismo entre cepas de menor patogenicidade, e maior uniformidade entre cepas mais “virulentas”, o que foi, a seguir, corroborado pelo trabalho de Sibley e Boothroyd (1992) que relataram serem as cepas patogênicas de *T. gondii* oriundas de um mesmo clone ancestral.

Inúmeros marcadores moleculares têm sido utilizados para realizar a diferenciação das cepas de *T. gondii* pela amplificação de regiões específicas do parasita. 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);

- gene GRA6, localizado no cromossomo X, que codifica proteínas de grânulo denso, importantes para a estrutura da membrana do vacúolo parasitóforo e para o recrutamento de nutrientes, além do desenvolvimento do parasita durante todos os estágios do seu ciclo de vida (Craver e Knoll, 2007).

2.1 Justificativa

Tendo em vista que:

- *Toxoplasma gondii* apresenta três genótipos (I, II e III) bem caracterizados, além de alguns poucos genótipos recombinantes (mais raros), relacionados tanto a infecções humanas quanto a infecções em animais;

- os genótipos parecem estar relacionados à gravidade da doença, e possivelmente ao sucesso do tratamento antiparasitário;

- existem diferenças entre genótipos de *T. gondii* predominantes na Europa e EUA em relação à América do Sul nos casos de toxoplasmose ocular e em pacientes HIV positivos, tendo sido observada maior taxa de recombinação e de cepas atípicas em nosso meio;

- a infecção congênita está relacionada predominantemente ao genótipo II nos EUA e Europa. O genótipo II foi encontrado recentemente no Brasil, porém em animais, não em seres humanos, e não foi descrito no modelo de infecção congênita.

Pareceu-nos oportuno realizar a genotipagem de *T. gondii* diretamente de amostras de líquido amniótico de gestantes com diagnóstico de toxoplasmose.

2.2 Objetivos

Determinar a frequência dos genótipos I, II e III de *T. gondii* em amostras de líquido amniótico de gestantes brasileiras, todas oriundas de São Paulo, com diagnóstico de toxoplasmose congênita.

3.0 Casuística e Métodos

3.1 Casuística

Foram analisadas 85 amostras de líquido amniótico de gestantes com triagem sorológica positiva (presença de IgM e IgG anti-*Toxoplasma*), e detecção de DNA de *T. gondii* por PCR realizada no Laboratório de Investigação Médica em Pediatria Clínica (LIM36) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. As amostras foram recebidas e armazenadas no período de janeiro de 2003 a janeiro de 2006 (aprovação da CAPPesq, protocolo de número 0326/07, seção de apêndices). Coordenadora da pesquisa financiada no âmbito do processo 471985/2008-2, edital MCT/CNPq 14/2008, Universal, faixa A.

Essas amostras de líquido amniótico já haviam sido submetidas à extração de DNA para a amplificação com finalidade diagnóstica, e foram armazenadas em freezer -86° C até o momento do uso para a presente pesquisa.

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, finalmente, os testes moleculares.

3.1.1 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 quimioluminescência). Os testes foram confirmados por imunofluorescência indireta para IgG e IgM (em alguns casos por testes de captura de IgM ou avidéz de anticorpos IgG). 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.

3.1.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo os líquidos amnióticos de fetos apresentando cariótipo alterado, anormalidades detectadas por FISH (*Fluorescent in Situ Hybridization*), 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 com volume insuficiente para a realização de todas as amplificações, e também as amostras contendo mecônio ou sangue (que poderia ser materno).

3.2 Métodos

3.2.1 Medidas para minimizar os riscos de contaminação das ampliações

O LIM/36 é um laboratório dedicado ao desenvolvimento de métodos moleculares. Trata-se de estrutura física de 450 m² com áreas destinadas à ampliação separadas em três salas (com sistema de ar condicionado exclusivo para cada sala), discriminadas a seguir:

- **reagentes:** aventais, luvas, fluxos laminares, micropipetas, ponteiras com filtro (barreira anti-aerosol), estantes, geladeiras, congeladores, centrífugas, fonte de água ultrapura, todos os itens específicos desta sala.

- **extração:** também conta com materiais de consumo, micropipetas, ponteiras com filtro, equipamentos, aventais, todos os itens específicos desta sala.

- **amplificação:** compreende uma ante-sala onde ficam os aventais da área, e duas salas nas quais são realizadas as ampliações e detecções por meio de eletroforese horizontal ou vertical, refrigerada ou não, além da foto-documentação. Os materiais de consumo, centrífugas, congeladores, geladeiras, termocicladores, cubas de eletroforese e outros equipamentos são todos específicos desta sala.

O fluxo de entrada e saída das salas é controlado de maneira a fazer com que os biólogos iniciem o dia pela área de reagentes, a seguir passem para a área de extração e apenas ao final para a sala de

amplificação. Normalmente, como contamos com vários profissionais, os protocolos a serem desenvolvidos no dia são previamente combinados e os biólogos se dividem nas três áreas. Desta forma, minimizamos ainda mais os riscos de contaminação.

Os profissionais que atuam na execução dos testes receberam treinamento específico para trabalhar com técnicas moleculares. Em todos os testes empregamos uma série de controles negativos e controlamos de maneira bastante rigorosa o uso de controles positivos. Além disso, todo material descartável é “DNase e RNase – free”, não havendo reaproveitamento de qualquer um deles, e os reagentes são divididos em alíquotas para evitarmos ciclos de congelamento e descongelamento.

3.2.2 Controle dos riscos ambientais

As amostras de material biológico potencialmente infectantes são manipuladas em ambiente controlado, dentro de capelas de fluxo laminar. Na etapa de detecção do material amplificado que inclui a manipulação de géis de agarose corados com brometo de etídeo (substância cancerígena), os profissionais utilizam luvas, e a seguir realizam protocolo específico para inativação da substância antes de seu descarte. Com relação à exposição à luz ultravioleta, o sistema de foto-documentação atualmente utilizado dispensa o uso de óculos de proteção e capacetes.

3.2.3 Extração de DNA das amostras de líquido amniótico

As extrações de DNA a partir de líquido amniótico foram realizadas de acordo com o protocolo descrito por Miller et al. (1988), adaptado em nosso laboratório. Resumidamente, o procedimento consistiu em descongelar as amostras que estavam em tubo do tipo Falcon de 15mL, que foram centrifugadas a 2.000 X g por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo Falcon, deixando-se no fundo do tubo volume remanescente de 1mL contendo o sedimento (precipitado de células do líquido amniótico), sendo o restante do sobrenadante armazenado novamente em congelador - 86°C.

O sedimento foi dividido em dois tubos do tipo eppendorf de 1,5 mL (volume de 500µL em cada). A seguir, a amostra foi homogeneizada com 500µL de solução de lise nuclear (Tris-HCl 100mM, NaCl 4M, EDTA 20mM), sob agitação, permanecendo a seguir em banho-maria a 65°C por 15 minutos.

Na próxima etapa, foram adicionados 20µL de proteinase K a 20mg/mL (QIAGEN) e 100µL de SDS 10% (Merck) e as amostras foram homogeneizadas por inversão e, a seguir, incubadas durante a noite a 37°C (a solução deveria apresentar aparência clara e viscosa), sendo adicionados 200µL de NaCl 6M, com agitação vigorosa das amostras por 15 segundos (a solução deveria ficar leitosa), com centrifugação a 8.400 X g por 10 minutos.

Os sobrenadantes foram transferidos para outros microtubos eppendorf e foi adicionado isopropanol (Merck) no mesmo volume das

amostras para precipitar o DNA. As amostras foram então colocadas em freezer -20°C durante a noite. No dia seguinte, foram centrifugadas a 17.900 X g por 20 minutos, em centrífuga refrigerada, sendo o sobrenadante descartado. Ao sedimento (precipitado de DNA) foram adicionados 500µL de etanol a 70°GL (Merck) para promover re-hidratação do DNA. As amostras foram centrifugadas novamente a 17.900 X g por 5 minutos, os sobrenadantes foram descartados e o DNA foi re-suspenso em volumes variando de 50µL a 100µL de solução de Tris-EDTA 1M, dependendo do tamanho aparente do precipitado (*pellet* de DNA), sendo as concentrações de DNA posteriormente estimadas por espectrofotometria UV (Nanodrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific).

3.2.4 Extração de DNA das cepas de *Toxoplasma gondii*

As cepas de referência foram gentilmente cedidas pelo laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMT-SP). Foram elas: cepa RH (protótipo do genótipo I), ME49 (protótipo do genótipo II) e VEG (protótipo do genótipo III).

O DNA das cepas foi extraído de acordo com o protocolo descrito por Ferrie et al. (1992) para amostras de sangue total, e adaptado em nosso laboratório para a extração a partir de cultura de células. O procedimento consistiu em transferir 500µL do meio de cultura contendo *Toxoplasma gondii* para um tubo do tipo eppendorf e centrifugar a amostra a 17.900 X g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado duas

vezes em solução de Tris-EDTA (1M) para que o excesso do meio de cultura fosse retirado. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 13.000 X g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado, e foram adicionados 200 μ L de solução de NaOH (50mM). A amostra foi incubada a 100°C, em banho-maria seco, por 10 minutos. Posteriormente, foi centrifugada a 17.900g por 20 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo do tipo eppendorf e foram adicionados 40 μ L de solução de Tris-EDTA (1M), sendo o DNA quantificado por espectrofotometria UV (Nanodrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific).

3.2.5 Amplificação das amostras pelo PCR universal

Após a extração de DNA das amostras, estas foram testadas pelo PCR chamado de universal, pois utilizou gene constitutivo humano, ou seja, o gene que codifica a β - actina humana. Conseqüentemente, a amplificação teria que ser positiva em todas as amostras. Foram utilizados 0,4 uM dos iniciadores $\beta 1$ (5'-GTGGGCGCCCCAGGCACCA-3') e $\beta 2$ (5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATT TC-3'), sintetizados pela IDT,USA, e descritos por Nakajima-Iujima et al., 1985, que amplificam a seqüência de 515 pares de bases. Essa amplificação foi utilizada para verificar a qualidade das amostras de DNA extraídas e assegurar a inexistência de substâncias capazes de inibir a amplificação.

As amplificações consistiram em um ciclo de desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto,

hibridização (*annealing*) a 45°C por 1 minuto, e extensão a 72°C por 1 minuto, seguidos de uma etapa de extensão final a 72°C por 5 minutos.

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 (Vilber, France) e fotografados.

3.2.6 Multiplex-nested-PCR para genotipagem do *T. gondii*

1ª Etapa - Reação de Multiplex

Na reação de multiplex foram utilizados quatro pares de iniciadores na mesma reação (Tabela 1), composta por: tampão [1x] (GE Healthcare), 200 µM de cada dNTP (GE Healthcare), 0,4 uM de cada iniciador (IDT, USA), 1,5U da enzima Taq DNA Polimerase (GE Healthcare) e água para completar o volume total de 30 µL. A mistura foi distribuída em tubos de 0,2 mL previamente identificados, onde foram aplicados 100 nanogramas do DNA das amostras de líquido amniótico ou 30 nanogramas do DNA das cepas de *T. gondii* dos genótipos I, II e III, utilizadas como controles positivos da reação.

As amplificações foram realizadas em termociclador (Biometra), nas seguintes condições: uma etapa de desnaturação inicial de 95°C por 5

minutos, seguida de 40 ciclos de 95°C por 20 segundos (desnaturação), 52°C por 20 segundos (“*annealing*”), e 72°C por 20 segundos (extensão), finalizando com uma etapa de extensão final de 72°C por 5 minutos.

Posteriormente, 20 microlitros dos amplificados das amostras e um microlitro dos amplificados dos controles positivos foram transferidos para a 2ª etapa de amplificação (*nested-PCR*).

