

Isabelle Martins Ribeiro Ferreira

**GENOTIPAGEM DE ISOLADOS DE *Toxoplasma*
gondii EM PACIENTES COM AIDS E
TOXOPLASMOSE CEREBRAL**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Ciências da
Coordenadoria de Controle de Doenças da
Secretaria de Estado da Saúde de São
Paulo, para obtenção do Título de Mestre
em Ciências.**

Área de Concentração:
Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientadora:
Profa. Dr^a. Vera Lucia Pereira-Chioccolla

SÃO PAULO

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Ferreira, Isabelle Martins Ribeiro

Genotipagem de isolados de *Toxoplasma gondii* em pacientes com Aids e toxoplasmose cerebral / Isabelle Martins Ribeiro Ferreira - São Paulo, 2008.

Dissertação (mestre) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientadora: Vera Lucia Pereira-Chioccolla

1. Genótipo 2. *Toxoplasma* 3. Reação em cadeia da polimerase
4. Poliformismo de fragmento de restrição 5. Toxoplasmose cerebral
6. Síndrome de imunodeficiência adquirida

SES/CCD/CD-191/08

Dedicatória

Aos meus pais, Paulo de Tarso (in memorian) e Maria da Graça, que me incentivaram em todas as etapas da minha vida, e acima de tudo pelo amor e dedicação.

*Ao meu esposo Adilson,
Por todo seu amor, apoio e compreensão.*

*Aos meus filhos Gabrielle e Lucas,
Pelas alegrias, carinho e admiração que me estimulam a ser uma mãe cada vez melhor.*

AGRADECIMENTOS

À Deus acima de tudo.

À Prof^a **Dr^a Vera Lucia Pereira Chioccola**, pela orientação deste trabalho, dedicação, amizade e exemplo profissional.

Às minhas amigas **Thaís Alves Costa Silva e Cristina da Silva Meira**, pelo companheirismo, incentivo nos momentos difíceis e principalmente pela valiosa amizade.

Ao amigo **Fábio Colombo**, pela amizade e ajuda desde a minha entrada no laboratório de biologia molecular.

Aos amigos da parasitologia e biologia molecular **Rafael Tonini, Aparecida Helena, Marilena dos Anjos, Débora Picanço, Gabi Motoie, Tamara Guelli, Elaine Corneta, Denise Teixeira, Juliana Reimão e Simone Aquino** pelas sugestões e agradável convivência.

Às funcionárias do Laboratório de Biologia Molecular, **Margareth e Cida** pelo apoio técnico e amizade.

Ao Dr. **Roberto Hiramoto**, chefe da Seção de Parasitoses Sistêmicas e aos funcionários, pela realização da sorologia dos pacientes.

Á **Dr^a Rosângela Rodrigues** chefe do Laboratório de Genotipagem HIV e ao **Dr. Luís Fernando Brígido** por disponibilizar o seqüenciador.

Ao **Antônio Flávio Siqueira e João Leandro Ferreira** pela ajuda na realização dos sequenciamentos.

Aos membros da banca de qualificação, **Dr^a Rosangela Rodrigues, Dr^a Maria Helena Matté e Dr Rodrigo Martins Soares** pelas sugestões e críticas oferecidas para o enriquecimento deste trabalho.

Aos pesquisadores científicos, biólogos, técnicos e auxiliares das seções de Parasitoses Sistêmicas e Enteroparasitoses, que contribuíram para minha formação profissional.

Às minhas irmãs **Daniele e Gisele** e ao meu irmão **Paulo de Tarso**, pelo carinho e incentivo que se mantém mesmo à distância.

Aos meus sogros **Ilma Ferreira e Adilson Ferreira** pela ajuda e carinho de sempre.

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

Este trabalho teve apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - Processo nº 05/03052-5.

Isabelle Martins Ribeiro Ferreira teve apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - Processo nº 06/52672-9.

*“Grandes realizações não são feitas por impulso, mas por uma soma de
pequenas realizações”.*

Vincent Van Gogh

Resumo

Este estudo investigou as características genotípicas de isolados de 87 pacientes com toxoplasmose cerebral e AIDS tratados no Instituto de Infectologia Emílio Ribas - São Paulo. O diagnóstico laboratorial da toxoplasmose cerebral foi baseado na sorologia e PCR positivas realizadas em amostras de sangue e/ou líquido cefalorraquidiano. As genotipagens foram realizadas utilizando-se quatro marcadores (5'- SAG2, 3'- SAG2, SAG3 e GRA6). Cada um dos marcadores distingue as três linhagens clonais de *Toxoplasma gondii* designadas como tipos I, II e III, tratando-se os produtos de PCR amplificados com enzimas de restrição (PCR-RFLP). Foram obtidos os seguintes resultados: 40 pacientes (46%) foram infectados com cepas do tipo I; 4 (4%) com as do tipo III; 13 (15%), com cepas polimórficas (genótipos incomuns); 6 pacientes com cepas do tipo I ou II; e 15 (17%) dos pacientes foram infectados com cepas incapazes de serem genotipadas pelos marcadores utilizados. A PCR-RFLP também identificou 9 (11%) isolados clínicos como sendo do tipo II, genótipo ainda não descrito na América do Sul. Contudo, o sequenciamento dos produtos gerados na "nested"-PCR de uma amostra classificada como tipo II (marcador SAG3) e de isolados polimórficos (marcadores 5'-SAG2, SAG3 e GRA6) mostrou diferenças nucleotídicas quando comparadas com as cepas clonais dos tipos I, II e III. Estes dados confirmam estudos prévios realizados na América do Sul demonstrando que cepas de *T.gondii* prevalentes no Brasil são altamente polimórficas.

Abstract

This study investigated the genetic characteristics of the *T. gondii* strains isolated from 87 patients with cerebral toxoplasmosis and AIDS, treated in Instituto de Infectologia Emílio Ribas - Sao Paulo State. The laboratorial diagnosis of cerebral toxoplasmosis was based on positive serological exams and PCR of blood and/or cerebrospinal fluid. Four markers (5'- SAG2, 3'- SAG2, SAG3 and GRA6) were chosen to analyze the samples. Each having clear resolution to distinguish the three clonal lineages after PCR amplified targets were treated with restriction enzyme digestion (PCR-RFLP). The genotyping provided the following results: 40 patients (46%) were infected with strains classified as type I; 4 (4%), as type III; 13 (15%) were infected with polymorphic strains (unusual genotype); 6 patients with type I or II alleles; and 15 (17%) patients had strains not classified for any marker. PCR-RFLP, also classified 9 (11%) clinical isolates as type II, which is uncommon in South America. However, the sequencing of the nested-PCR products (of SAG3 marker) of type II and polymorphic isolates (of 5'-SAG2, SAG3 and GRA6 markers) showed a nucleotide polymorphism compared with the archetypal clonal genotypes (types I, II and III) and these isolates were considered as polymorphic strains. The markers used here were inappropriate to distinguish the most isolates considered as polymorphic strains. These data confirm other studies showing the high rate of genetic polymorphism in *T. gondii* strains isolated in Brazil.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C - Graus centígrados

AIDS - “Acquired immunodeficiency syndrome” (Síndrome da imunodeficiência adquirida)

CD4+ - “Cluster of Differentiation”

CDC - “Centers for Disease Control”

DNA - “Deoxiribonucleic acid” (Ácido desoxirribonucléico)

D.O. - Densidade ótica

EDTA - “Ethylenediaminetetraacetic acid” (Ácido etilenodiamino tetra - acético)

ELISA – “Enzyme-linked Immunosorbent Assay”

et al. - e outros

g - Aceleração da gravidade

HAART - “Highly active antiretroviral therapy”

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

IFI - Imunofluorescência indireta

IgA - Imunoglobulina da classe A

IgE - Imunoglobulina da classe E

IgG - Imunoglobulina da classe G

IgM - Imunoglobulina da classe M

IIER - Instituto de Infectologia Emílio Ribas

Kb - Kilobase

LCR - Líquido cefalorraquidiano

Mb - Megabase

PCR- “Polymerase Chain Reaction” (Reação em cadeia da polimerase)

pb - Pares de base

PH - concentração de hidrogênio iônico

RFLP-“Restriction fragment length polymorphisms” (Polimorfismo de comprimento de fragmentos de DNA gerados por enzima de restrição)

SNC - Sistema nervoso central

TBE - Tris/ Borato/ EDTA

Th1 - Resposta celular do tipo I

Tris - HCl – Tris/ ácido clorídrico

UV - Ultravioleta

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1 - Localização dos genes nos cromossomos e as principais proteínas codificadas.....	34
Tabela 2 - Iniciadores utilizados no primeiro PCR (multiplex) e segundo PCR (nested) e enzimas de restrição.....	49
Tabela 3 - Descrição das amostras usadas para o seqüenciamento do DNA.....	50
Tabela 4 - Genótipos de <i>T. gondii</i> de pacientes com AIDS e toxoplasmose cerebral.....	60
Figura 1 - Oocisto esporulado (A); taquizoítos (B); cisto com bradizoítos (C).....	22
Figura 2 - Ciclo de <i>Toxoplasma gondii</i>	22
Figura 3 - Mapa genômico de <i>T.gondii</i>	35
Figura 4 - Produto da PCR da amostra analisada em gel de agarose 2%.....	51
Figura 5 - Cromossomos de <i>T.gondii</i> e a localização dos marcadores.....	52
Figura 6 - Localização do gene SAG2 (A). Localização dos iniciadores F4 e R, na região 5' (1° PCR) (B), e F3 e R3, na região 3' (1° PCR) (C). 2° PCR com os iniciadores internos F e R2 para o marcador 5'-SAG2 que amplificaram um produto de 242 pb (D), tratados com <i>Sau3AI</i> geraram um perfil que distingue o genótipo do tipo III (F).	