Tabela 1 – Iniciadores externos, gene alvo e peso molecular dos amplificados utilizados para a reação de multiplex-PCR

Gene alvo	Iniciadores externos (multiplex)	Amplicon (pb)	Referência
5'-SAG2 (VIII)	SAG2.F4 (GCTACCTCGAACAGGAACAC)	340pb*	Howe et al., 1997
	SAG2.R4 (GCATCAACAGTCTTCGTTGC)		
3'-SAG2 (VIII)	SAG2.F3 (TCTGTTCTCCGAAGTGACTCC)	340pb*	Howe et al., 1997
	SAG.R3 (TCAAAGCGTGCAATTATCGC)		
GRA6 (XI)	GRA6 F1x (ATTTGTGTTTCCGAGCAGGT)	340pb*	Khan et al. 2005
	GRA6 R1 (GCACCTTCGCTTGTGGTT)		
SAG3 (XII)	P43S1 (CAACTCTCACCATTCCACCC)	340pb*	Grigg et al. 2001b
	P43AS1 (GCGCGTTGTTAGACAAGACA)		

* 540pb Somente na cepa do tipo I pb – pares de bases

2ª Etapa - reação de *nested-PCR*

Cada uma das quatro amplificações (5'-SAG2, 3'-SAG2, SAG3 e GRA6) foi realizada com solução de reagentes composta por: tampão 1x (GE Healthcare), 200µM de cada dNTP (GE Healthcare), 0,4µM de cada iniciador (IDT, USA) (Tabela 2), 1,5U da enzima Taq DNA Polimerase (GE Healthcare) e água estéril para completar volume final de 30µL. A mistura foi

distribuída em tubos de 0,2 mL previamente identificados.

As reações foram realizadas em termociclador (Biometra), nas seguintes condições: um ciclo inicial de 95°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 20 segundos (desnaturação), 55°C por 20 segundos (hibridização dos iniciadores), 72°C por 20 segundos (extensão), e um ciclo de extensão final de 72°C por 5 minutos.

Posteriormente, 10µL dos amplificados foram aplicados em gel de agarose a 02% (Invitrogen) preparado em tampão TAE (Tris-acetato-EDTA 1M), e foram submetidos à eletroforese (80 Volts por 30 minutos). O gel foi corado com brometo de etídio a 0,5µg/ml (Plusone) e as bandas visualizadas em luz ultravioleta no equipamento de foto-documentação (Vilber, France) e fotografadas.

As amostras que foram amplificadas no sistema multiplex *nested*-PCR foram submetidas a genotipagem por meio de restrições enzimáticas.

Tabela 2 – Iniciadores internos, gene alvo e peso molecular dos amplificados utilizados para a reação de *nested*-PCR

Gene alvo	Iniciadores internos (<i>nested</i> -PCR)	Amplicon (pb)	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., 2005
SAG3 (XII)	P43AS2 (CACAAGGAGACCGAGAAGGA) P43S2 (TCTTGTCGGGTGTTCACTCA)	311pb	Grigg et al. 2001b

pb – pares de bases

3.2.7 Restrição Enzimática (RFLP)

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

- HhaI 05U/uL (Biolabs) que cliva a seqüência de DNA correspondendo a GCG↓C /C↑GCG somente no tipo II, gerando 2 fragmentos de 53bp e 169bp. (Figura 3)

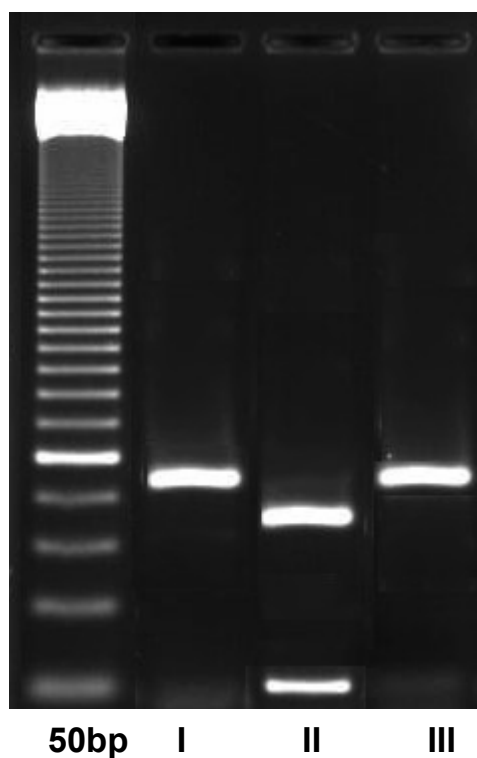


Figura 3: Restrição enzimática das cepas dos tipos I, II e III realizada pela enzima de restrição Hha I

- Sau3AI 05 U/uL (Biolabs) que cliva a sequência de DNA correspondendo a ↓GATC /CTAG↑ somente do tipo III, gerando 2 fragmentos de 56bp e 186bp. (Figura 4)

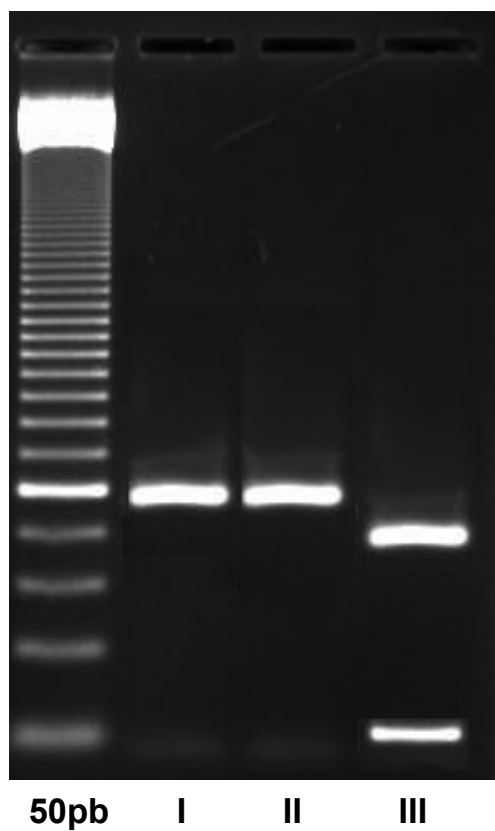


Figura 4: Restrição enzimática das cepas dos tipos I, II e III realizada pela enzima de restrição Sau3AI

- MseI 05 U/uL (Biolabs) 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. (Figura 5).

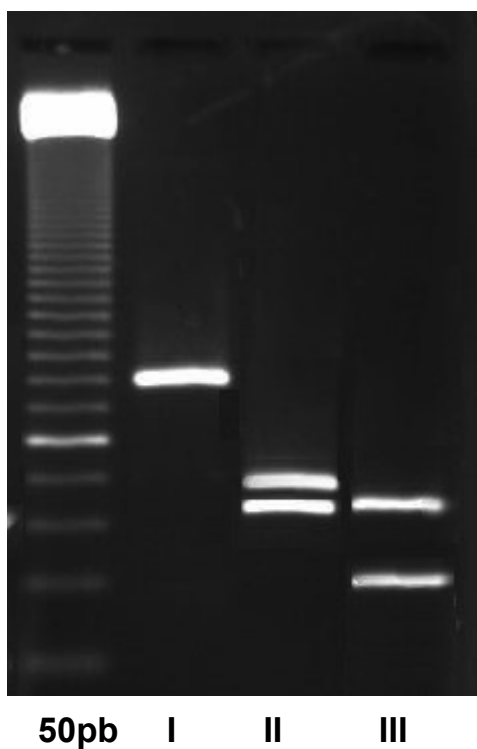


Figura 5: Restrição enzimática das cepas dos tipos I, II e III realizada pela enzima de restrição MseI

- Ncil 05 U/uL (Biolabs) 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. (Figura 6)

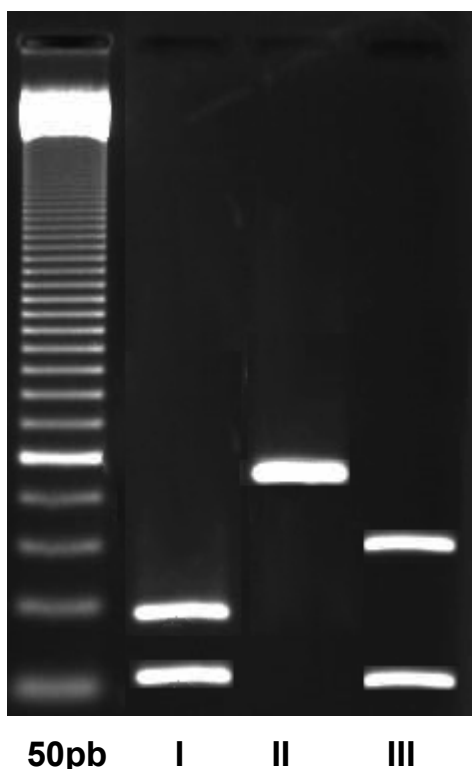


Figura 6: Restrição enzimática das cepas dos tipos I, II e III realizada pela enzima de restrição Ncil

Para tal, foi preparada reação com volume de 5uL contendo a enzima e seu tampão, aos quais foram adicionados 20uL do amplificado para serem clivados em temperatura constante de 37° durante 3 horas. Todo o volume dos produtos de digestão foi aplicado em gel de agarose a 02% (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 (Plusone), as bandas foram visualizadas em luz ultravioleta no equipamento de foto-documentação (Vilber, France) e fotografadas.

3.2.8 Sequenciamento automático de DNA

As amostras que não puderam ser genotipadas pelo sistema de multiplex-*nested*-PCR-RFLP foram submetidas ao sequenciamento automático de DNA. Para tal, foi realizada purificação dos amplificadores com o kit QIAquick® PCR *Purification* (QIAGEN) para retirada de resíduos de sais e produtos não incorporados durante a reação de PCR. A determinação aproximada da concentração de DNA no produto de PCR foi realizada com auxílio do reagente *LowDNA Mass Ladder* (Invitrogen, USA). A seguir, foi feita análise comparativa da intensidade da banda (fragmento amplificado) das amostras com cada uma das bandas do padrão *LowDNA Mass Ladder*.

A reação de sequenciamento foi realizada 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*; 5µM de cada primer. A reação foi realizada no termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems) e apresentou as seguintes condições: 25 ciclos de 95°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos, 60°C por 2 minutos.

Para retirada de produtos não incorporados durante a reação de sequenciamento foi realizada precipitação do DNA utilizando o reagente

BigDye® XTerminator™ Purification kit (Applied Biosystems) seguindo as instruções descritas pelo fabricante, e o sequenciamento de DNA foi realizado na plataforma 3730 DNA Analyzer (*Applied Biosystems*).

Foi realizada análise das seqüências com auxílio do software *SeqScape v2.6 (Applied Biosystems)*. Após a edição, a seqüência foi submetida à análise comparativa no *site* do NCBI utilizando a ferramenta *BLAST*, que permitiu a identificação dos genótipos parasitários de acordo com o escore de homologia em relação às cepas de referência (protótipos).

3.3 Análise Estatística

Foi realizada a análise de freqüência dos três genótipos de *Toxoplasma gondii* em relação ao total de amostras estudadas. A comparação entre os quatro sistemas de amplificação utilizados para a genotipagem de *T. gondii* foi realizada por meio do teste χ^2 com a correção de Yates, ou teste de probabilidade de Fisher, quando apropriado (número de casos ≤ 5). Foram considerados significantes valores de $p < 0,05$.

4.0 Resultados

Oitenta e cinco amostras de líquido amniótico foram inicialmente incluídas neste estudo. Dessas, três não amplificaram no PCR universal, sendo conseqüentemente excluídas. Das 82 restantes, 76 foram positivas pelo sistema de multiplex-*nested*-PCR (92,7%). Houveram seis amostras de DNA de líquido amniótico que não produziram amplificação com nenhum dos sistemas utilizados (7,3%), muito embora tenham amplificado no PCR universal e no PCR com finalidade diagnóstica cujo gene alvo é o B1 de *T. gondii*.