Os iniciadores internos F2 e R (marcador 3'- SAG2) amplificaram um produto de 222 pb (E), tratados com <i>HhaI</i> geraram um perfil que distingue o tipo II (G).....	54
Figura 7 - Localização do gene SAG3 (A). Localização dos iniciadores externos F e R (1ºPCR) (B). 2ºPCR com os iniciadores internos F1 e R1 que amplificaram produtos de 225 pb (C), tratados com <i>NciI</i> geraram um perfil que distingue o genótipos I, II e III (D).....	55
Figura 8 - Localização do gene GRA6 (A). Localização dos iniciadores F e R (1ºPCR) (B). 2ºPCR com os iniciadores internos F1 e R1 que amplificaram produtos de 351 pb (C), tratados com <i>MseI</i> geraram um perfil que distingue o genótipos I, II e III (D).....	56
Figura 9 - Distribuição dos genótipos determinados pela PCR-RFLP do locus SAG2, SAG3 e GRA6, das amostras <i>T.gondii</i> de isolados de pacientes com AIDS e toxoplasmose cerebral.....	61
Figura 10 - RFLP - produto amplificado de amostras clínicas polimórficas. 5'-SAG2 (A) e 3'-SAG2 (B).....	61
Figura 11 - Análise do polimorfismo de nucleotídeos nas seqüências dos genes GRA6 (A), SAG3 (B) e 5'-SAG2 (C). Amostras de <i>T. gondii</i> : RH (I); ME-49 (II); VEG (III); e as amostras clínicas CSa, CSb e CSc.....	62

ÍNDICE

1.Introdução.....	17
1.1. Epidemiologia da toxoplasmose.....	17
1.2. Agente etiológico, morfologia e ciclo biológico	19
1.3. Transmissão.....	23
1.4. Formas da doença.....	23
1.4.1. Toxoplasmose em imunocompetentes.....	23
1.4.2. Toxoplasmose congênita.....	24
1.4.3. Toxoplasmose cerebral e AIDS.....	26
1.4.4. Toxoplasmose ocular.....	28
1.5. Diagnóstico Laboratorial.....	29
1.5.1. Sorológico.....	29
1.5.2. Molecular.....	31
1.6. Características gênicas de <i>Toxoplasma gondii</i>	33
1.6.1. Tipos de cepas.....	36
 2. Objetivos	40
2.1. Objetivo geral.....	40
2.2. Objetivos específicos.....	40
 3. Materiais e Métodos.....	41
3.1. População de estudo.....	41
3.2. Considerações éticas.....	41
3.3. Animais experimentais e <i>T.gondii</i>	42
3.3.1. Manutenção e obtenção das cepas de <i>T. gondii</i>	42
3.4. Extração de DNA.....	43

3.4.1. Amostras de sangue.....	43
3.4.2. Amostras de LCR.....	44
3.4.3. Cepas de <i>T. gondii</i>	44
3.5. Reação em cadeia de polimerase (PCR).....	44
3.5.1. PCR-Triagem.....	45
3.5.2. PCR-RFLP - para Genotipagem.....	45
3.5.2.1. Validação.....	45
3.5.2.2. Primeiro PCR (Multiplex).....	46
3.5.2.3. Segundo PCR (Nested).....	46
3.5.2.4. RFLP.....	46
3.6. Eletroforese em gel de agarose.....	47
3.7. Seqüenciamento do DNA	47
4. Resultados.....	51
4.1. PCR.....	51
4.2. Validação das reações de genotipagem.....	51
4.3. Caracterização genotípica das amostras clínicas.....	57
5. Discussão.....	63
6. Conclusões.....	68
7. Referências bibliográficas.....	69
8. Anexos.....	92
8.1. Anexo 1 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz.....	92

8.2. Anexo 2 - Parecer do Conselho Técnico e Científico do Instituto Adolfo Lutz.....	93
8.3. Anexo 3 - Ferreira IM, Vidal JE, Costa-Silva TA, Meira CS, Hiramoto RM, Penalva de Oliveira AC, Pereira-Chioccolla VL. Toxoplasma gondii: Genotyping of strains from Brazilian AIDS patients with cerebral toxoplasmosis by multilocus PCR-RFLP markers. Exp Parasitol. 2008; 118: 221-227.....	94

1.INTRODUÇÃO

1.1. Epidemiologia da toxoplasmose

A toxoplasmose é uma zoonose com ampla distribuição mundial. É causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii* que é um parasita intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, subclasse Coccidia, ordem Eucoccidia, podendo infectar diversas espécies de vertebrados (Montoya e Liensefield, 2004).

A infecção afeta ao redor de dois bilhões de pessoas no mundo (Tenter et al., 2000; Montoya e Liesenfeld, 2004). A maioria dos indivíduos infectados são assintomáticos, podendo resultar em infecção crônica com dormência dos parasitas dentro de cistos teciduais por toda a vida (Dubey, 1996; Tenter et al., 2000; Hill e Dubey, 2002). A reativação da infecção latente pode ocorrer em pacientes imunocomprometidos causando doença grave especialmente encefalite. A infecção por *T. gondii* é a maior causa de morbidade e mortalidade em crianças infectadas congenitamente e pacientes imunocomprometidos incluindo pacientes com AIDS (Dubey, 1996; Luft e Remington, 1992; Hill e Dubey, 2002).

Esta doença por ser altamente disseminada apresenta taxas de prevalência que variam em diversas regiões do mundo (Dubey e Beattie, 1988). As diferenças ocorrem em função de fatores geográficos, clima, hábitos culturais, alimentares e sociais (Remington et al., 2001).

A infecção por *T. gondii* possui uma prevalência mais alta em regiões de clima tropical e subtropical, com umidade e temperaturas altas favorecendo a sobrevivência dos oocistos no meio ambiente, já que precisam de calor e umidade para se tornarem infectantes (esporulados). Em regiões de clima seco os níveis são mais baixos (Barragan e Sibley, 2003). Em crianças, a soroprevalência é relativamente baixa, aumentando de acordo com a idade, com a exposição a mais fatores de risco durante o transcorrer da vida (Camargo, 1996; Tenter et al., 2000).

A forma crônica assintomática existe em 80% a 90% de pessoas infectadas, representando um terço da população mundial. Somente 10% a 20% de casos de infecção por *T.gondii* em adultos e crianças são sintomáticos (Dubey, 1996; Hill e Dubey, 2002).

A soroprevalência mundial varia de 15 a 85% na população humana (James et al., 1996). Na Europa, América Central e América do Sul a prevalência sorológica da infecção por *T.gondii* é elevada, atingindo em torno de 50 a 80% da população adulta. Nos Estados Unidos e na Inglaterra estima-se que 16 a 40% da população estejam infectados (Dubey, e Beattie, 1988; Hill e Dubey, 2002; Bahia-Oliveira et al., 2003). A África apresenta também elevada soroprevalência, variando de 35% a 84% em diferentes países africanos (Tenter et al., 2000). Essa situação é mais grave, pois aproximadamente 25 milhões de africanos estão expostos ao HIV/AIDS (UNAIDS, 2005).

A soroprevalência no Brasil é de 50 a 80% (Cantos et al., 2000) dependendo da região. Em Recife essa taxa varia de 64 a 79% (Coelho et al., 2003); no Rio de Janeiro atinge 79%; em Manaus 71%; entre indígenas brasileiros 52 a 65% (Amendoeira et al., 1999); na grande São Paulo 58,9% da população (Guimarães et al., 1993; Amendoeira et al., 1999). Em um estudo mais recente, atingiu 57,10% das mulheres atendidas na rede de saúde pública de São Paulo no período de 2001 a 2005 (Kawarabayashi et al., 2007).

Surtos epidêmicos de toxoplasmose têm sido relatados com certa frequência em várias regiões do mundo, sempre relacionados à presença de gatos, ingestão de carne mal cozida ou à combinação de ambos os fatores (Coutinho et al., 1982). Surtos associados ao consumo de água em alguns municípios também têm sido relatados (Bowie et al., 1997). No Brasil áreas de alta endemicidade têm sido descritas uma delas a região de Erechim no Rio Grande do Sul, onde o manuseio de carne crua para confecção de lingüiça e similares tem sido responsável pela elevada prevalência da doença, incluindo casos de retinocoroidites (Glasner et al., 1992). A presença de gatos e roedores em cerca de 90% das propriedades de criação

de suínos nessa região parece ter importância nos elevados índices da doença (Araújo et al., 2000). Outra área de maior endemicidade encontra-se no norte do estado do Rio de Janeiro, onde a água oferecida à população, provavelmente poluída por fezes de gatos, vem sido incriminada como fonte de infecção (Bahia-Oliveira, 2003).

Os gatos são importantes na epidemiologia da toxoplasmose, uma vez que, um único cisto tecidual viável pode infectar felídeos, podendo este excretar milhões de oocistos, que permanecem viáveis no meio ambiente por longos períodos e são fonte de disseminação da infecção para herbívoros e outros animais que os ingerem e desenvolvem cistos em seus tecidos (Dubey, 1996; Hill et al., 2005).

No Brasil, diversos inquéritos sorológicos têm demonstrado a infecção dos gatos por *T.gondii*, com resultados variáveis, entre os diferentes autores. Na região metropolitana de São Paulo atinge cerca de 40% (Meireles et al., 2004). A alta prevalência de infecção por *T. gondii* na América do Sul e Central é provavelmente devida a altos níveis de contaminação do meio ambiente com oocistos (Dubey e Beattie, 1988; Glasner et al., 1992).

1.2. Agente etiológico, morfologia e ciclo biológico

O agente etiológico foi descoberto por Splendore em 1908 no Brasil, e no mesmo ano por Nicolle e Manceaux em roedores africanos na Tunísia. Foi confundido com os parasitas do gênero *Leishmania* e no ano seguinte, com o estudo do isolado e a observação de diferenças estruturais, foi proposto o novo gênero *Toxoplasma* (toxon = arco e plasma = corpo), e a espécie *Toxoplasma gondii*.

T.gondii possui uma estrutura subcelular característica do filo Apicomplexa denominada complexo apical, importante na motilidade e invasão na célula hospedeira. É composto pelo anel polar (em número de dois), conóide, microtúbulos subpeliculares e organelas secretórias denominadas roptrias, micronemas e grânulos densos. Devido à falta de

organelas locomotoras usa uma única forma de locomoção chamada “gliding motility” para promover a sua migração através da barreira biológica e a sua entrada na célula hospedeira (Rey, 2001; Soldati e Meissner, 2004).

As formas evolutivas do parasita são: oocistos contendo esporozoítos, taquizoítos e cistos contendo bradizoítos (Dubey et al., 1998).

Os oocistos são as formas infectantes provenientes do ciclo sexuado do hospedeiro definitivo, medem cerca de 10x12 μm e são liberados pelas fezes de gatos durante a infecção aguda por cerca de 7 a 10 dias (Figura 1 A). A esporulação ocorre no meio ambiente até 21 dias, formando no seu interior dois esporocistos cada um com quatro esporozoítos (Dubey et al., 1998; Hill e Dubey, 2002; Montoya e Liensefield, 2004).

Os taquizoítos possuem a forma oval ou crescente, medem cerca de 2 x 4 μm de largura e 4 x 8 μm de comprimento sendo o estágio de replicação rápida do parasita (Figura 1 B). Entram em todas as células nucleadas por penetração ativa formando o vacúolo parasitóforo. Após replicações sucessivas as células do hospedeiro são rompidas e os parasitas são disseminados na corrente sangüínea infectando muitos tecidos: olhos, músculos, coração, placenta e o sistema nervoso central (SNC). Com o aparecimento da resposta imune os taquizoítos são transformados em bradizoítos formando posteriormente os cistos (Dubey, 1991; Dubey et al., 1998; Montoya e Liesenfeld, 2004; Hill, 2005).

Os cistos são estágios infectantes tanto para hospedeiros definitivos, como para intermediários (Figura 1 C). São resistentes às condições ambientais podendo durar por toda a vida do hospedeiro infectado. Variam no tamanho de 5 a 100 μm , contêm centenas ou milhares de bradizoítos que são morfológicamente idênticos aos taquizoítos, porém com multiplicação mais lenta. São mais delgados e menos susceptíveis a ação de enzimas proteolíticas. O núcleo dos bradizoítos situa-se na extremidade posterior, enquanto que dos taquizoítos na posição central (Dubey et al., 1998; Montoya e Liesenfeld, 2004; Hill et al., 2005).

O ciclo de vida alterna entre um hospedeiro intermediário (mamíferos ou aves) onde ocorrem os estágios assexuados, e um

hospedeiro definitivo (felídeos) que alberga os estágios sexuais. A infecção no hospedeiro intermediário se dá pela ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cistos, água ou alimentos contaminados por oocistos secretados nas fezes de gatos infectados (Dubey, 1996; Hill e Dubey, 2002; Montoya e Liesenfield, 2004). Quando ocorre a ingestão dos oocistos, os esporozoítos são liberados invadindo as células epiteliais transformando-se em taquizoítos de replicação rápida que se disseminam pela corrente sanguínea invadindo células nucleadas caracterizando a fase aguda da infecção. Com aproximadamente 60-90 dias, a infecção torna-se crônica. Os taquizoítos, então, se diferenciam em bradizoítos, que se dividem mais lentamente e formam cistos em diversas células, principalmente no cérebro, coração e músculos permanecendo lá por meses, anos e décadas (Dubey e Frenkel, 1972). Pacientes cronicamente infectados e que apresentam imunossupressão, a infecção latente pode ser reativada, produzindo ruptura dos cistos e proliferação dos taquizoítos (Dubey, 1996; Dubey et al., 1998; Suzuki, 2002).

No hospedeiro definitivo, após a ingestão de cistos teciduais, a sua parede é dissolvida por enzimas proteolíticas no estômago e intestino delgado, ocorrendo à liberação de bradizoítos que penetram no epitélio intestinal iniciando o desenvolvimento de múltiplas gerações de ciclos sexuais e assexuais de *T.gondii* (Dubey e Frenkel, 1972). O parasita se multiplica assexuadamente nas células do epitélio intestinal dando origem aos esquizontes (esquizogonia). Dos esquizontes são liberados merozoítos que após várias gerações se diferenciam em macrogametas e microgametas dando origem ao zigoto, que posteriormente dará origem ao oocisto (gametogonia) completando o ciclo sexual (Hill et al., 2005). Os oocistos são liberados imaturos para o meio ambiente por um curto período (1-2 semanas) na vida do gato (Dubey et al., 1988). Estes esporulam no meio ambiente entre 1 e 21 dias, formando no seu interior dois esporocistos cada um com quatro esporozoítas podendo sobreviver por meses ou até anos em ambiente favorável (Hill e Dubey, 2002; Montoya e Liensefield, 2004). A Figura 2 mostra resumidamente este ciclo.

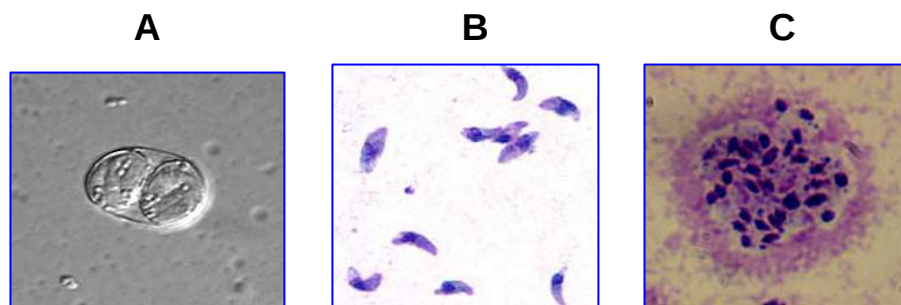


Figura 1: Oocisto esporulado em contraste diferencial de interferência (DIC), aumento 100X (A); taquizoítos corados por Giemsa, aumento 1000X (B); e Cisto com bradizoítos corado por hematoxilina-eosina, aumento 1000X (C).

http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Toxoplasmosis_il.htm

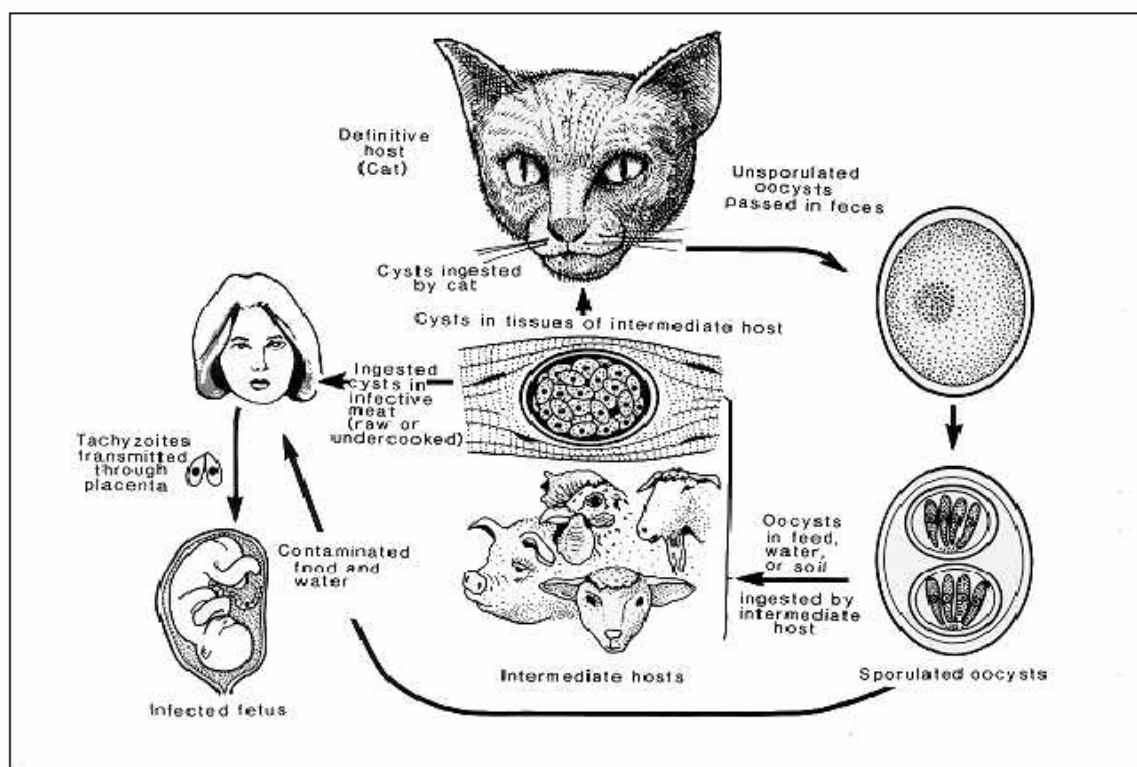


Figura 2: Ciclo de *Toxoplasma gondii* (Hill e Dubey, 2002).

1.3. Transmissão

A transmissão do parasita na espécie humana ocorre basicamente pela ingestão de água e alimentos como frutas e verduras mal lavadas, contaminados com oocistos ou pela ingestão de cistos presentes na carne crua ou mal cozida (Hill e Dubey, 2002). Pode ocorrer também por via transplacentária durante a primoinfecção aguda materna, pela amamentação durante a fase aguda da infecção, transplante de órgãos principalmente coração, rins, fígado e medula óssea, além de transfusão sanguínea e seus derivados (Amato Neto et al., 1995).

1.5. Formas da doença

1.5.1. Toxoplasmose em pacientes imunocompetentes

No Brasil, a primoinfecção, na maioria das vezes ocorre na primeira década de vida, sendo assintomática nos indivíduos imunocompetentes em 80 a 90% dos casos. A evolução clínica da toxoplasmose adquirida nestes pacientes é habitualmente benigna e em geral autolimitada, com duração de poucas semanas a dois meses, estando a cura clínica relacionada a uma resposta imune apropriada (Remington, 2004). A linfadenopatia é a manifestação mais comum em 10 a 20% destes indivíduos podendo ser acompanhada de febre, astenia e mialgia. Após a cura clínica ou o término de uma fase aguda subclínica (toxoplasmose infecção) inicia-se a fase latente (crônica) assintomática, associada a importante imunidade protetora contra novas infecções ou reativações da doença (Montoya e Liesenfield, 2004).