4.1 Multiplex-*nested*-PCR-RFLP

Os quatro sistemas de amplificação padronizados para o multiplex-*nested*-PCR apresentaram desempenhos diferentes. O sistema no qual foi possível analisar o maior número de amostras foi o que amplifica região do gene SAG3 (69,7%), seguido do sistema 3'-SAG2 (44,7%), do sistema 5'-SAG2 (40,8%), e finalmente do sistema GRA6 (25%) (Tabela 3). Quando a frequência de detecção do sistema SAG3 foi comparada àquela dos outros três sistemas, a diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$).

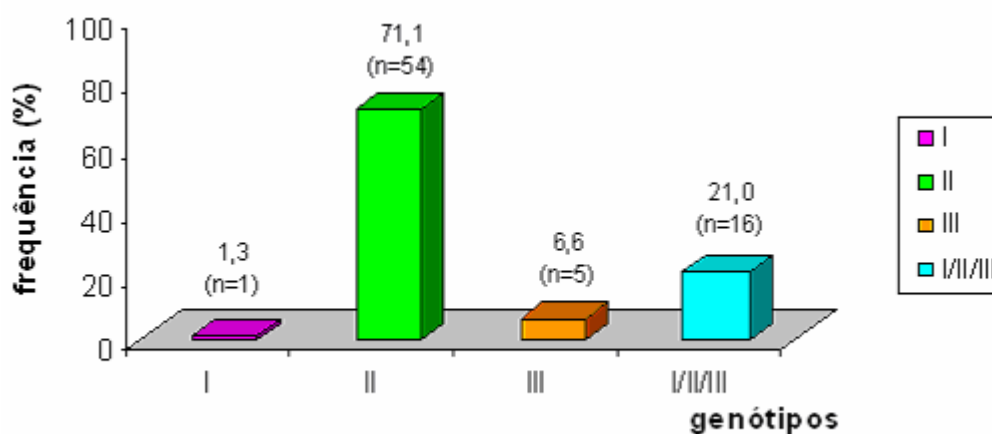
Tabela 3 – Frequência de detecção dos quatro sistemas testados no multiplex-*nested*-PCR para genotipagem de *T. gondii* em 76 amostras de líquido amniótico.

Localização	Nested PCR				Total
	5'SAG2 n (%)	3'SAG2 n (%)	SAG3 n (%)	GRA6 n (%)	
Amostras amplificadas	31 (40,8)	34 (44,7)	53 (69,7)	19 (25,0%)	76

$p < 0,0001$

Nas 76 amostras que foram amplificadas e puderam ser genotipadas pelos diferentes sistemas do multiplex-*nested*-PCR-RFLP foram encontrados: 1,3% (1 amostra) com genótipo tipo I; 71,1% (54 amostras) com genótipo II; 6,6% (5 amostras) com genótipo III; e 21% (16 amostras) para as quais não foi possível definir o genótipo parasitário após clivagem enzimática (gráfico 1).

Gráfico 1 - Frequência dos genótipos do *T. gondii* em 76 amostras de líquido amniótico pela técnica de RFLP



4.2 Sequenciamento

Pretendíamos sequenciar as 16 amostras cujos genótipos não puderam ser definidos pela multiplex-*nested*-PCR-RFLP, no entanto, em dois casos não havia material biológico remanescente para realizar uma nova extração e amplificação. Das 14 amostras sequenciadas, duas foram definidas como tipo II, apresentando 100% de homologia com o protótipo ME49, e duas foram definidas como tipo III apresentando 100% de homologia com o protótipo VEG. Em 10 amostras (13,5%) foram observadas “misturas” de duas ou mais bases, em uma ou mais posições nucleotídicas da seqüência de DNA do fragmento amplificado. Na comparação dessas 10 (13,5%) amostras com os três protótipos de *T. gondii*, exatamente nos pontos onde existe “mistura”, a amostra em questão poderia ser identificada ora como tipo I, ora como tipo II ou como tipo III e, por isso, foram denominadas recombinantes.

Além dos sequenciamentos para a definição dos genótipos parasitários em 14 das 16 amostras que não puderam ter o genótipo definido após clivagem enzimática, seis amostras identificadas pela técnica de multiplex-*nested*-PCR-RFLP como tipo II foram selecionadas aleatoriamente para a confirmação dos resultado. Muito embora tenham confirmado o genótipo II com base na seqüência de DNA analisada pelo RFLP específico, em quatro das seis amostras foi observada “mistura” de bases em outras posições nucleotídicas do fragmento amplificado, regiões estas não analisadas pelo RFLP. (Figura 7)

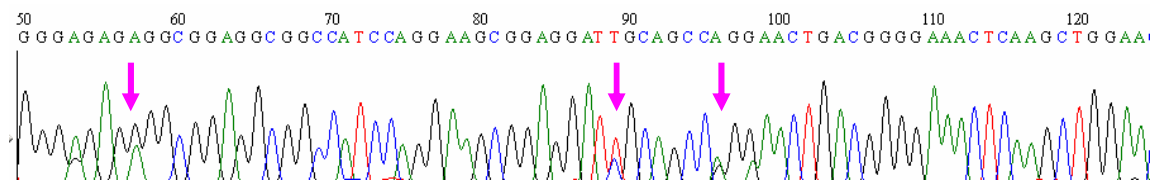


Figura 7. Resultado do sequenciamento de uma amostra que apresentou “mistura” de bases em posições nucleotídicas em regiões não analisadas pelo RFLP

Os resultados do sequenciamento de todas as amostras estão nos anexos A e B.

5.0 Discussão

A toxoplasmose é uma infecção altamente prevalente no mundo, tendo importância especial em gestantes, pois pode causar malformações congênitas graves, além de abortos espontâneos e natimortos (Remington et al., 2001). A gravidade da infecção pode estar associada tanto ao genótipo parasitário, uma vez que são descritas três linhagens ancestrais de *T. gondii* além de outras linhagens recombinantes e atípicas (Reikvam et al., 1976; Derouin et al., 1992; Frenkel et al., 1997; Dubey et al., 1998; Remington et al., 2001; Grigg et al., 2001 a; Sibley, 2003) quanto à susceptibilidade genética do hospedeiro (resposta imune, frequência de alelos do Complexo Maior de Histocompatibilidade) (Habegger de Sorrentino et al.)

O presente estudo é o primeiro a realizar genotipagem de *Toxoplasma gondii* no modelo de infecção congênita na América do Sul, analisando número significativo de amostras de líquido amniótico. A casuística foi composta por gestantes moradoras de zonas urbanas do Estado de São Paulo. Infelizmente, não dispomos de dados epidemiológicos relacionados à transmissão da doença (hábitos alimentares, contato com animais etc).

A metodologia de escolha foi a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) do tipo multiplex (amplificação de fragmentos de vários genes, simultaneamente), e *nested* (dois ciclos ou *rounds* de amplificação), seguida de RFLP. O primeiro ciclo de amplificação das amostras foi realizado pela técnica de multiplex, pois requer ínfimas concentrações de DNA, além de ter

menor custo e reduzir o tempo gasto nas análises. A quantidade de material utilizado foi o ponto mais importante, uma vez que as amostras do estudo foram de difícil obtenção e já haviam sido previamente extraídas e utilizadas para o diagnóstico molecular da toxoplasmose. O segundo ciclo de amplificação teve como alvo as regiões internas dos fragmentos amplificados no primeiro PCR e foi realizado com o intuito de ganhar sensibilidade e especificidade.

Posteriormente, as clivagens enzimáticas foram realizadas para a identificação dos genótipos parasitários. Diversos trabalhos utilizam a técnica de genotipagem de *T. gondii* diretamente de amostras biológicas ou após isolamento em cultura de células ou em camundongos, em estudos realizados em seres humanos ou em animais (Khan et al., 2005; Fuentes et al., 2001)

Os quatro sistemas de multiplex-*nested*-PCR-RFLP utilizados apresentaram desempenhos diferentes, sendo que o sistema que amplifica fragmento do gene SAG3 foi superior aos demais. Estudo de Khan et al. (2005) analisando líquido de pacientes norte-americanos imunodeficientes devido ao HIV, utilizando os mesmos sistemas de amplificação que os do presente estudo, além de um sistema que amplifica o gene da β -tubulina do *Toxoplasma*, também encontraram melhor desempenho do sistema que amplifica o gene SAG3 e, ainda, como em nosso estudo, algumas amostras só puderam ser amplificadas por esse sistema. Entretanto, estudo de Fuentes et al. (2001), na Espanha, analisando apenas o gene SAG2 (mesmas regiões 5' e 3'), porém realizando genotipagem diretamente de

diferentes amostras biológicas (líquor, sangue, humor aquoso, biópsia de pulmão e de cérebro, líquido amniótico, urina e líquido ascítico) de pacientes imunodeficientes, gestantes e recém-nascidos com toxoplasmose observam excelente desempenho desses sistemas, principalmente o que amplifica a região 3'-SAG2, que foi capaz de identificar 93,9% das amostras.

O fato de algumas amostras terem sido amplificadas pelo gene B1 de *Toxoplasma gondii* na amplificação usada para definir o diagnóstico, e não terem sido amplificadas pelo multiplex-*nested*-PCR pode ser explicado pela representatividade dos genes-alvo das amplificações no genoma do parasita. O gene B1 conta com 35 cópias por parasita, enquanto todos os genes da multiplex-*nested*-PCR (SAG2, SAG3 e GRA6) possuem uma única cópia em cada parasita.

Diferenças nas técnicas de extração de DNA, número de alíquotas de DNA testadas de cada material biológico, além do tempo e das condições de armazenamento das amostras podem alterar a chance de detecção do parasita. Pode-se presumir que algumas amostras sofreram degradação do DNA exatamente na sequência em que está o alvo de hibridização dos iniciadores utilizados para a amplificação do gene do *Toxoplasma gondii*. Sendo assim, podia-se esperar que os sistemas de multiplex-*nested*-PCR tivessem rendimentos diferentes, dependendo da sequência em que o DNA encontrava-se degradado. Além disso, em nosso estudo, todas as gestantes foram tratadas, e os fármacos anti-*Toxoplasma* reduzem a carga parasitária, não sendo, todavia, capazes de promover *clearance* dos parasitas encistados. (Montoya e Remington, 2008)

Outro fato importante é termos testado diretamente as amostras de líquido amniótico após extração de DNA das mesmas, enquanto que outros estudos (Ajzenberg et al., 2002) realizam primeiramente o isolamento dos parasitas em camundongos ou cultura de células, para só depois extrair o DNA nos testes de genotipagem, o que pode aumentar a quantidade de parasitas melhorando a sensibilidade da PCR, porém podendo favorecer a ocorrência de recombinação gênica.

O genótipo I é considerado de maior patogenicidade, existindo na literatura alguns casos descritos de genótipo I associado à infecção congênita, ou encontrados em placentas (Dardé, 2004). Vários relatos demonstram a “virulência” dos parasitas pertencentes a este genótipo quando causam infecções em animais, estando o comportamento mais patogênico provavelmente associado a alguma propriedade intrínseca do parasita, podendo produzir infecções mais graves em seres humanos, o que já foi comprovado no modelo de toxoplasmose ocular (Boothroyd e Grigg, 2002), e também em pacientes imunodeficientes, principalmente nos portadores do HIV (Sibley e Boothroyd, 1992), inclusive em nosso meio (Ferreira et al., 2007), e em menor proporção em infecções de animais domésticos ou de criação (Gallego et al., 2006).

No presente estudo, foi identificada apenas uma amostra do tipo I (5,3%). Esses dados diferem dos dados do estudo de Gallego et al. (2006) que, analisando 130 amostras de sangue, líquido céfalo-raqueano e líquido amniótico de pacientes com diferentes formas de toxoplasmose e de recém-nascidos com toxoplasmose congênita provenientes da Colômbia,

encontram das seis amostras de infecção congênita analisadas, cinco do tipo I e uma amostra do tipo III, não tendo sido descritas amostras com genótipo II, porém a casuística de infecção congênita analisada foi restrita.