Em alguns casos raros pode ocorrer acometimento neurológico secundário causando encefalite ou meningoencefalite, com sintomas inespecíficos (Khan et al., 1997), miocardites, pneumonites, polimiosites e hepatites (Montoya e Liesenfield, 2004). Alguns destes indivíduos podem desenvolver a doença ocular (Roberts e McLeod, 1999).

1.5.2 Toxoplasmose congênita

A toxoplasmose congênita ocorre quando a mulher se infecta pela primeira vez durante a gestação e o transmite para o feto (Hohlfeld et al., 1994). A doença varia amplamente de casos severos a subclínicos, podendo causar morte fetal ou neonatal. A frequência e a severidade da doença dependem da idade gestacional (Remington et al., 2001). Infecção materna no primeiro ou segundo trimestre de gestação pode causar toxoplasmose congênita severa resultando em morte do feto no útero ou aborto espontâneo. Cerca de 1% de recém-nascidos que adquiriram toxoplasmose congênita morrem e 2% apresentam problemas neurológicos graves. Em contraste, infecção materna tardia (terceiro trimestre) usualmente resulta em recém-nascidos aparentemente normais. A frequência absoluta de infecções subclínicas em recém-nascidos com toxoplasmose congênita é de 85% (Hohlfeld et al., 1994; Gilbert, 2004). As infecções que passam despercebidas ou se não tratadas causam desenvolvimento de coriorretinite ou atraso no crescimento na segunda ou terceira década de vida da criança (Remington et al., 2001). Vários estudos mostram que 50 a 80% de mulheres brasileiras em idade gestacional exibem anticorpos IgG anti - *T.gondii* e 20 a 50% estão expostas à infecção (Camargo , 1996; Nóbrega e Karnikowski, 2005).

No Brasil a ocorrência de toxoplasmose congênita varia de 0,2 e 2% (Silveira et al., 1988; Neto et al., 2000). Na região metropolitana de São Paulo, estima-se que nasçam de 230 a 300 crianças infectadas por toxoplasmose por ano (Guimarães et al., 1993).

O diagnóstico precoce assim como o tratamento antiparasitário da mãe são capazes de reduzir a taxa de transmissão para o feto e, por consequência, o número de seqüelas (Hohlfeld et al., 1989). A espiramicina apresenta eficácia de 60% na redução da incidência de transmissão vertical (Minkoff et al., 1997). As manifestações clínicas da toxoplasmose congênita são variadas e incluem estrabismo, cegueira, retardo mental e/ou psicomotor, epilepsia, anemia, icterícia, exantema, petéquias, encefalite,

pneumonite, incluindo a “Tétrade ou Síndrome de Sabin”: coriorretinite em 90% dos casos; calcificações cerebrais em 69%, perturbações neurológicas com retardamento psicomotor em 60% e alterações do volume craniano, com micro ou macrocefalia, em 50% (Kawazoe, 1995). Estes sinais descritos em recém nascidos com toxoplasmose congênita podem ser similares aos apresentados por outras doenças congênitas como citomegalovírus, herpes, rubéola e sífilis (Montoya e Liesenfeld, 2004).

O diagnóstico pré-natal da toxoplasmose congênita se baseia em exames de ultra-sonografia, amniocentese e análise de amostras de sangue fetal (Hohlfeld et al., 1994). A reação da polimerase em cadeia (PCR) usando líquido amniótico também tem sido usada para o diagnóstico da toxoplasmose congênita (Grover et al., 1990; Hohlfeld et al., 1994; Jenun et al., 1998).

O diagnóstico laboratorial da toxoplasmose congênita é feito pela detecção de IgM e IgG por testes como imunofluorescência indireta (IFI), “Enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA), aglutinação (ISAGA) ou outros testes similares. Níveis de anticorpos IgG podem ser detectados 1 a 2 semanas depois da infecção e permanecem elevados indefinidamente, enquanto que os anticorpos IgM aumentam em dias e usualmente permanecem elevados por 2 a 3 meses. A detecção de anticorpos IgG na mulher antes da gestação indica infecção anterior e portanto elimina o risco de transferência congênita de taquizoítos (Kravetz e Federman, 2005). O teste de avidéz para anticorpos IgG foi introduzido para discriminar entre infecção recente e infecção tardia sendo muito útil para o diagnóstico de gestantes. Normalmente, é utilizado como teste confirmatório, quando usado em associação com outros testes sorológicos (Hedman et al., 1989; Liesenfeld et al., 2001).

1.5.3. Toxoplasmose cerebral e AIDS

Toxoplasmose cerebral é uma das mais comuns infecções neurológicas oportunistas em pacientes com AIDS causando significativa morbidade e mortalidade (Holliman, 1988; Luft e Chua, 2000). A reativação da infecção latente ocorre quando os pacientes apresentam menos de 200 células CD4+/μL de sangue (Porter e Sande et al., 1992; Renold et al., 1992; Luft et al., 1993). A doença torna-se grave, afetando o cérebro e sistema nervoso central causando encefalite (Luft e Remington, 1992; Luft e Chua, 2000; Montoya e Liesenfeld, 2004). Uma ampla variedade de sintomas pode aparecer incluindo dor de cabeça, distúrbios de nervos cranianos, hemiparesia, afasia, anomalias sensoriais e deterioração mental (Franzen et al., 1997; Ferreira, 2000). A encefalite por *T.gondii* causa necroses cerebrais com predileção das lesões nos gânglios da base em ambos os hemisférios cerebrais (Luft e Remington, 1992). Estudos anteriores a era das terapias anti-retrovirais altamente eficientes (HAART) relatam que a toxoplasmose cerebral acometia 25 a 50% dos pacientes (Beamon et al., 1992; Luft e Remington, 1992; Oksenhendler et al., 1994). Apesar da introdução da HAART causar declínio da incidência da toxoplasmose cerebral, hoje a prevalência de distúrbios cerebrais ainda conta com uma considerável proporção de mortalidade e morbidade, especialmente em países em desenvolvimento (Sacktor, 2002). A toxoplasmose cerebral é a segunda infecção oportunista mais comum relacionada à AIDS seguida apenas da pneumocistose, causada por fungos da espécie *Pneumocystis carinii*, e a primeira causa mais comum de doença no sistema nervoso central nestes pacientes (Holliman, 1988; Luft e Remington, 1992).

Os sintomas da toxoplasmose cerebral podem ser confundidos por outras infecções oportunistas que comumente infectam estes pacientes. Portanto o diagnóstico não pode ser baseado somente em observações clínicas (Montoya e Liesenfeld, 2004). O diagnóstico definitivo requer a demonstração direta de taquizoítos no tecido cerebral (biópsia ou necropsia). O diagnóstico presuntivo (provável ou sugestivo) estabelecido pelo “Centers

for Disease Control” (CDC, 1993; Potergies et al., 2004) baseia-se na presença de i) sinais neurológicos focais, alterações do nível ou do conteúdo da consciência, evidência de imagem tomográfica de lesão expansiva, com ou sem realce da substância de contraste ii) presença de anticorpos IgG anti-*T. gondii* e iii) resposta ao tratamento específico anti-*T. gondii*. Na prática de clínica médica o tratamento é usualmente iniciado quando é determinado o diagnóstico presuntivo baseado em achados clínicos e radiológicos (Luft e Remington, 1992; Eggers et al., 1995; Cohen, 1999; Bahia-Oliveira, 2003).

A introdução da PCR e das técnicas de imagem tornaram o diagnóstico menos invasivo, pois se exclui a necessidade de realizar biópsias (Antinori et al., 2000; Ammassari et al., 2000; Vidal et al., 2004). Apesar da sensibilidade da PCR em amostras de LCR chegar a 100% (Schoondermark et al., 1993; Dupon et al., 1995; Cinque et al., 1996; Julander et al., 2001; Vidal et al., 2004), a coleta das amostras é muito invasiva, principalmente em crianças e contra-indicada em pacientes com lesões cerebrais expansivas (Eggers et al., 1995; Antinori et al., 1997; Cingolani et al., 1998; Cohen, 1999).

Vários estudos destacam a utilização da PCR em amostras de sangue para o diagnóstico da toxoplasmose cerebral e disseminada (Dupoy-Camet et al., 1993; Alonso et al., 2002; Priya et al., 2002; Colombo et al., 2005). Variações na sensibilidade podem ocorrer em função da baixa parasitemia (Dannemann et al., 1991; Peloux et al., 1997). A terapia específica anti-*Toxoplasma* também pode interferir na sensibilidade do método, portanto as amostras devem ser colhidas dentro da primeira semana de tratamento (Dupoy-Camet et al., 1993; Novati et al., 1994; Cingolani et al., 1996; Vidal et al., 2004).

1.5.4. Toxoplasmose ocular

A forma ocular de toxoplasmose é uma das mais importantes causas mundiais de uveítes posteriores (retinocoroidite) (Tenter et al., 2000). Pode ser de origem congênita com manifestações clínicas precoces ou tardias, ou ainda ser adquirida após o nascimento como resultado da infecção aguda ou reativação. Em pacientes imunocompetentes é responsável por 30 a 50% dos casos (Garweg et al., 2000; Villard et al., 2003). Nos Estados Unidos e Europa a maioria dos casos é resultante de infecção congênita. No Brasil, os estados do Rio grande do Sul, Paraná e Rio de Janeiro apresentaram uma alta incidência de toxoplasmose ocular, sendo que a cidade de Erechin, no Rio Grande do Sul apresentou um índice de 17,7% em uma população de mais de mil pessoas (Glasner et al., 1992; Garcia et al., 1999; Petersen et al., 2001).

A manifestação ocular mais comum é a retinocoroidite granulomatosa necrotizante que pode vir acompanhada de outras alterações oculares. A lesão é de coloração branco-amarelada, com margens mal definidas, eventualmente associadas a áreas de cicatrizes de lesões aguda anteriores de aspecto hiperpigmentado e que geralmente evolui para cicatrização, passando por período de regressão, que varia de semanas a meses (Glasner et al., 1992; Montoya e Remington, 1996). Os sintomas incluem diminuição da visão, inflamação, necrose retiniana e fotofobia (Amato Neto et al., 1995). O diagnóstico é presuntivo, baseando-se na análise conjunta do quadro clínico observado, testes sorológicos, PCR e exclusão de outras doenças como sífilis, citomegalovírus, toxocaríase e outras (Montoya et al., 1999). Devido à gravidade e irreversibilidade das lesões causadas por *T. gondii*, o diagnóstico precoce é de fundamental importância para que seja possível aplicar a intervenção adequada, principalmente nos casos em que o quadro clínico e os resultados sorológicos não são conclusivos (Nussenblat e Belfortt, 1994).

1.6. Diagnóstico laboratorial

1.6.1. Sorológico

Classicamente o diagnóstico da toxoplasmose é baseado na pesquisa de anticorpos por métodos sorológicos. O primeiro teste disponível para detectar anticorpos específicos foi a reação de Sabin-Feldman (Dye test). Apesar de ser um teste de alta especificidade e sensibilidade, seu uso tornou-se restrito em decorrência do risco de contaminação com antígenos vivos de *T. gondii* utilizados (Reiter-Owona et al.,1999).

Atualmente, pesquisa de diferentes classes de imunoglobulinas, IgM, IgG, IgA e IgE anti-*T. gondii* constitui a principal contribuição para o diagnóstico da doença. A presença desses anticorpos durante a infecção permite a análise de perfis sorológicos característicos quer seja na infecção recente (fase aguda) ou infecção tardia ou latente (crônica) (Contreras et al., 2000). Os testes mais utilizados são IFI e ELISA (Hill e Dubey, 2002; Montoya e Liesenfield, 2004).

A IFI é rotineiramente utilizada e considerada “padrão ouro”. Apresenta boa sensibilidade e especificidade tendo a vantagem de utilizar o parasita preservado fixado em lâmina. Este teste pode apresentar resultados falso-positivos na detecção de anticorpos da classe IgM pela interferência de fatores reumatóides, eventualmente presentes no soro (Camargo et al.,1972; Ferreira e Ávila, 2001).

Outro teste utilizado na rotina laboratorial é a ELISA, que apresenta elevada sensibilidade e especificidade, bem como rapidez, simplicidade técnica, versatilidade e objetividade de leitura. Detecta quantidades extremamente pequenas de anticorpos, podendo ter elevada precisão, se os reagentes e os parâmetros do ensaio forem bem padronizados (Ferreira e Ávila, 2001).

O diagnóstico da toxoplasmose aguda é baseado na demonstração de um aumento significativo no nível de anticorpos IgG e /ou a presença de anticorpos IgM. Entretanto a elevada prevalência de anticorpos IgG entre indivíduos normais na maioria da população e a persistência de

anticorpos IgM por longos períodos em algumas pessoas tem complicado a interpretação dos testes sorológicos quando há suspeita de toxoplasmose aguda (Brooks et al.,1987; Remington e Klein,1995).

Os testes que detectam anticorpos IgM e IgG anti-*T. gondii* são mais específicos para definir o diagnóstico em indivíduos imunocompetentes por serem sensíveis, específicos e de fácil execução. Já em pacientes imunocomprometidos, fetos, recém-nascidos, receptores de órgão transplantados e principalmente em pacientes com AIDS, o diagnóstico da toxoplasmose torna-se complicado, pois anticorpos específicos dificilmente são detectados. Portanto a pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. gondii* não é utilizada para identificar pacientes com reativação ou com risco de desenvolver toxoplasmose cerebral (Joss et al.,1993; Franzen et al.,1997; Joseph et al., 2002). Porém, para alguns autores títulos altos de anticorpos anti-*T. gondii* presentes em pacientes com AIDS podem ser preditores da toxoplasmose cerebral (Hellerbrand et al., 1996; Vidal e Penalva de Oliveira, 2002).

Em gestantes, quando anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii* estão presentes simultaneamente, os métodos sorológicos tradicionais não diferenciam entre a toxoplasmose aguda e a crônica (Cozon et al., 1998). Portanto, a determinação de anticorpos IgG de baixa avidéz representa um importante marcador, pois avalia a avidéz ou afinidade funcional de ligação entre esses anticorpos ao antígeno, separando os de baixa afinidade produzidos na fase inicial da infecção e os de alta afinidade produzidos na fase crônica , portanto o teste vem sendo utilizado para distinção entre infecção recente e tardia (Hedman et al., 1989; Leser et al., 2000; Bertozzi et al., 1999; Lappalainen e Hedman, 2004).

Os anticorpos IgA são freqüentemente detectados na fase inicial da toxoplasmose (Decoster et al., 1988; Takahashi e Rossi, 1994). Em adultos estes anticorpos permanecem na circulação por um período de um ano ou mais. A desvantagem é que aproximadamente 5% dos adultos não produzem IgA ou, alguns indivíduos podem permanecer com IgA por anos.

Portanto é pouco utilizado no diagnóstico de infecção recente (Montoya e Liesenfield, 2004).

A presença dos anticorpos IgM e IgA anti-*T.gondii* em soros de recém nascidos determina infecção congênita. Quando dosagens de IgM são negativas, a detecção de anticorpos IgA pode ser utilizada (Lappalainen e Hedman, 2004). Anticorpos IgE podem ser encontrados em amostras de soro de neonatos infectados congenitamente, mas a sensibilidade de detecção é mais baixa que IgM e IgA (Villena et al., 1999).

1.6.2. Molecular

A PCR é um método amplamente utilizado para detectar *T.gondii* em diferentes fluidos corporais, tais como sangue (Burg et al., 1989; Dupouy-Camet et al., 1993; Filice et al., 1993; Joss et al., 1993; Khalifa et al., 1994; Dupon et al., 1995; Pelloux et al., 1997; Bou et al., 1999), líquido amniótico (Hohlfeld et al., 1994; Jenun et al., 1998), LCR (Parmley et al., 1992; Novati et al., 1994; Dupon et al., 1995; Cingolani et al., 1996; Antinori et al., 1997), humor aquoso (Bou et al., 1999; Jones et al., 2000), fluido de lavado bronco -alveolar (Roth et al., 1992) e urina (Fuentes et al., 1996). Por apresentar boa sensibilidade e especificidade é amplamente utilizada para esclarecer o diagnóstico pré-natal, em imunodeficientes, e em pacientes com problemas oculares (Dupouy-Camet et al., 1993; Filice et al., 1993; Dupon et al., 1995). A PCR revolucionou o diagnóstico da toxoplasmose congênita, cerebral, disseminada e ocular, pois limitou o uso de métodos invasivos (Dupouy-Camet et al., 1993; Filice et al., 1993; Joseph et al., 2002; Montoya e Liesenfield, 2004). Vários estudos evidenciam a utilidade da PCR em amostras sanguíneas ou LCR como auxiliar no diagnóstico da toxoplasmose cerebral em pacientes com AIDS. A PCR associada às técnicas de imagem diminuiu o uso de biópsias estereotáxicas (Cingolani et al., 1996; Antinori et al., 1997; Antinori et al., 2000; Ammassari et al., 2000; Priya et al., 2002; Vidal et al., 2004; Colombo et al., 2005).

O primeiro marcador gênico a ser testado e mais amplamente utilizado foi o gene B1. Encontra-se repetido em 35 cópias no genoma do

parasita com um tamanho de 2,2Kb (Van de Ven et al., 1991; Lamoril et al., 1996). Burg et al. (1989) demonstraram alta sensibilidade da PCR na detecção de apenas um parasito presente no lisado celular usando uma região do gene B1 como alvo de amplificação. Um outro gene também utilizado como marcador é o SAG1 ou P30, que se encontra representado como uma cópia única codificando para o principal antígeno de superfície do protozoário (Dupouy-Camet et al., 1993). Os protocolos que empregaram a PCR convencional (qualitativa) para a detecção de genes em cópia única, como o gene P30 mostrou-se menos sensíveis (Buchbinder et al., 2003). Estudos realizados com objetivo de comparar sensibilidade de seqüências iniciadoras mostraram que as seqüências alvo B22 e B23 do gene B1 apresentaram maior sensibilidade e especificidade (Brindley et al., 1993; Chabbert et al., 2004).

Variações na sensibilidade da PCR no LCR (11.5 a 100%) têm ocorrido, mas a especificidade é normalmente alta (96-100%) (Schoondermark-van de Ven et al., 1993; Novati et al., 1994; Dupon et al., 1995; Cingolani et al., 1996; Cinque et al., 1996; Gianotti et al., 1997; Priya et al., 2002; Vidal et al., 2004). No sangue a sensibilidade varia de 25 a 77% (Dupouy-Camet et al., 1993; Dupon et al., 1995; Franzen et al., 1997; Joseph et al., 2002). Um estudo realizado em 64 pacientes com toxoplasmose cerebral e 128 pacientes com outras doenças oportunistas mostrou uma sensibilidade de 80% e especificidade de 98% (Colombo et al., 2005). As variações na sensibilidade podem ser devido a vários fatores como: condições de transporte e armazenamento da amostra, tratamento anti-toxoplasmose, métodos de extração de DNA, de kits e equipamentos para a reação e baixa parasitemia (Dupouy-Camet et al., 1993; Pelloux et al., 1997; Montoya e Liesenfeld, 2004).

1.4. Características gênicas de *Toxoplasma gondii*

O genoma de *T.gondii* consiste de um genoma nuclear estável possuindo aproximadamente 87Mb, um DNA circular extracromossomal dentro de uma organela denominada apicoplasto de 35Kb e um genoma mitocondrial de 6Kb (Ajioka et al., 2001). O genoma nuclear é haplóide para a maioria dos estágios do ciclo de vida do parasita, exceto no intestino do gato antes da meiose, onde ocorre a fase diplóide (Pfefferkorn e Pfefferkorn, 1980). O cruzamento entre a cepa ME-49 (Tipo II) e cepa CEP (Tipo III) definiu um mapa genômico constituído de 11 cromossomos (Sibley et al., 1992). Posteriormente, Khan et al. (2005a) definiram um novo mapa com a segregação de 250 marcadores genéticos em 14 cromossomos designados por algarismos romanos (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VIIa, VIIb, VIII, IX, X, XI e XII) com tamanhos que variam de 1,8Mb a > 10 MB, fazendo recombinações de cepas dos tipos II e III e dos tipos I e III (Figura 3).