Ferreira et al. (2007) analisando amostras de sangue e líquido de 87 pacientes com HIV e encefalite, acompanhados na cidade de São Paulo, Brasil, identificam 46% das amostras como tipo I; 11% como tipo II e 4% como tipo III, sendo as restantes (39%) do tipo recombinantes ou não tipáveis pela técnica utilizada.

O genótipo II, considerado de menor patogenicidade, apesar de poder causar toxoplasmose congênita com comprometimento neurológico e ocular grave, aparece em 80% das infecções humanas e de animais nos EUA e na Europa (Dardé, 2004).

Esse genótipo foi encontrado com maior frequência nos líquidos amnióticos analisados no presente estudo, identificado em 71,1% das amostras de gestantes do Estado de São Paulo. Ajzenberg et al. (2002) também mostram maior frequência desse genótipo (84,8%), analisando 86 amostras de casos de toxoplasmose congênita em diferentes países europeus, sendo que 2,3% eram do tipo III, e 8,1% do tipo I. Contrariamente, em estudo realizado no mesmo ano por Fuentes et al., na Espanha, analisando sete amostras de sangue de recém-nascidos, uma amostra de sangue materno, uma urina materna, uma amostra de líquido ascítico de um feto que havia sido abortado e três amostras de líquido amniótico encontram maior frequência, ou seja, 75% de genótipo I. Os tipos II e III apareceram com a mesma frequência (12,5%), discordando dos resultados do presente

estudo, e daqueles de Ajzenberg et al. (2002). Poderíamos realmente esperar maior frequência do tipo II, apesar de não haver descrição desse genótipo na literatura brasileira no modelo de toxoplasmose congênita. Isso poderia ser explicado pelo fato dos genótipos I e III de *T. gondii* serem considerados, respectivamente, de patogenicidade elevada e intermediária, o que poderia levar a abortos espontâneos e partos prematuros, portanto, poderiam estar menos representados em casuísticas que analisam gestações que atingem o segundo e terceiro trimestre, como foi o caso das gestantes incluídas nesse trabalho.

O genótipo III é encontrado com maior frequência em animais, porém há relatos de casos de toxoplasmose humana (infecção congênita, ocular e em pacientes portadores do HIV) (Dardé, 2004).

No presente estudo, cinco amostras (6,6%) foram identificadas como tipo III. Em estudos de toxoplasmose congênita, o genótipo III aparece, porém não com grande frequência, como mostram os relatos de Ajzenberg et al. (2002), Fuentes et al. e Gallego et al. (2006), citados anteriormente, indo ao encontro com os dados do presente estudo.

Além das três linhagens clonais previamente descritas, sabe-se que 5% das cepas européias e norte-americanas são consideradas recombinantes e que a taxa de recombinação na América do Sul parece ser elevada. (Khan, 2007). As cepas recombinantes têm sido descritas com grande frequência na literatura sul-americana, incluindo casuísticas brasileiras (Dubey et al., 2007).

Em nosso estudo, 10 amostras (13,16%) foram identificadas como sendo recombinantes, sendo esta frequência mais elevada que o descrito na literatura. (Sibley e Boothroyd, 1992; Khan, 2007).

Dubey et al. (2007) estudando 84 amostras de galinhas sendo 34 delas provenientes do Pará e 50 provenientes do Rio Grande do Sul, identificando 11 amostras do Pará que apresentam recombinações entre as três linhagens clonais clássicas: I, II e III, porém, nenhum isolado das três linhagens ancestrais (arquetipos I, II e III). Já nas 19 amostras que foram tipadas no Rio Grande do Sul, são identificados apenas sete genótipos distintos, sendo que cinco deles apresentam recombinação entre as três linhagens clonais, um deles sendo identificado como tipo I, e dois deles como tipo 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, identificam o tipo I em todas as amostras que amplificam o gene SAG2. Porém, quando essas amostras são analisadas por outros sistemas de amplificação, são identificadas como tipo III. Além disso, uma das amostras foi identificada como tipo II com base na clivagem enzimática de outro gene amplificado, confirmando existência de genótipo misto. Portanto, essas amostras demonstram elevada frequência de infecção em porcos, e presença de genótipos incomuns (atípicos ou recombinantes).

Ferreira et al. (2006) realizando estudo com 4 amostras de pacientes com toxoplasmose congênita (sem especificação se foram líquidos amnióticos, placentas, sangue fetal ou de recém-nascidos) e 16 amostras de

diferentes animais (coelho, rato, veado, galinhas e cachorros) provenientes de São Paulo e Minas Gerais, identificam todas as amostras como recombinantes, representando mistura dos três genótipos clássicos. Nesse estudo, foram utilizados 8 diferentes genes do *Toxoplasma gondii* para a amplificação das amostras e os autores afirmam que, se tivessem utilizado apenas os genes SAG1 e B1, as amostras teriam sido erroneamente classificadas como tipo I. Esses dados, somados aos do presente estudo, demonstram que a frequência de recombinação entre as cepas clonais na América do Sul é elevada, com possível aparecimento de genótipos ainda não descritos na literatura (atípicos).

Estudo de Dubey et al. (2007) sugere que populações de *T. gondii* do Pará são diferentes daquelas do Rio Grande do Sul, e que não há evidências de cruzamentos genéticos entre elas, provavelmente pela distância geográfica entre estas regiões. Entretanto, esse estudo sugere que os genótipos I e II estão circulando intensamente no Rio Grande do Sul, diferindo do fenômeno que está ocorrendo na América do Norte e da Europa, onde o genótipo II predomina em todas as regiões. Estes dados sugerem que a América do Sul constitui nicho com características únicas para o estudo de populações de *T. gondii*.

No estudo de Ferreira et al. (2008), as nove amostras identificadas como tipo II pela *multiplex-nested-PCR-RFLP* sendo submetidas ao sequenciamento de DNA, mostram que, na realidade, são isolados recombinantes e não do tipo II. Esses dados corroboram com os achados do presente estudo, uma vez que 71,1% das amostras foram previamente

identificadas como tipo II pela técnica de RFLP e quando, seis destas amostras foram selecionadas ao acaso e seqüenciadas, quatro foram consideradas recombinantes com base na análise da totalidade dos nucleotídeos do fragmento amplificado (SAG3), e não apenas no sítio de clivagem da enzima de restrição. Estes dados apontam a necessidade de análise mais abrangente das seqüências nucleotídicas, sob pena de estarmos classificando as cepas e isolados de *T. gondii* por meio de técnica inadequada, o que possivelmente não corresponde à realidade das recombinações genéticas que estão em curso, e fazem parte da evolução do parasita no Brasil, que pode sofrer influência de fatores ambientais causando alterações epigenéticas. Inúmeros são os fatores que poderiam explicar a ocorrência de fenômenos de recombinação genética com maior frequência no Brasil em relação a outros países: contato mais próximo com animais domésticos e de criação, hábitos alimentares como, por exemplo, consumo exagerado de carne mal cozida, ou de procedência duvidosa, forma de manipulação e processamento dos alimentos, além de exposição cotidiana de indivíduos a cargas parasitárias muito elevadas etc.

A técnica de multiplex-*nested*-PCR seguida de RFLP mostrou-se útil, porém apresenta limitações no que se refere à genotipagem de amostras de líquido amniótico, uma vez que, após sequenciamento, foram reveladas várias recombinações genéticas nos fragmentos amplificados que haviam sido previamente identificados como tipo II.

Sendo assim, para a genotipagem de material biológico de pacientes, ou de isolados e cepas de *T. gondii* em nosso meio é imprescindível que

utilizemos amplificação de múltiplos genes de *T. gondii* incluindo àqueles do gene B1, com confirmação das clivagens enzimáticas pelo sequenciamento, ou, eliminando a etapa de clivagem enzimática e passando diretamente ao sequenciamento da totalidade dos fragmentos amplificados.

6.0 Conclusões

A frequência dos genótipos I, II e III de *T. gondii* em amostras de líquido amniótico de gestantes pode ser determinada na maioria das amostras.

O sistema SAG3 teve o melhor desempenho.

O genótipo mais comum foi o tipo II, protótipo ME49.

Houve uma grande frequência de cepas recombinantes.

A análise de genótipos realizada com a técnica de RFLP, em nosso meio, deve ser interpretada com cautela, uma vez que o sequenciamento de amostras que já haviam sido identificadas como tipo II mostrou que a identificação dos genótipos com base em apenas um marcador (enzima de restrição) pode não ser capaz de evidenciar mistura de bases existentes em regiões diferentes daquela que sofreu clivagem.

7.0 Anexos

Anexo A

Resultados dos sequenciamentos das amostras que não puderam ser tipadas pela técnica de RFLP

Amostra nº 13, Gene SAG3

SeqA	Name	Len (nt)	SeqB	Name	Len (nt)	Score
1	RH	225	2	ME	225	96
1	RH	225	3	VEG	225	98
1	RH	225	4	13	228	98
2	ME	225	3	VEG	225	96
2	ME	225	4	13	228	96
3	VEG	225	4	13	228	100

```

=====
VEG          -TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAG
59
13-N6       TTCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAG
60
RH          -TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAG
59
ME          -TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAG
59
*****

VEG          TTGCCGGAACCCAGAAAGTGGGGGAGAGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGAT
119
13-N6       TTGCCGGAACCCAGAAAGTGGGGGAGAGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGAT
120
RH          TTGCCGGAACCCAGAAAGTGGGGGAGAGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGAT
119
ME          TTGCTGGGAACCCAGAAAGTGGGAGAGGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGAT
119
**** *****

VEG          CGCAGCCGAAACTGACGGGGAAACTCAAGCTGGAACAGAAAGTTCAGCCGGCGCGAGTT
179
13-N6       CGCAGCCGAAACTGACGGGGAAACTCAAGCTGGAACAGAAAGTTCAGCCGGCGCGAGTT
180
RH          TGCAGCCGGAAGTGAAGGGGAAAGTCAAGCTGGAACAGAAAGTTCAGCCGGCGCGAGTT
179
ME          TGCAGCCAGGAAGTGAAGGGGAAACTCAAGCTGGAACAGAAAGTTCAGCCGGCGCGAGTT
179
***** * ***** ***** *****

VEG          CGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT-- 225
13-N6       CGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGTGA 228
RH          CGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT-- 225
ME          CGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT-- 225
*****

```

Amostra nº 18, Gene SAG3

SeqA Name	Len(nt)	SeqB Name	Len(nt)	Score	
1	ME	2	VEG	225	96
1	ME	3	RH	225	96
1	ME	4	18	229	96
2	VEG	3	RH	225	98
2	VEG	4	18	229	100
3	RH	4	18	229	98

```

VEG          -TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAG
59
18           TTCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAG
60
RH          -TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAG
59
ME          -TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAG
59
*****

VEG          TTGCCGGGAACCCAGAAAGTGGGGGAGAGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGAT
119
18           TTGCCGGGAACCCAGAAAGTGGGGGAGAGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGAT
120
RH           TTGCCGGGAACCCAGAAAGTGGGGGAGAGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGAT
119
ME           TTGCTGGAACCCAGAAAGTGGGAGAGGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGAT
119
**** *****

VEG          CGCAGCCGGAAGTACGGGGAACTCAAGCTGGAACAGAAAGTTCAGCCGGCGCGAGTT
179
18           CGCAGCCGGAAGTACGGGGAACTCAAGCTGGAACAGAAAGTTCAGCCGGCGCGAGTT
180
RH           TGCAGCCGGAAGTGAAGGGGAAAGTCAAGCTGGAACAGAAAGTTCAGCCGGCGCGAGTT
179
ME           TGCAGCCAGGAAGTACGGGGAACTCAAGCTGGAACAGGAAGTTCAGCCGGCGCGAGTT
179
***** * ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

VEG          CGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT--- 225
18           CGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGTGAG 229
RH           CGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT--- 225
ME           CGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT--- 225
*****