Vários marcadores foram utilizados para caracterização de isolados do parasita utilizando a PCR – RFLP (Howe et al., 1997; Fazaeli et al., 2000; Fuentes et al., 2001; Khan et al., 2005b; Pena et al., 2006; Ferreira et al., 2006; Su et al., 2006; Dubey et al., 2007). Os mais utilizados são seqüências que amplificam regiões específicas do: (i) gene SAG1, localizado no cromossomo VIII que codifica a P30 (Tabela 1). Esta proteína representa até 5% do total de proteínas expressas por taquizoítos e não é expressa em bradizoítos ou esporozoítos (Howe e Sibley, 1995; Bulow e Boothroyd, 1991; Khan et al., 2005a); (ii) gene SAG2, localizado no cromossomo VIII, que codifica a proteína p22 que é expressa tanto por taquizoítos quanto por bradizoítos (Tabela 1) (Howe et al., 1997; Lekutis et al., 2000; Khan et al., 2005a); (iii) gene SAG3 localizado no cromossomo XII, que codifica proteínas expressas somente em taquizoítos, sendo a principal a p43 (Tabela 1) (Gross et al., 1996; Grigg et al., 2001b; Khan et al., 2005a); (iv) gene GRA6, localizado no cromossomo X, que codifica uma proteína onde estudos sugerem que possa estar envolvida no recrutamento de nutrientes, permitindo a multiplicação do parasita e sua sobrevivência dentro da célula (Tabela 1) (Cesbron-Delauw et al., 1996; Khan et al., 2005a; Khan et al.,

2005b); (v) gene BTUB localizado no cromossomo IX (Khan et al., 2005a; Khan et al., 2005b); e (vi) gene B1 localizado no cromossomo IX (Grigg e Boothroyd, 2001; Khan et al., 2005a).

Tabela 1: Localização dos genes nos cromossomos e as principais proteínas codificadas.

Gene ¹	Localização no cromossomo ¹	Principais proteínas	Referências
SAG1	VIII	P30 (antígeno de superfície)	Howe e Sibley, 1995 Bulow e Boothroyd, 1991
SAG2	VIII	P22 (antígeno de superfície)	Howe et al., 1997 Lekutis et al., 2000
SAG3	XII	P43 (antígeno de superfície)	Gross et al., 1996 Grigg et al., 2001b
GRA6	X	GRA6 (antígeno de grânulos densos)	Cesbron-Delauw et al., 1996 Khan et al., 2005b

¹Khan et al., 2005a

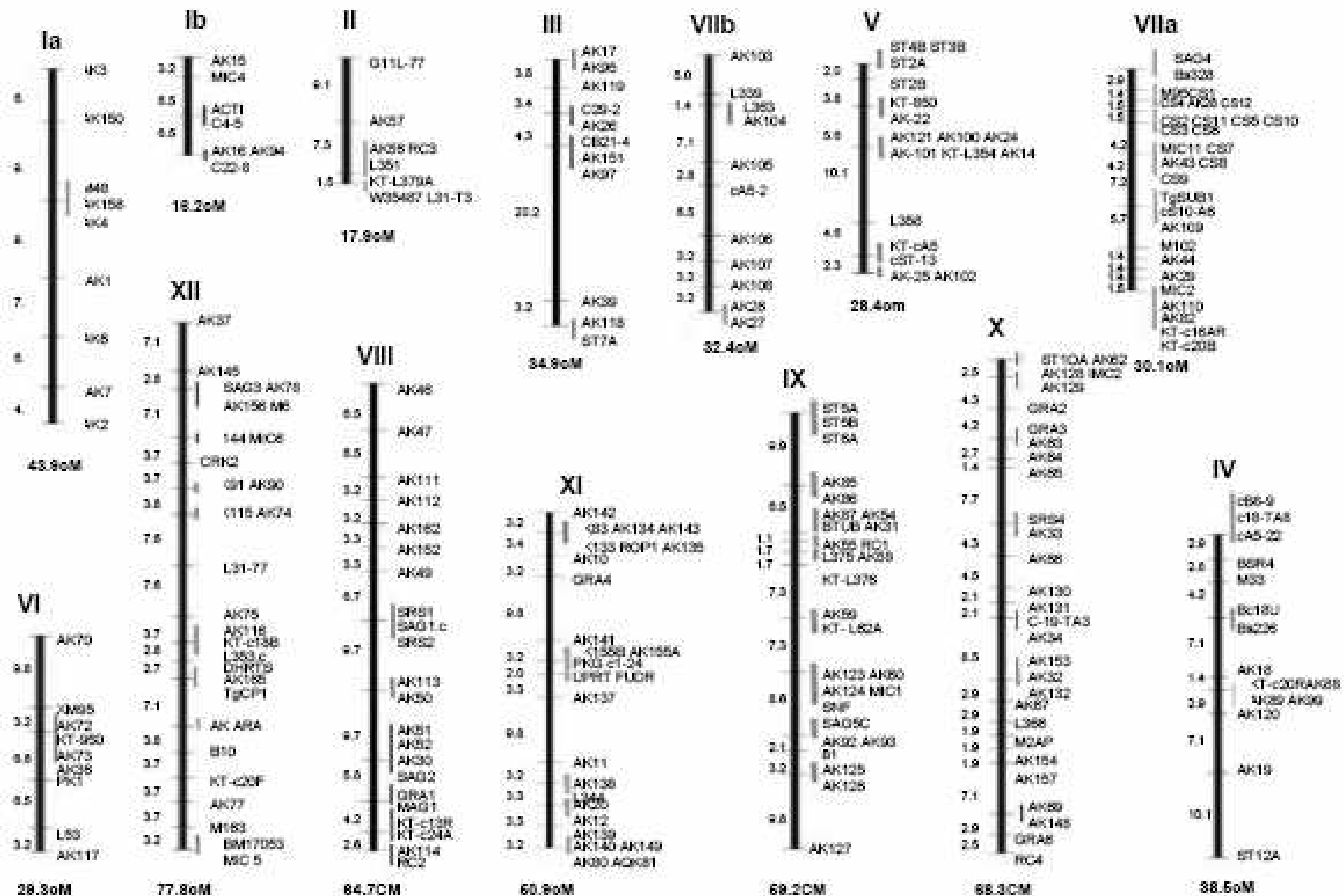


Figura 3: Mapa genômico de *T. gondii*. Adaptado de Khan et al., 2005a

1.4.1. Tipos de cepas

A caracterização genotípica de diferentes isolados de *T. gondii* em amostras de humanos, aves, cães, porcos e gatos têm sido feitos por métodos moleculares (Howe et al., 1997; Fuentes et al., 2001; Dubey et al., 2003; Dubey et al. 2004; Da Silva et al., 2005; Santos et al., 2005; Vallochi et al., 2005; Gallego et al., 2006; Pena et al., 2006; Belfort-Neto et al., 2007).

Análises isoenzimáticas e genéticas mostraram que as cepas de *T.gondii* estão agrupadas em três linhagens clonais designadas tipo I, II e III (Howe e Sibley, 1995; Howe et al., 1997; Tibayrenc e Ayala, 2002). Estudos de polimorfismo genético revelam que a configuração genotípica de *T.gondii* é formada pela combinação de basicamente duas classes de alelos designadas “A” e “E”, em que o alelo foi definido como a classe alélica compartilhada por pelo menos dois dos três tipos de genótipo (I, II e III). Para cada *locus*, essas duas classes alélicas estavam distribuídas aleatoriamente entre os parasitas das três linhagens. Para alguns *loci*, as linhagens I e II compartilhavam a mesma classe alélica, enquanto a linhagem III era diferente (Grigg et al., 2001a). Com esses dados, os autores sugeriram que essas três linhagens surgiram de uma origem comum e, desde então passado por limitada troca genética (Grigg et al., 2001a; Su et al., 2003). Análises por RFLP e seqüenciamento de genes individuais estimam que exista somente 1% de divergências nas seqüências de DNA entre as linhagens (Howe e Sibley, 1995).

Existem várias explicações para a existência da estrutura clonal do *T.gondii*: i) transmissão do parasita entre hospedeiros intermediários de hábitos carnívoros e saprofágicos, sem passar pelo hospedeiro definitivo e sofrer meiose e recombinação gênica (Su et al., 2003); ii) macrogametas do parasita que permanecem no intestino do gato sem serem fertilizados poderem formar oocistos por partenogênese (Ferguson, 2002); e iii) a raridade de infecção simultânea no gato com diferentes cepas, a recombinação ocorreria se felídeos fossem infectados simultaneamente com diferentes amostras de *T. gondii*, um evento raro de ocorrer na natureza,

uma vez que teriam que se alimentar de uma presa que albergasse uma infecção mista ou se ingerissem duas presas, cada uma com uma amostra diferente, porém este evento teria que ocorrer em um intervalo de tempo bem curto. Outro fato que poderia contribuir para essa estrutura populacional clonal, o fato do *T.gondii* ser haplóide, portanto um felídeo infectado com apenas um tipo de amostra, produz oocistos contendo progênes geneticamente idênticas à amostra infectante original (Ajzenberg et al., 2004).