```

Amostra nº 21, Gene SAG3

SeqA Name	Len (nt)	SeqB Name	Len (nt)	Score	
1	21-N6	2	RH	225	96
1	21-N6	3	ME	225	98
1	21-N6	4	VEG	225	96
2	RH	3	ME	225	96
2	RH	4	VEG	225	98
3	ME	4	VEG	225	96

```

RH          -TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAG
59
VEG        -TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAG
59
21-N6     TTCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAG
60
ME        -TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAG
59

```

```

RH          TTGCCGGGAACCCAGAAAGTGGGGGAGAGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGAT
119
VEG        TTGCCGGGAACCCAGAAAGTGGGGGAGAGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGAT
119
21-N6     TTGCTGGGAACCCAGAAAGTGGGAGAGRGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGAT
120
ME        TTGCTGGGAACCCAGAAAGTGGGAGAGGGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGAT
119

```

**** *****

```

RH          TGCAGCCGGGAAGTGAAGGGGAAAGTCAAGCTGGAACAGAAAGTTCAGCCGGCGCGAGTT
179
VEG        CGCAGCCGGGAAGTGAAGGGGAAAGTCAAGCTGGAACAGAAAGTTCAGCCGGCGCGAGTT
179
21-N6     YGCAGCCAGRAACTGACGGGGAAACTCAAGCTGGAACAGRAAGTTCAGCCGGCGCGAGTT
180
ME        TGCAGCCAGGAAGTGAAGGGGAAAGTCAAGCTGGAACAGGAAGTTCAGCCGGCGCGAGTT
179

```

***** * ***** ***** ***** ***** ***** *****

```

RH          CGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT-- 225
VEG        CGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT-- 225
21-N6     CGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGTGA 228
ME        CGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT-- 225

```

Amostra nº 22, Gene SAG3

SeqA Name	Len (nt)	SeqB Name	Len (nt)	Score		
1	RH	225	2	ME	225	96
1	RH	225	3	VEG	225	98
1	RH	225	4	22-N6	228	96
2	ME	225	3	VEG	225	96
2	ME	225	4	22-N6	228	96
3	VEG	225	4	22-N6	228	97

```

RH          TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAGT
60
VEG        TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAGT
60
22-N6     TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAGT
60
ME         TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAGT
60

```

```

RH          TGCCGGGAACCCAGAAAGTGGGGGAGAGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGATT
120
VEG        TGCCGGGAACCCAGAAAGTGGGGGAGAGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGATC
120
22-N6     TGCTGGGAACCCAGAAAGTGGGGGAGAGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGATY
120
ME         TGCTGGGAACCCAGAAAGTGGGGGAGAGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGATT
120

```

*** *****

```

RH          GCAGCCGGAACTGAAGGGGAAAGTCAAGCTGGAACAGAAAGTTCAGCCGGCGCGAGTTC
180
VEG        GCAGCCGGAACTGACGGGGAAACTCAAGCTGGAACAGAAAGTTCAGCCGGCGCGAGTTC
180
22-N6     GCAGCCRGRAACTGACGGGGAAACTCAAGCTGGAACAGAAAGTTCAGCCGGCGCGAGTTC
180
ME         GCAGCCAGGAACTGACGGGGAAACTCAAGCTGGAACAGAAAGTTCAGCCGGCGCGAGTTC
180

```

***** * ***** ***** ***** ***** ***** *****

```

RH          GCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT--- 225
VEG        GCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT--- 225
22-N6     GCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGTGAG 228
ME         GCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT--- 225

```

Amostra nº 23, Gene SAG3

SeqA Name	Len (nt)	SeqB Name	Len (nt)	Score		
1	RH	225	2	ME	225	96
1	RH	225	3	VEG	225	98
1	RH	225	4	23-N6	228	96
2	ME	225	3	VEG	225	96
2	ME	225	4	23-N6	228	98
3	VEG	225	4	23-N6	228	96

```

ME          -TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAG
59
23-N6      TTCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAG
60
RH          -TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAG
59
VEG        -TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAG
59

```

```

ME          TTGCTGGGAACCCAGAAAGTGGGAGAGGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGAT
119
23-N6      TTGCTGGGAACCCAGAAAGTGGGAGAGRGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGAT
120
RH          TTGCCGGGAACCCAGAAAGTGGGGGAGAGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGAT
119
VEG        TTGCCGGGAACCCAGAAAGTGGGGGAGAGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGAT
119

```

**** *****

```

ME          TGCAGCCAGGAAGTACGGGGAACTCAAGCTGGAACAGGAAGTTCAGCCGGCGCGAGTT
179
23-N6      YGCAGCCAGGAAGTACGGGGAACTCAAGCTGGAACAGRAAGTTCAGCCGGCGCGAGTT
180
RH          TGCAGCCGGGAAGTGAAGGGGAAAGTCAAGCTGGAACAGAAAGTTCAGCCGGCGCGAGTT
179
VEG        CGCAGCCGGGAAGTACGGGGAACTCAAGCTGGAACAGAAAGTTCAGCCGGCGCGAGTT
179

```

***** * ***** ***** ***** ***** ***** *****

```

ME          CGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCCTTCTCGGTCTCCTTGT--225
23-N6      CGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCCTTCTCGGTCTCCTTGTGA 228
RH          CGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCCTTCTCGGTCTCCTTGT-- 225
VEG        CGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCCTTCTCGGTCTCCTTGT-- 225

```

Amostras nº 24, Gene SAG3

SeqA Name	Len (nt)	SeqB Name	Len (nt)	Score
1 RH	225	2 ME	225	96
1 RH	225	3 VEG	225	98
1 RH	225	4 24-N6	228	97
2 ME	225	3 VEG	225	96
2 ME	225	4 24-N6	228	96
3 VEG	225	4 24-N6	228	99

```

VEG          -TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAG
59
24-N6       TTCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAG
60
RH          -TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAG
59
ME          -TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAG
59
*****

VEG          TTGCCGGGAACCCAGAAAGTGGGGGAGAGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGAT
119
24-N6       TTGCCGGGAACCCAGAAAGTGGGGGAGAGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGAT
120
RH          TTGCCGGGAACCCAGAAAGTGGGGGAGAGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGAT
119
ME          TTGCTGGGAACCCAGAAAGTGGGAGAGGGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGAT
119
**** *****

VEG          CGCAGCCGGAAACTGACGGGGAAACTCAAGCTGGAACAGAAAGTTCAGCCGGCGCGAGTT
179
24-N6       CGYAGCCGGAAACTGACGGGGAAACTCAAGCTGGAACAGAAAGTTCAGCCGGCGCGAGTT
180
RH          TGCAGCCGGAAACTGAAGGGGAAAGTCAAGCTGGAACAGAAAGTTCAGCCGGCGCGAGTT
179
ME          TGCAGCCAGGAACTGACGGGGAAACTCAAGCTGGAACAGGAAGTTCAGCCGGCGCGAGTT
179
* *****

VEG          CGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT-- 225
24-N6       CGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGTGA 228
RH          CGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT-- 225
ME          CGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT-- 225
*****

```

Amostra nº 30, Gene SAG3

SeqA Name	Len (nt)	SeqB Name	Len (nt)	Score	
1	RH	2	ME	225	96
1	RH	3	VEG	225	98
1	RH	4	30-N6	228	96
2	ME	3	VEG	225	96
2	ME	4	30-N6	228	96
3	VEG	4	30-N6	228	97

```

ME          -TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAG
59
30-N6      TTCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAG
60
RH          -TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAG
59
VEG        -TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAG
59

```

```

ME          TTGCTGGAACCCAGAAAGTGGGAGAGGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGAT
119
30-N6      TTGCYGGGAACCCAGAAAGTGGGRGAGAGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGAT
120
RH          TTGCCGGGAACCCAGAAAGTGGGGGAGAGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGAT
119
VEG        TTGCCGGGAACCCAGAAAGTGGGGGAGAGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGAT
119

```

**** *****

```

ME          TGCAGCCAGGAAGTACGGGGAACTCAAGCTGGAACAGGAAGTTCAGCCGGCGCGAGTT
179
30-N6      YGCAGCCRGRAACTGACGGGGAACTCAAGCTGGAACAGRAAGTTCAGCCGGCGCGAGTT
180
RH          TGCAGCCGGGAAGTGAAGGGGAAAGTCAAGCTGGAACAGAAAGTTCAGCCGGCGCGAGTT
179
VEG        CGCAGCCGGGAAGTACGGGGAACTCAAGCTGGAACAGAAAGTTCAGCCGGCGCGAGTT
179

```

***** * ***** ***** ***** ***** ***** *****

```

ME          CGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT-- 225
30-N6      CGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGTGA 228
RH          CGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT-- 225
VEG        CGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT-- 225
*****

```

Amostra nº 31, Gene SAG3

SeqA	Name	Len(nt)	SeqB	Name	Len(nt)	Score
1	RH	225	2	ME	225	96
1	RH	225	3	VEG	225	98
1	RH	225	4	31	181	96
2	ME	225	3	VEG	225	96
2	ME	225	4	31	181	99
3	VEG	225	4	31	181	96

```

ME          TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAGT
60
31          -----TCTGCA-CGTCAA-GTGAGAGT
20
RH          TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAGT
60
VEG        TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAGT
60

```

```

ME          TGCTGGGAACCCAGAAAGTGGGAGAGGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGATT
120
31          TGCTGGGA-CCCGAGAAAGTGGGAGAGAGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGATT
79
RH          TGCCGGGAACCCAGAAAGTGGGGGAGAGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGATT
120
VEG        TGCCGGGAACCCAGAAAGTGGGGGAGAGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGATC
120

```

*** *****

```

ME          GCAGCCAGGAACTGACGGGGAAACTCAAGCTGGAACAGGAAGTTCAGCCGGCGCGAGTTC
180
31          GCAGCCAGGAACTGACGGGGAAACTCAAGCTGGAACAGGAAGTTCAGCCGGCGCGAGTTC
139
RH          GCAGCCGGGAACTGAAGGGGAAAGTCAAGCTGGAACAGAAAGTTCAGCCGGCGCGAGTTC
180
VEG        GCAGCCGGGAACTGACGGGGAAACTCAAGCTGGAACAGAAAGTTCAGCCGGCGCGAGTTC
180

```

***** * *****

```

ME          GCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT 225
31          GCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCT--- 181
RH          GCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT 225
VEG        GCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT 225
*****

```

Amostra nº 34, Gene SAG2, extremidade 5'

SeqA Name	Len (nt)	SeqB Name	Len (nt)	Score		
1	RH	222	2	ME	222	98
1	RH	222	3	VEG	222	98
1	RH	222	4	N2-34	224	99
2	ME	222	3	VEG	222	98
2	ME	222	4	N2-34	224	99
3	VEG	222	4	N2-34	224	99

```

ME          -ATTTTCATGCCTCCGCTTCGAAATTGTCGTGCAAAGAAAACGTTGTTGAGGGGTGGGAT
59
N2-34      TATTCTCATGCCTCCGCTTCGAAATTGTCGTGCAAAGAAAACGTTGTTGAGGGGTGGGAT
60
RH          -ATTCTCATGCCTCCGCTTCGAAATTGTCGTGCAAAGAAAACGTTGTTGAGGGGTGGGAT
59
VEG        -ATTCTCATGCCTCCGCTTCGAAATTGTCGTGCAAAGAAAACGTTGTTGAGGGGTGGGAT
59

```

*** *****

```

ME          TCGGATTGTTCTTGGCGTAGATCCTGGGAGGAACGCGAGAAAATGTATTTCCGGATCTGC
119
N2-34      TCGGATTGTTCTTGGCGTAGATCCTGGGAGGAACGCGAGAAAATGTATTTCCGGATCTGC
120
RH          TCGGATTGTTCTTGGCGTAGATCCTGGGAGGAACGCGAGAAAATGTATTTCCGGATCTGC
119
VEG        TCGGATTGTTCTTGGCGTAGATCCTGGGAGGAACGCGAGAAAATGTATTTCCGGATCTGC
119

```

```

ME          GATTATGTGACAGAGGAACCTGTTTGCCGACACACTGCTGCAGTACTGCGCTTTTCCGCC
179
N2-34      GATTATGTGACAGAGGAACCTGTTTGCCGACACACTGCTGCAGTACTGCGCTTTTCCGCC
180
RH          GATTATGTGACAGAGGAACCTGTTTGCCGACACACTGCTGCAGTACTGCGCTTTTCCGCC
179
VEG        GATTATGTGACAGAGGAACCTGTTTGCCGACACACTGCTGCAGTACTGCGCTTTTCCGCC
179

```

***** ***** *****

```

ME          AGACACAACCAGTGTTCGGCGGGTGTGCCTTCGTGAAACGTT- 222
N2-34      AGACACAACCAGTGTTCGGCGGGTGTGCCTTCGTGAAACGTTA 224
RH          AGACACAACCAGTGTTCGGCGGGTGTGCCTTCGTGAAACGTT- 222
VEG        AGACACAACCAGTGTTCGGCGGGTGTGCCTTCGTGAAACGTT- 222

```

Amostra nº 45, Gene SAG3

SeqA Name	Len (nt)	SeqB Name	Len (nt)	Score	
1	45-N6	2	RH	225	96
1	45-N6	3	ME	225	96
1	45-N6	4	VEG	225	98
2	RH	3	ME	225	96
2	RH	4	VEG	225	98
3	ME	4	VEG	225	96


```

=====
RH                    -TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAG
59
VEG                   -TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAG
59
45-N6                 TTCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAG
60
ME                    -TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAG
59
*****

RH                    TTGCCGGGAACCCAGAAAGTGGGGGAGAGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGAT
119
VEG                   TTGCCGGGAACCCAGAAAGTGGGGGAGAGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGAT
119
45-N6                 TTGCYGGGAACCCAGAAAGTGGGRGAGAGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGAT
120
ME                    TTGCTGGGAACCCAGAAAGTGGGAGAGGGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGAT
119
**** *****

RH                    TGCAGCCGGGAAGTGAAGGGGAAAGTCAAGCTGGAACAGAAAGTTCAGCCGGCGCGAGTT
179
VEG                   CGCAGCCGGGAAGTGAAGGGGAAAGTCAAGCTGGAACAGAAAGTTCAGCCGGCGCGAGTT
179
45-N6                 YGCAGCCGGGAAGTGAAGGGGAAAGTCAAGCTGGAACAGRAAGTTCAGCCGGCGCGAGTT
180
ME                    TGCAGCCAGGAAGTGAAGGGGAAAGTCAAGCTGGAACAGGAAGTTCAGCCGGCGCGAGTT
179
***** * ***** ***** ***** ***** ***** *****

RH                    CGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCCTTCTCGGTCTCCTTGT----- 225
VEG                   CGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCCTTCTCGGTCTCCTTGT----- 225
45-N6                 CGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCCTTCTCGGTCTCCTTGTGAAGAAAC 234
ME                    CGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCCTTCTCGGTCTCCTTGT----- 225
*****

```

Amostra nº 53, Gene SAG3

SeqA Name	Len (nt)	SeqB Name	Len (nt)	Score	
1	RH	2	ME	225	96
1	RH	3	VEG	225	98
1	RH	4	53-N6	191	92
2	ME	3	VEG	225	96
2	ME	4	53-N6	191	93
3	VEG	4	53-N6	191	92


```

=====
RH          -----TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTG
55
VEG        -----TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTG
55
ME          -----TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTG
55
53-N6      CATTTCCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTG
60
                *****

RH          AGAGTTGCCGGGAACCCAGAAAGTGGGGGAGAGCGGAGGCGCCATCCAGGAAGCGGA
115
VEG        AGAGTTGCCGGGAACCCAGAAAGTGGGGGAGAGCGGAGGCGCCATCCAGGAAGCGGA
115
ME          AGAGTTGCTGGGAACCCAGAAAGTGGGAGAGGGCGGAGGCGCCATCCAGGAAGCGGA
115
53-N6      AGAGTTGCYGGGAACCCAGAAAGTGGGAGAGRGGCGGAGGCGCCATCCAGGAAGCGGA
120
                ***** ***** *** *****

RH          GGATTGCAGCCGGGAACTGAAGGGGAAAGTCAAGCTGGAACAGAAAGTTCAGCCGGCGCG
175
VEG        GGATCGCAGCCGGGAACTGACGGGGAAACTCAAGCTGGAACAGAAAGTTCAGCCGGCGCG
175
ME          GGATTGCAGCCAGGAACTGACGGGGAAACTCAAGCTGGAACAGGAAGTTCAGCCGGCGCG
175
53-N6      GGACTGCTTCCGGGAACTGACGGGGAAACTCAAGCTGGAACAGRAAGTTCAGCCGGCGCG
180
                *** ** * * ***** ***** ***** *****

RH          AGTTCGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT 225
VEG        AGTTCGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT 225
ME          AGTTCGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT 225
53-N6      AGTTCGCGAAT----- 191
                *****

```

Amostra nº 59, Gene SAG3

SeqA Name	Len (nt)	SeqB Name	Len (nt)	Score
1 MARI_TESE_59_R	184	2 RH	225	96
1 MARI_TESE_59_R	184	3 ME	225	100
1 MARI_TESE_59_R	184	4 VEG	225	96
2 RH	225	3 ME	225	96
2 RH	225	4 VEG	225	98
3 ME	225	4 VEG	225	96

```

RH          TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAGT
60
VEG        TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAGT
60
MARI_TESE_59_R -----TTCTGCA-CGTCA--GTGAGAGT
20
ME          TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAGT
60

```

***** **

```

RH          TGCCGGGAACCCAGAAAGTGGGGGAGAGGCGGAGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGATT
120
VEG        TGCCGGGAACCCAGAAAGTGGGGGAGAGGCGGAGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGATT
120
MARI_TESE_59_R TGCTGGGA-CCCCAGAAAGTGGGAGAGGGGCGGAGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGATT
79
ME          TGCTGGGAACCCAGAAAGTGGGAGAGGGGCGGAGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGATT
120

```

*** **

```

RH          GCAGCCGGGAAGTGAAGGGGAAAGTCAAGCTGGAACAGAAAGTTCAGCCGGCGGAGTTC
180
VEG        GCAGCCGGGAAGTGAAGGGGAAAGTCAAGCTGGAACAGAAAGTTCAGCCGGCGGAGTTC
180
MARI_TESE_59_R GCAGCCAGGAAGTGAAGGGGAAAGTCAAGCTGGAACAGGAAGTTCAGCCGGCGGAGTTC
139
ME          GCAGCCAGGAAGTGAAGGGGAAAGTCAAGCTGGAACAGGAAGTTCAGCCGGCGGAGTTC
180

```

***** * *****

```

RH          GCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT 225
VEG        GCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT 225
MARI_TESE_59_R GCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT 184
ME          GCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT 225

```

Amostra nº 62, Gene SAG3

SeqA Name	Len(nt)	SeqB Name	Len(nt)	Score		
1	RH	225	2	ME	225	96
1	RH	225	3	VEG	225	98
1	RH	225	4	62	181	95
2	ME	225	3	VEG	225	96
2	ME	225	4	62	181	98
3	VEG	225	4	62	181	96

ME	TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAGT
60	
62	-----TCTGCA-CGTCA--GTGAGAGT
19	
RH	TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAGT
60	
VEG	TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAGT
60	

ME	TGCTGGGAACCCAGAAAGTGGGAGAGGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGATT
120	
62	TGCTGGGA-CCCAGAAAGTGGGAGAGRGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGATY
78	
RH	TGCCGGGAACCCAGAAAGTGGGGGAGAGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGATT
120	
VEG	TGCCGGGAACCCAGAAAGTGGGGGAGAGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGATC
120	
	*** **
ME	GCAGCCAGGAACTGACGGGGAAACTCAAGCTGGAACAGGAAGTTCAGCCGGCGCGAGTTC
180	
62	GCAGCCAGGAACTGACGGGGAAACTCAAGCTGGAACAGRAAGTTCAGCCGGCGCGAGTTC
138	
RH	GCAGCCGGGAACTGAAGGGGAAAGTCAAGCTGGAACAGAAAGTTCAGCCGGCGCGAGTTC
180	
VEG	GCAGCCGGGAACTGACGGGGAAACTCAAGCTGGAACAGAAAGTTCAGCCGGCGCGAGTTC
180	
	***** * *****
ME	GCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT 225
62	GCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTT-- 181
RH	GCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT 225
VEG	GCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT 225

Amostra nº 138, Gene SAG3

SeqA Name	Len (nt)	SeqB Name	Len (nt)	Score
1 MARI_TESE_138_R	138	2 RH	225	97
1 MARI_TESE_138_R	138	3 ME	225	96
1 MARI_TESE_138_R	138	4 VEG	225	99
2 RH	225	3 ME	225	96
2 RH	225	4 VEG	225	98
3 ME	225	4 VEG	225	96

```

MARI_TESE_138_R-----TCTGCA-CGTCAA-GTGAGAGT
20
VEG          TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAGT
60
RH          TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAGT
60
ME          TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAGT
60

```

***** *****

```

MARI_TESE_138_R TGCCGGGA-CCCCAGAAAGTGGGGGAGAGGCGGAGGCCATCCAGGAAGCGGAGGATC
79
VEG          TGCCGGGAACCCAGAAAGTGGGGGAGAGGCGGAGGCCATCCAGGAAGCGGAGGATC
120
RH          TGCCGGGAACCCAGAAAGTGGGGGAGAGGCGGAGGCCATCCAGGAAGCGGAGGATT
120
ME          TGCTGGGAACCCAGAAAGTGGGAGAGGGGCGGAGGCCATCCAGGAAGCGGAGGATT
120

```

*** **** ***** ***** *****

```

MARI_TESE_138_R GCAGCCGGAAACTGACGGGGAAACTCAAGCTGGAACAGAAAGTTCAGCCGGCGGAGTTC
139
VEG          GCAGCCGGAAACTGACGGGGAAACTCAAGCTGGAACAGAAAGTTCAGCCGGCGGAGTTC
180
RH          GCAGCCGGAAACTGAAGGGGAAAGTCAAGCTGGAACAGAAAGTTCAGCCGGCGGAGTTC
180
ME          GCAGCCAGGAACTGACGGGGAAACTCAAGCTGGAACAGAAAGTTCAGCCGGCGGAGTTC
180

```

***** * ***** ***** *****

```

MARI_TESE_138_R GCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCT----- 178
VEG          GCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT 225
RH          GCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT 225
ME          GCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT 225

```

Anexo B

Resultados dos sequenciamentos de seis amostras identificadas como tipo II pela técnica de RFLP para confirmação dos resultados

Amostra nº 26, Gene SAG3

SeqA Name	Len (nt)	SeqB Name	Len (nt)	Score
1 RH	225	2 ME	225	96
1 RH	225	3 VEG	225	98
1 RH	225	4 26-N6	226	96
2 ME	225	3 VEG	225	96
2 ME	225	4 26-N6	226	100
3 VEG	225	4 26-N6	226	96

```

ME          -TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAG
59
26-N6      TTCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAG
60
RH          -TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAG
59
VEG        -TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAG
59
*****

ME          TTGCTGGGAACCCAGAAAGTGGGAGAGGGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGAT
119
26-N6      TTGCTGGGAACCCAGAAAGTGGGAGAGGGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGAT
120
RH          TTGCCGGGAACCCAGAAAGTGGGGGAGAGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGAT
119
VEG        TTGCCGGGAACCCAGAAAGTGGGGGAGAGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGAT
119
**** *****

ME          TGCAGCCAGGAAGTACGGGGAAACTCAAGCTGGAACAGGAAGTTCAGCCGGCGCGAGTT
179
26-N6      TGCAGCCAGGAAGTACGGGGAAACTCAAGCTGGAACAGGAAGTTCAGCCGGCGCGAGTT
180
RH          TGCAGCCGGGAAGTGAAGGGGAAAGTCAAGCTGGAACAGAAAGTTCAGCCGGCGCGAGTT
179
VEG        CGCAGCCGGAAACTGACGGGGAAACTCAAGCTGGAACAGAAAGTTCAGCCGGCGCGAGTT
179
***** * *****

ME          CGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT 225
26-N6      CGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT 226
RH          CGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT 225
VEG        CGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT 225
*****