A maioria das cepas de *T. gondii* foi definida baseando-se na virulência em camundongos infectados (Dubey e Frenkel, 1976; Literák et al., 1998). Alguns destes estudos mostraram que as diferentes linhagens clonais de *T. gondii* apresentam diferentes graus de virulência (Howe e Sibley, 1995). Cepas do tipo I são altamente virulentas, com elevado nível de parasitemia e não produzem cistos teciduais, já cepas dos tipos II e III são avirulentas e produzem cistos teciduais (Sibley e Boothroyd, 1992; Ajioka et al., 2001). Porém, esta correspondência entre a virulência e o padrão molecular da amostra não necessariamente deve ser observada em todos os hospedeiros (Grigg e Suzuki, 2003). A cepa RH e aquelas cepas que são geneticamente similares a ela exibem uma dose letal de 100% (LD100) de um único parasita viável. Em contraste, cepas avirulentas exibem uma dose letal (LD50) maior ou igual a 1000 parasitas e facilmente estabelece infecções crônicas em camundongos (Howe et al., 1996). Segundo Literák et al. (1998), as cepas com virulência intermediária podem ser cepas em transição entre os fenótipos virulentos e não virulentos. Alguns estudos sugerem que o aumento da virulência da cepa tipo I poderia estar correlacionada à estimulação da resposta imune Th1, o que levaria ao aparecimento da patologia (Mordue et al., 2001; Sibley et al., 2002). A identificação de uma possível correlação entre a severidade da doença pode ser um dado para determinação de condutas de terapia (Fuentes et al., 2001).

Os métodos de genotipagem, que incluem PCR-RFLP com marcadores múltiplos e por microsátélites distinguem as três linhagens

clonais na maioria dos isolados de *T. gondii* de origem humana e animal de diferentes partes do mundo (Howe e Sibley, 1995; Howe et al., 1997; Dardé et al., 1992; Ajzenberg et al., 2002; Su et al., 2006).

Estudos sobre a caracterização genotípica realizados em cepas isoladas de animais domésticos (ovelhas e porcos) e humanos em regiões dos Estados Unidos, Europa, Ásia e África mostram que a maioria das cepas são do tipo II (Howe e Sibley, 1995; Dardé, 1996; Owen e Trees, 1999; Ajzenberg et al., 2002; Lindstron et al., 2006; Peyron et al., 2006; Zakimi et al., 2006).

Embora consagrado o reconhecimento das cepas I, II e III pela comunidade científica mundial, existem outras divergentes das três linhagens arquétipos (Howe e Sibley, 1995; Howe et al., 1997; Boothroyd e Grigg, 2002). Cepas recombinantes e genótipos atípicos ou polimórficos já foram observados principalmente na América do Sul (Grigg et al., 2001b; Khan et al., 2006; Su et al., 2006; Ferreira et al., 2006; Dubey et al., 2007).

Grigg et al. (2001b) identificaram os genótipos de 12 amostras de *T. gondii* de humor vítreo de pacientes com toxoplasmose ocular, onde foram encontrados cinco novos genótipos recombinantes, utilizando os marcadores SAG1, SAG2, SAG3, SAG4 e B1.

Amostras brasileiras de humanos com toxoplasmose ocular e de animais foram analisadas por multilocus nested-PCR com quatro marcadores independentes SAG2, SAG3, BTUB e GRA6, sendo encontrados genótipos atípicos (Khan et al., 2006).

Dubey et al. (2007) utilizando 11 marcadores moleculares, observaram grande diversidade genética da população de *T. gondii* em isolados de galinhas caipiras do Pará e Rio Grande do Sul. Notaram que as populações eram distintas entre os estados sendo encontrado a maioria dos genótipos polimórficos.

Um trabalho mais recente feito com 46 isolados de *T. gondii* provenientes de gatos do estado de São Paulo, utilizando também um grande número de marcadores, descreveram uma elevada diversidade

genética, com 20 genótipos diferentes dos genótipos clonais (tipos I, II e III) (Pena et al., 2008).

Estudos recentes mostraram que a distribuição das cepas na América do Sul são notadamente diferentes, sendo mais virulentas, atípicas ou tipo I ou III (Dardé, 2004; Khan et al., 2006; Lehmann et al., 2006). A comparação de genótipos de cepas de *T.gondii* associados com infecção humana mostrou uma frequência de cepas tipo I em pacientes com toxoplasmose/AIDS e toxoplasmose ocular (Vallochi et al., 2005; Khan et al., 2006; Gallego et al., 2006). Inversamente, outros estudos, analisando amostras na América do Norte e Europa mostraram que as cepas do tipo II foram mais prevalentes na toxoplasmose/AIDS e em infecções congênitas (Howe e Sibley, 1995; Howe et al., 1997; Ajzenberg et al., 2002; Boothroyd e Grigg, 2002; Nowakowska et al., 2006).

No Brasil, na maioria dos estudos a análise genotípica foi realizada em cepas isoladas de animais e apresentam predominância de cepas do tipo I e III (Dubey et al., 2002; Dubey et al., 2003; Da Silva et al., 2005; Santos et al., 2005; Pena et al., 2006). Até a presente data, alguns estudos analisaram uma amostragem reduzida de pacientes, portanto pouco se conhece sobre a prevalência dos diferentes tipos de cepa na infecção humana (Vallochi et al., 2005; Ferreira et al., 2006; Khan et al., 2006).

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Genotipar cepas de *T.gondii* isoladas em um grupo de pacientes com toxoplasmose cerebral e AIDS.

2.2 Objetivos específicos

- 1- Validar para o presente estudo a metodologia de caracterização genotípica de *T. gondii* incluindo a escolha dos marcadores genéticos;
- 2- Determinar os tipos de cepas diretamente nos isolados clínicos;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. População de estudo

Foram analisados DNA extraídos de amostras de sangue e LCR de 87 pacientes maiores de 18 anos admitidos e tratados no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (IIER) com diagnóstico sorológico positivo para a infecção por HIV, valores de células CD4+ < 200/ μ L e com toxoplasmose cerebral.

A toxoplasmose cerebral foi diagnosticada de acordo com as “definições de diagnóstico clínico-radiológico de toxoplasmose cerebral em pacientes com AIDS” (CDC, 1993; Potergies et al., 2004). As definições encontradas neste grupo de pacientes foram: i) sinais neurológicos focais, alterações do nível ou do conteúdo da consciência, evidência de imagem tomográfica de lesão expansiva, com ou sem realce da substância de contraste ii) reações sorológicas e PCR positivos usando os iniciadores B22 e B23 do gene B1 de *T. gondii* (Colombo et al., 2005) e iii) resposta ao tratamento específico anti-*T. gondii*. Foram coletados 10 ml de sangue em 2 tubos contendo EDTA de cada paciente ou, alternativamente, 2 ml de LCR para o diagnóstico molecular. A definição da coleta de sangue ou LCR para cada paciente foi definida pelo clínico, mas em ambos os casos foram coletados antes ou até o terceiro dia de terapia específica para toxoplasmose.

3.2. Considerações éticas

Todos os pacientes que participaram da pesquisa aceitaram espontaneamente sua inclusão, pessoalmente ou através de familiares ou responsáveis. Todos assinaram o termo de consentimento que foi aprovado para este estudo nos Comitês de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz

(CEPIAL) (Anexo 1) e Conselho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz (Anexo 2).

3.3. Animais experimentais e *T.gondii*:

3.3.1. Manutenção e obtenção de cepas de *T. gondii*

As cepas RH, ME-49 e VEG foram gentilmente cedidas pelo laboratório de protozoologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo. Camundongos machos da linhagem Swiss com idade entre 25 e 30 dias foram provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

A cepa RH (não cistogênica) foi mantida em camundongos, semanalmente, por inóculos intraperitoneais com 1×10^5 taquizoítos/animal. Após quatro dias de infecção foram feitas lavagens intraperitoneais com 5 ml de solução salina (NaCl 0,85% estéril) para a retirada dos taquizoítos. Posteriormente os parasitas foram quantificados em câmara de Neubauer e acertados na concentração desejada. Os parasitas foram utilizados para a manutenção da cepa através de passagem para um novo grupo de animais e para a extração de DNA para o uso no diagnóstico molecular e genotipagem como controle positivo.

As cepas cistogênicas ME-49 e VEG foram mantidas por passagens seriadas, com intervalos de 30 a 45 dias em camundongos. Os inóculos foram orais contendo 10 cistos/animal em uma suspensão contendo o macerado de células cerebrais e PBS 0,01M pH 7.2 (ou NaCl 0,15M). Os cistos foram quantificados por microscopia óptica (400X) entre lâmina e lamínula (10 μ l da suspensão cerebral) e utilizados para extração de DNA para o uso como controle positivo na genotipagem.

3.4. Extração de DNA

3.4.1. Amostras de sangue

As amostras coletadas foram transferidas para um tubo de 15 ml, centrifugadas por 10 minutos a 2800 *g* para retirada de plasma. Posteriormente, nos tubos contendo o sedimento foram adicionados de 3 vezes o volume inicial, de tampão ACK (150 mM cloreto de amônio; 1 mM bicarbonato de potássio; 0,1 mM EDTA pH 7.3). Após incubação em temperatura ambiente sob agitação por 10 minutos para lisar as hemácias, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 2800 *g* e os sobrenadantes desprezados. Os sedimentos foram transferidos para tubos de 1,5 ml e, para que ocorresse a lise das células nucleadas adicionou-se 200 µl de um tampão de lise contendo 100 µg/ml Proteinase K; 50 mM Tris-HCl pH 8.0; 25 mM EDTA; 2% SDS. Os tubos foram agitados em vórtex e incubados por 30 minutos a 56°C.

Para a extração de DNA utilizou-se o método fenol-clorofórmio-isopropanol (Sambrook et al., 1989; Colombo et al., 2005). Aos tubos contendo as células lisadas foram adicionados 200 µl de fenol equilibrado e centrifugados por 10 minutos a 10.000 *g*. Os sobrenadantes foram retirados e transferidos para novos tubos e adicionados 200 µl de uma mistura de clorofórmio/isopropanol (24:1), agitados e centrifugados por 10 minutos a 10.000 *g*. Os sobrenadantes foram novamente transferidos para novos tubos e adicionados de 3 vezes o volume de isopropanol e agitados suavemente para a precipitação do DNA. A seguir, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 10.000 *g* e os sobrenadantes descartados. Os sedimentos contendo DNA foram lavados com 200 µl de álcool etílico 70% por centrifugação a 10.000 *g* por 10 minutos. Os tubos foram deixados a 4°C

para a evaporação do álcool. Após a secagem, as amostras de DNA foram re-hidratadas com 50 µl de água Milli-Q contendo 20 µg/ml de RNase.