```

Amostra nº 27, Gene SAG3

SeqA Name	Len (nt)	SeqB Name	Len (nt)	Score	
1	RH	2	ME	225	96
1	RH	3	VEG	225	98
1	RH	4	27-N6	228	96
2	ME	3	VEG	225	96
2	ME	4	27-N6	228	98
3	VEG	4	27-N6	228	96

```

ME          -TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAG
59
27-N6      TTCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAG
60
RH          -TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAG
59
VEG        -TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAG
59
*****

ME          TTGCTGGGAACCCAGAAAGTGGGAGAGGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGAT
119
27-N6      TTGCTGGGATCCCCAGAAAGTGGGAGAGRGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGAT
120
RH          TTGCCGGGAACCCAGAAAGTGGGGGAGAGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGAT
119
VEG        TTGCCGGGAACCCAGAAAGTGGGGGAGAGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGAT
119
****  ****  *****  ***  *****

ME          TGCAGCCAGGAACTGACGGGGAAACTCAAGCTGGAACAGGAAGTTCAGCCGGCGCGAGTT
179
27-N6      YGCAGCCAGGAACTGACGGGGAAACTCAAGCTGGAACAGRAAGTTCAGCCGGCGCGAGTT
180
RH          TGCAGCCGGGAACTGAAGGGGAAAGTCAAGCTGGAACAGAAAGTTCAGCCGGCGCGAGTT
179
VEG        CGCAGCCGGGAACTGACGGGGAAACTCAAGCTGGAACAGAAAGTTCAGCCGGCGCGAGTT
179
*****  *  *****  *****  *****

ME          CGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT-- 225
27-N6      CGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGTGA 228
RH          CGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT-- 225
VEG        CGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT-- 225
*****

```

Amostra nº 28, Gene SAG3

SeqA Name	Len (nt)	SeqB Name	Len (nt)	Score		
1	RH	225	2	ME	225	96
1	RH	225	3	VEG	225	98
1	RH	225	4	28-N6	228	96
2	ME	225	3	VEG	225	96
2	ME	225	4	28-N6	228	96
3	VEG	225	4	28-N6	228	96

```

ME          -TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAG
59
28-N6      TTCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAG
60
RH          -TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAG
59
VEG        -TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAG
59

```

```

ME          TTGCTGGGAACCCAGAAAGTGGGAGAGGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGAT
119
28-N6      TTGCYGGGAACCCAGAAAGTGGGRGAGRGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGAT
120
RH          TTGCCGGGAACCCAGAAAGTGGGGGAGAGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGAT
119
VEG        TTGCCGGGAACCCAGAAAGTGGGGGAGAGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGGAT
119

```

**** *****

```

ME          TGCAGCCAGGAAGTACGGGGAACTCAAGCTGGAACAGGAAGTTCAGCCGGCGCGAGTT
179
28-N6      YGCAGCCRGRAACTGACGGGGAACTCAAGCTGGAACAGRAAGTTCAGCCGGCGCGAGTT
180
RH          TGCAGCCGGGAAGTGAAGGGGAAAGTCAAGCTGGAACAGAAAGTTCAGCCGGCGCGAGTT
179
VEG        CGCAGCCGGGAAGTACGGGGAACTCAAGCTGGAACAGAAAGTTCAGCCGGCGCGAGTT
179

```

***** * ***** ***** ***** *****

```

ME          CGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT-- 225
28-N6      CGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGTGA 228
RH          CGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT-- 225
VEG        CGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT-- 225

```

Amostra nº 29, Gene SAG3

SeqA Name	Len (nt)	SeqB Name	Len (nt)	Score		
1	RH	225	2	ME	225	96
1	RH	225	3	VEG	225	98
1	RH	225	4	29-N6	229	96
2	ME	225	3	VEG	225	96
2	ME	225	4	29-N6	229	96
3	VEG	225	4	29-N6	229	97

```

ME          -TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAG
59
29-N6      TTCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAG
60
RH          -TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAG
59
VEG        -TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAGAG
59

```

```

ME          TTGCTGGGAACCCAGAAAGTGGGAGAGGGCGGAGGCGGCCATCC-AGGAAGCGGAGGA
118
29-N6      TTGCYGGGAACCCAGAAAGTGGGRGAGAGGCGGAGGCGGCCATCCCAGGAAGCGGAGGA
120
RH          TTGCCGGGAACCCAGAAAGTGGGGGAGAGGCGGAGGCGGCCATCC-AGGAAGCGGAGGA
118
VEG        TTGCCGGGAACCCAGAAAGTGGGGGAGAGGCGGAGGCGGCCATCC-AGGAAGCGGAGGA
118

```

**** *****

```

ME          TTGCAGCCAGGAACTGACGGGGAAACTCAAGCTGGAACAGGAAGTTCAGCCGGCGCGAGT
178
29-N6      TYGCAGCCRGRAACTGACGGGGAAACTCAAGCTGGAACAGRAAGTTCAGCCGGCGCGAGT
180
RH          TTGCAGCCGGGAACTGAAGGGGAAAGTCAAGCTGGAACAGAAAGTTCAGCCGGCGCGAGT
178
VEG        TCGCAGCCGGGAAACTGACGGGGAAACTCAAGCTGGAACAGAAAGTTCAGCCGGCGCGAGT
178

```

* ***** *

```

ME          TCGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT-- 225
29-N6      TCGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGTGA 229
RH          TCGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT-- 225
VEG        TCGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT-- 225

```

Amostra nº 46, Gene SAG3

SeqA Name	Len (nt)	SeqB Name	Len (nt)	Score
1 RH	225	2 ME	225	96
1 RH	225	3 VEG	225	98
1 RH	225	4 46-N6	244	96
2 ME	225	3 VEG	225	96
2 ME	225	4 46-N6	244	100
3 VEG	225	4 46-N6	244	96

```

ME          -----TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCGCCCTTCTGCAACGTCAA
51
46-N6      AATTTCCATTCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCGCCCTTCTGCAACGTCAA
60
RH          -----TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCGCCCTTCTGCAACGTCAA
51
VEG        -----TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCGCCCTTCTGCAACGTCAA
51

```

```

ME          AGTGAGAGTTGCTGGGAACCCCAGAAAGTGGGAGAGGGCGGAGGCGCCATCCAGGAAG
111
46-N6      AGTGAGAGTTGCTGGGAACCCCAGAAAGTGGGAGAGGGCGGAGGCGCCATCCAGGAAG
120
RH          AGTGAGAGTTGCCGGGAACCCCAGAAAGTGGGGAGAGGCGGAGGCGCCATCCAGGAAG
111
VEG        AGTGAGAGTTGCCGGGAACCCCAGAAAGTGGGGAGAGGCGGAGGCGCCATCCAGGAAG
111

```

***** * * * * *

```

ME          CGGAGGATTGCAGCCAGGAAGTACGGGGAAACTCAAGCTGGAACAGGAAGTTCAGCCGG
171
46-N6      CGGAGGATTGCAGCCAGGAAGTACGGGGAAACTCAAGCTGGAACAGGAAGTTCAGCCGG
180
RH          CGGAGGATTGCAGCCGGAAGTGAAGGGGAAAGTCAAGCTGGAACAGAAAGTTCAGCCGG
171
VEG        CGGAGGATCGCAGCCGGAAGTACGGGGAAACTCAAGCTGGAACAGAAAGTTCAGCCGG
171

```

***** * * * * *

```

ME          CGCGAGTTCGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT-----
225
46-N6      CGCGAGTTCGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGTGAACTT
240
RH          CGCGAGTTCGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT-----
225
VEG        CGCGAGTTCGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCTTCTCGGTCTCCTTGT-----
225

```

```

ME          ----
46-N6      AAAA 244
RH          ----
VEG        ----

```

Amostra nº 47, Gene SAG3

SeqA Name	Len (nt)	SeqB Name	Len (nt)	Score		
1	47-N6	234	2	RH	225	96
1	47-N6	234	3	ME	225	99
1	47-N6	234	4	VEG	225	96
2	RH	225	3	ME	225	96
2	RH	225	4	VEG	225	98
3	ME	225	4	VEG	225	96

```

RH          ---TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAG
57
VEG        ---TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAG
57
47-N6     ATTTCTTGCCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAG
60
ME        ---TCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTTCTGCAACGTCAAAGTGAG
57

```

```

RH          AGTTGCCGGGAACCCAGAAAGTGGGGGAGAGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGG
117
VEG        AGTTGCCGGGAACCCAGAAAGTGGGGGAGAGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGG
117
47-N6     AGTTGCTGGGAACCCAGAAAGTGGGAGAGGGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGG
120
ME        AGTTGCTGGGAACCCAGAAAGTGGGAGAGGGGCGGAGGCGGCCATCCAGGAAGCGGAGG
117

```

```

RH          ATTGCAGCCGGAACTGAAGGGGAAAGTCAAGCTGGAACAGAAAGTTCAGCCGGCGCGAG
177
VEG        ATCGCAGCCGGAACTGACGGGGAAACTCAAGCTGGAACAGAAAGTTCAGCCGGCGCGAG
177
47-N6     ATTGCAGCCAGGAACTGACGGGGAAACTCAAGCTGGAACAGGAAGTTCAGCCGGCGCGAG
180
ME        ATTGCAGCCAGGAACTGACGGGGAAACTCAAGCTGGAACAGGAAGTTCAGCCGGCGCGAG
177

```

** ***** * ***** ***** ***** ***** ***** *****

```

RH          TTCGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCCTTCTCGGTCTCCTTGT----- 225
VEG        TTCGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCCTTCTCGGTCTCCTTGT----- 225
47-N6     TTCGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCCTTCTCGGTCTCCTTGTGAATGT 234
ME        TTCGCGAATGGCTTCCGTTGCCCTGGCGTTCCCTTCTCGGTCTCCTTGT----- 225

```

8.0 Referências Bibliográficas

- Ajzenberg D, Cogne N, Paris L, Bessières MH, Thulliez P, Filisetti D, Pelloux H, Marty P, Dardé ML. 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, Dumètre A, Dardé ML. Multiplex PCR for typing strains of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol*. 2005; 43 (4): 1940-1943.
- Aubert D, Maine GT, Villena I, Hunt JC, Howard L, Sheu M, Brojanac S, Chovan LE, Nowlan SF, Pinon JM. Recombinant antigens to detect *Toxoplasma gondii* -specific immunoglobulin M in human sera by enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol*. 2000; 38 (3): 1144-1150.
- Barbosa IR, de Carvalho Xavier Holanda CM, de Andrade-Neto VF. Toxoplasmosis screening and risk factors among pregnant females in Natal, northeastern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2009; 103(4): 377-82.
- Belford-Neto R, Nussenblatt V, Rizzo L, Muccioli C, Silveria C, Nussenblatt R, Khan A, Sibley LD, Belford-Jr R. High prevalence of unusual genotypes of *Toxoplasma gondii* infection in pork meat samples from Erechim, Southern Brazil. *An Acad Bras Cienc*. 2007; 79(1): 111-114.

- Boothroyd CJ, Grigg ME. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? *Curr Opin Microbiol.* 2002; 5: 438-442.

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

- Cavalcante GT, Aguilar DM, Camargo LM, Labruna MB, de Andrade HF, Meireles LR, Dubey JP, Thulliez P, Dias RA, Gennari SM. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in humans from rural Western Amazon, Brazil. *J Parasitol.* 2006; 92(3): 647-9.

- Chen, SC, Halliday CL, Meyer W. A review of nucleic acid-based diagnostic tests for systemic mycoses with emphasis on polymerase chain reaction-based assays. *Med Mycol.* 2002; 40: 333-57.

- 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 (2)149-57.

- Cristina N, Liaud M-F, Santoro F, Oury B, Ambroise-Thomas P. A family of repeated sequences in *Toxoplasma gondii*: cloning, sequence analysis and use in strain characterization. *Exp Parasitol*. 1991 a; 73: 73-81.

- Cristina N, Oury B, Ambroise-Thomas P, Santoro F. Restriction-Fragment-Lenght Polymorphisms among *Toxoplasma gondii* strains. *Parasitol. Res*. 1991 b; 77: 266-268.

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

- Dardé ML, Bouteille B, Pestre-Alexandre M. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. *J Parasitol*. 1992; 75 (5): 786-94.

- Dardé ML, Bouteille B, Pestre-Alexandre M. Isoenzymic characterization of seven strains of *Toxoplasma gondii* by isoelectrofocusing in polyacrylamide gels. *Am J Trop Med Hyg*. 1988; 39(6): 551-8.

- Derouin F. Pathogeny and immunological control of toxoplasmosis. *Braz. J. Med Biol Res*. 1992; 25: 1163-1169.

- Dubey JP. The history of *Toxoplasma gondii* – The first 100 years. *J Eukaryot Microbiol.* 2008; 55 (6): 46-475.
- 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 (2): 267-299.
- Dubey JP, Sundar N, Gennari SM, Minervino AHH, Farias NAR, Ruas JL, dos Santos TRB, Cavalcante GT, Kwok OCH, Su C. 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; 182-188.
- Ferreira AM, Vitor RWA, Gazzinelli RT, Melo MN. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. *Infect Genet and Evol.* 2006; 22-31.
- Ferreira IMR, Vidal JE, Costa-Silva TA, Meira CS, Hiramoto RM, Oliveira ACP, Pereira-Chiocola VL. *Toxoplasma gondii*: Genotyping of strains from Brazilian AIDS patients with cerebral toxoplasmosis by multilocus PCR-RFLP markers. *Exp Parasitol.* 2008; 221-227.
- Ferrie RM, Schwartz MJ, Robertson NH, Vaudin S, Super M, Malone G, Little S. Development, multiplexing and application of ARMS tests for common mutations in the CFTR gene. *Am J Hum Genet.* 1992; 51; 251-62.

- Fuentes I, Rubio JM, Ramírez C, Alvar J. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. *J Clin Microbiol.* 2001; 39 (4): 1566-70.

- Foulon W, Naessens A, Mahler T, De Waele M, De Catte L, De Meuter F. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *J Obstet Gynecol.* 1990; 76 (5): 769-772.

- Foulon W, Pinon J-M, Stray-Pedersen B, Pollak A, Lappalainen M, Decoster A, Villena I, Jenun P, Hayde M, Naessens A. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: a multicenter evaluation of different diagnostic parameters. *Am. J Obstet Gynecol* 1999 a; 181 (4): 843-847.

- Foulon W, Villena I, Stray-Pedersen B, Decoster A, Lappalainen M, Pinon J-M, Jenun P, Hedman K, Naessens A. Treatment of toxoplasmosis during pregnancy: a multicenter study of impact on fetal transmission and children's sequelae at age 1 year. *Am J Obstet Gynecol.* 1999 b; 180 (2): 410-415.

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

- Frenkel JK, Dubey JP, Miller NL. *Toxoplasma gondii* life cycle in cats. *J Exp Med.* 1970; 125(1):636-62.

- Gallego C, Saavedra-Matiz C. Direct genotyping of animal and human isolates of *Toxoplasma gondii* from Colombia (South America). *Acta Tropica*. 2006; 161-167.
- 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*. 2001 a; 294: 161-165.
- 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*. 2001 b; 39 (10): 398-400.
- Grig ME, Ganatra J, Boothroyd JC, Margolis TP. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. *J Infect Dis*. 2001 c; 184 (5): 633-9.
- Gross U, Bohne W, Soète M, Dubremetz JF. Developmental differentiation between tachyzoites and bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Today*. 1996; 12: 30-33.
- Grover CM, Thulliez P, Remington JS, Boothroyd JC. Rapid prenatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid. *J Clin Microbiol*. 1990; 28 (10): 2297-2301.

- Guimarães ACS, Kaearayashi M, Borges MM, Toleza JE, Andrade Jr HF. Regional variation in toxoplasmosis seronegativity in the São Paulo metropolitan region. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1993; 35 (6): 479-483.
- Guo Z-G, Gross U, Johnson AM. *Toxoplasma gondii* virulence markers identified by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. *Parasitol Res*. 1997; 83: 458-463.
- Habegger de Sorrentino A, López R, Motta P, Marinic K, Sorrentino A, Iliovich E, Rubio AE, Quarleri J, Salomón H. HLA Class II involvement in HIV-associated Toxoplasmic encephalitis development. *Clin Immunol*. 2005; 115(2): 133-7.
- Hill DE, Chirukandoth S, Dubey JP. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Anim Health Res Rev*. 2005; 6(1): 41-61.
- Hill DE, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect*. 2002; 8: 634-640.
- 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: 695-699.

- 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 (6): 1411-14.

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

- Hsu MC, Chen KW, Lo HJ, Chen YC, Liao MH, Lin HY, Li SY. Species identification of medically important fungi by use of real-time LightCycler PCR. *J Medical Microbiol.* 2003; 52: 1071-1076.

- Khan A, Fux B, Su C, Dubey JP, Darde ML, Ajioka JW, Rosenthal BM, Sibley LD. Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104(37): 14872-7.

- Khan A, Taylor S, Su C, Mackey AJ, Boyle J, Cole R, Glover D, Tang K, Paulsen IT, Berriman M, Boothroyd JC, Pfefferkorn ER, Dubey JP, Ajioka JW, Roos DS, Wootton JC, Sibley D. Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. *Nucleic Acids Res.* 2005; 33 (9): 2980- 92.

- Kim K, Weiss LM. *Toxoplasma*: the next 100 years. *Microbes infect.* 2008; 10: 978-984.

- Marcolino PT, Silva DAO, Leser PG, Camargo ME, Mineo JR. Molecular markers in acute and chronic phases of human toxoplasmosis: determination of immunoglobulin G avidity by western blotting. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2000; 7 (3): 384-389.

- Miller AS, Dykes DD, Polesky H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16 (3): 1215.

- Mioranza Sde L, Meireles LR, Mioranza EL, Andrade Junior HF. Serological evidence of acute *Toxoplasma gondii* infection in pregnant woman in Cascavel, Paraná. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008; 41(6): 628-34.

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

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

- Nakajima-lujima S, Hamada H, Reddy P, Kakunaga S. Molecular structure of the human cytoplasmic fj-actin gene: Interspecies homology of sequences in the introns. *Proc Natl Acad Sci.* 1985; 82 (18): 6133-7.

- Nowakowska D, Colón I, Remington JS, Grigg M, Golab E, Wilczynski J, Sibley LD. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multiplex PCR and peptide-based serological testing of samples from infants in Poland diagnosed with congenital toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(4): 1382-9.

- 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 (15): 1888-1890.

- Reikvam A, Lorentzen-Styr AM. Virulence of different strains of *Toxoplasma gondii* and host response in mice. *Nature.* 1976; 261(5560):508-9.

- Remington JS, McLeod R, Thulliez P, Desmonts G. *Toxoplasmosis. in infectious diseases of the fetus and newborn infant.* 5^a edição. Saunders, 2001. cap. 5, p. 205-346.

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

- Ribeiro AC, Mutis MS, Fernandes O. Association of the presence of residual anti-*Toxoplasma gondii* IgM in pregnant woman and their respective family groups in Miracema, Northwest, Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008; 103(6): 591-4.

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

- Seng S, Yokoyama M, Suzuki R, Maki Y, Kato M, Lim C, Zayatiin B, Inoue N, Xuan X, Igarashi I, Nagasawa H, Fujisaki K, Mikami T, Suzuki N, Toyoda Y. Expression of SAG1 of *Toxoplasma gondii* in transgenic mice. *Parasitol Res*. 2000; 86: 263-269.

- Sibley LD. *Toxoplasma gondii*: perfecting an intracellular life style. *Traffic*. 2003; 4: 581-586.

- Sibley LD, Boothroyd JC. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature*. 1992; 359 (6390): 82-5.

- Tuuminen T, Seppanen H, Pitkanen EM, Palomaki P, Kapyaho K. Improvement of immunoglobulin M capture immunoassay specificity: *Toxoplasma* antibody detection method as a model. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(1): 270-273.

- Varella IS, Wagner MB, Darella AC, Nunes LM, Müller RW. Seroprevalence of toxoplasmosis in pregnant woman. *J Pediatr.* (Rio J). 2003; 79(1):69-74.

- 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: 31-38.

- 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 Pediat.* 1999; 158 (8): 645-649.

- Weiss JB. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. *Clin Microbiol Rev.* 1995; 113-130.

Apêndices

Preparo de Reagentes

Desoxi-Nucleotídeos Trifosfato (dNTPs))

Desoxiadenosina trifosfato (dATP)	2,5 mM
Desoxicitosina trifosfato (dCTP)	2,5 mM
Desoxiguanidina trifosfato (dGTP)	2,5 mM
Desoxitimidina trifosfato (dTTP)	2,5 mM

Tampão Tris-EDTA ácido acético (TAE) 50X

Tris base	242 g
ácido acético glacial	57,1 ml
EDTA 0,4 M pH 8	125 ml
H ₂ O Milli Q qsp	1000 ml

Autoclavar. Guardar a 4°C.

EDTA (solução estoque 0.5M, pH 8)

EDTA	186.1g
H ₂ O MilliQ	800mL

Agitar, com aquecimento até 45°C. Ajustar para pH= 8 com NaOH (10N).

Completar o volume para 1000mL. Armazenar em geladeira.

NaOH 10N

NaOH	400g
H ₂ O MilliQ	700mL

Agitar, completar o volume para 1000mL. Armazenar em geladeira.

Solução de lise nuclear [10X]

Tris-HCl pH8,0	100mM
NaCl	4M
EDTA pH8,2	20mM

Preparo:

Tris-HCl	10mL
NaCl	23.38g
EDTA 0,5M pH8,2	4mL
H ₂ O MilliQ	100mL

SDS 10%(Duodecil sulfato de sódio)

SDS	10g
Qsp H ₂ O MilliQ	100mL

Dissolver em banho Maria 56°C. Não agitar. Armazenar em temperatura ambiente.

Etanol 70%

Etano absoluto	70mL
Qsp H ₂ O MilliQ	100mL

Tampão Tris-EDTA (TE)

Tris.HCl 2M pH 7.6	1mL
EDTA 0.2M pH 8	1mL
Qsp H ₂ O MilliQ	200mL

EDTA (solução estoque 0.2M, pH 8)

EDTA	14.88g
H ₂ O MilliQ	150mL

Agitar, com aquecimento até 45°C. Ajustar para pH= 8,0 com NaOH (10N).

Completar o volume para 200mL. Armazenar em geladeira.

NaCl 6M

NaCl	70.13g
H ₂ O MilliQ	180mL

Agitar. Completar o volume para 200mL. Armazenar em geladeira.

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 09.05.07, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0326/07**, intitulado: "TIPAGEM MOLECULAR DE TOXOPLASMA GONDII.ANÁLISE DE LÍQUIDOS AMNIÓTICOS DE GESTAÇÕES COM SUSPEITA DE TOXOPLASMOSE CONGÊNITA", apresentado pelo **DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA**.

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: **Profª. Drª. Thelma Suely Okay**

Pesquisador(a) Executante: **Mariana Vitule Brito de Souza**

CAPPesq, 09 de maio de 2007



PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