3.4.2. Amostras de LCR

A metodologia utilizada foi descrita previamente por Vidal et al. (2004). As amostras de LCR foram transferidas para tubos de 1,5 ml e centrifugadas por 5 minutos a 10.000 g. Os sedimentos contendo células foram lavadas com 500 µl PBS estéril por centrifugação por 5 minutos a 10.000 g. Após o descarte dos sobrenadantes, foram adicionados aos sedimentos, 50 µl de água Milli-Q contendo 20 µg/ml de RNase e incubados a 100°C por 5 a 10 minutos.

3.4.3. Cepas de *T. gondii*

O DNA dos taquizoítos e cistos provenientes de camundongos foram extraídos pelo método fenol-clorofórmio-isoprpanol (Sambrook et al., 1989; Colombo et al., 2005) como descrito no item **3.4.1.** O grau de pureza das extrações e a quantidade de DNA das amostras foram determinados por absorbâncias em espectrofotômetro (HACH DR/4000 U) no comprimento de onda 260 e 280 nm (luz ultravioleta). O grau de pureza das extrações foi determinado pela razão entre as leituras D.O. 260/D.O. 280 que deveria apresentar valores entre 1,8 e 2,0. Amostras que apresentaram razão abaixo de 1,8 (presença de proteínas ou contaminantes) foram novamente processadas. As leituras realizadas a 260 nm determinaram as concentrações de DNA. Segundo Sambrook et al. (1989) absorbância igual à 1 equivale a concentração de 50 µg/ml de DNA de fita dupla.

3.5. Reação em cadeia de polimerase

As amplificações foram realizadas com um kit comercial (Amersham-Pharmacia-Biotech). Cada tubo contendo 1,5 unidades de Taq

DNA polimerase; 10 mM Tris-HCl pH 9.0; 50 mM de KCl; 1,5 mM MgCl₂; 200 mM de cada um dos desoxinucleosídeos trifosfatados. Em cada reação foram adicionados 5 µl de DNA proveniente de amostra de sangue ou 10 µl de DNA proveniente de amostra de LCR em um volume final de 25 µl completado com água ultra pura. As amplificações foram realizadas utilizando um termociclador (LongGene). Para cada reação foram adicionados um controle positivo, a partir de DNA extraído de taquizoítos e dois controles negativos. Em um adicionou-se DNA proveniente de um indivíduo sem toxoplasmose e em outro, água ultrapura que substituiu o DNA.

3.5.1. PCR-triagem

Foram utilizados 50 pmoles dos iniciadores B22 (5'AACGGGCGAGTAGCACCTGAGGAGA3') e B23 (5'TGGGTCTACGTCGATGGCATGACAAC3'), que amplificam uma sequência de 115 pb de uma região repetitiva do gene B1 de *T. gondii* (Burg et al., 1988; 1989). As amplificações consistiram de um ciclo inicial de desnaturação de 5 minutos a 95°C, uma segunda etapa com 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 62°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. Após essa etapa o processo foi finalizado por um ciclo final de extensão por 5 minutos a 72° C.

3.5.2. PCR-RFLP para Genotipagem

3.5.2.1. Validação

Os genótipos dos isolados de *T. gondii* foram determinados utilizando-se PCR-RFLP (Howe et al.,1997; Fazaeli et al., 2000; Fuentes et al., 2001; Khan et al., 2005b; Pena et al., 2005; Ferreira et al., 2006; Su et al., 2006; Dubey et al., 2007). Foram utilizados quatro marcadores: (i) 5'-SAG2 e (ii) 3'-SAG2 (Howe et al.,1997); (iii) SAG3 (Grigg et al., 2001b): e

(iiii) GRA6 (Khan et al., 2005b). As regiões gênicas alvo e suas localizações no genoma serão descritas em resultados.

3.5.2.2. Primeiro PCR (Multiplex)

Cada reação foi realizada adicionando-se ao kit de PCR 5 µl de cada amostra de DNA de sangue ou 10 µl de DNA de LCR ou 2 µl de DNA de cepas de *T.gondii*; 25 pmoles de cada um dos iniciadores em um volume final de 25 µl completado com água ultra pura. Foram utilizados na mesma reação 8 iniciadores externos dos quatro marcadores (3'- SAG2, 5 '-SAG2, SAG3 e GRA6) descritos na tabela 2. As amplificações consistiram de um ciclo inicial de desnaturação de 5 minutos a 95°C, uma segunda etapa com 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 segundos, a nelamento a 55°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, finalizando por um ciclo de extensão por 5 minutos a 72° C. Os produtos amplificados das amostras humanas não foram visualizados.

3.5.2.3. Segundo PCR

Para cada marcador realizou-se uma reação. As amplificações e concentrações de todos os componentes foram as mesmas descritas no item anterior (1º PCR), exceto as quantidades de DNA. Os produtos amplificados do 1º PCR (5 µl) foram diluídos 1:10 em água ultra pura ou 1:100 (cepas). Foram utilizados os iniciadores internos como descritos na tabela 2.

3.5.2.4. RFLP

O polimorfismo de cada locus foi analisado por RFLP. Os fragmentos amplificados do Nested-PCR foram digeridos com as enzimas de restrição apropriadas para os diferentes marcadores por 3 horas na temperatura adequada para cada enzima e de acordo com as instruções do

fabricante (Tabela 2). Para cada reação cepas RH (tipo I), ME-49 (tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como controles positivos, e água ultrapura como controle negativo.

3.6. Eletroforese em gel de agarose

Os produtos amplificados utilizados para o diagnóstico molecular e para genotipagem, bem como os produtos digeridos com as enzimas de restrição foram diluídos em tampão de amostra (30% glicerol, 0,25% xilenocianol FF, 0,25% azul de bromofenol) na proporção de 1:6 e separados por eletroforese em um sistema eletroforético horizontal em gel de agarose a 2% em TBE pH 8,0 (0,045M de Tris-Borato; 0,001M EDTA) com 0,5 µl/ml brometo de etídio, juntamente com o marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pb em uma velocidade de 6V/cm. As amostras foram visualizadas e fotografadas em um transluminador GeneGenius (Programa GeneSnap, Syngene, versão 6.08.04) de ultravioleta a uma longitude de onda de 302 nm (Sambrook et al., 1989).

3.7. Seqüenciamento do DNA

Foram escolhidas 3 amostras clínicas para que os produtos do segundo PCR dos marcadores 5'-SAG2, SAG3 e GRA6 fossem seqüenciados, pois cepas do tipo II são incomuns na América do Sul. Para efeito de comparação e alinhamento foram também seqüenciados os mesmos produtos provenientes das cepas padrão (tipos I, II e III). A tabela 3 mostra em detalhes as amostras escolhidas.

Previamente todos os produtos de PCR foram purificados com um kit comercial "Wizard SV gel e PCR Clean-up System kit" (PROMEGA). A cada produto de PCR foi adicionado o mesmo volume do tampão "Membrana Binding Solution" e transferido para uma minicoluna de afinidade "SV" acoplada a um microtubo. Após a incubação por 1 min a temperatura ambiente, a minicoluna foi centrifugada a 16000 g por 5 min e descartado o

sobrenadante. A seguir, a minicoluna foi lavada por duas vezes com 700µl de uma solução de lavagem “membrane wash solution” por centrifugação a 5 min a 16000g. O DNA foi eluído transferindo-se a minicoluna para um microtubo limpo e aplicado 50 µl de água ultrapura diretamente no centro da coluna, incubando por 1 min a temperatura ambiente e centrifugando-se por 5 min a 16000 g. A qualidade do produto foi analisado por eletroforese em gel 2% de agarose. As bandas foram quantificadas por comparação por padrão de massa molecular (Invitrogen). As intensidades das bandas obtidas de DNA purificado foram comparadas visualmente com os padrões e a concentração de DNA (em nanogramas) das amostras eram determinadas de acordo com a tabela fornecida pelo fabricante.

Os produtos purificados foram seqüenciados utilizando-se os dois iniciadores internos para cada marcador (5'-SAG2, SAG3 e GRA6) para obtenção das seqüências sense e antisense. Os seqüenciamentos foram realizados no “Laboratório de Genotipagem HIV do Instituto Adolfo Lutz” usando o kit “ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Reaction” e a eletroforese feita no ABI Prism 3100 DNA Sequencer. Os cromatogramas foram editados manualmente utilizando o software Sequencher (Gene Codes, USA). As seqüências foram alinhadas e analisadas no programa BioEDIT Sequence Alignment Editor. Todas as seqüências foram comparadas com outras depositadas no Genbank e os alinhamentos feitos no NCBI/ nucleotide-nucleotide BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). As seqüências foram depositadas no Genbank e os números de acesso citados em resultados e Figura 10.

Tabela 2: Iniciadores utilizados no primeiro PCR (Multiplex) e segundo PCR (Nested) e enzimas de restrição.

Locus (Localização no cromossomo)	Iniciadores externos 5' → 3'	Iniciadores internos 5' → 3'	(RFLP)^a	Referência
5'-SAG2 (VIII)	GCTACCTCGAACAGGAACAC GCATCAACAGTCTTCGTTGC	GAAATGTTTCAGGTTGCTGC GCAAGAGCGAACTTGAACAC	Sau3 AI/37°C	Howe et al., 1997
3'-SAG2 (VIII)	TCTGTTCTCCGAAGTGACTCC TCAAAGCGTGCATTATCGC	ATTCTCATGCCTCCGCTTC AACGTTTCACGAAGGCACAC	HhaI/37°C	Howe et al., 1997
SAG3 (XII)	CAACTCTCACCATTCCACCC GCGCGTTGTTAGACAAGACA	CACAAGGAGACCGAGAAGGA TCTTGTCGGGTGTTCACTCA	NciI/37°C	Grigg et al., 2001b
GRA6 (X)	ATTTGTGTTTCCGAGCAGGT GCACCTTCGCTTGTGGTT	TTTCCGAGCAGGTGACCT TCGCCGAAGAGTTGACATAG	MseI/37°C	Khan et al. , 2005b

a- enzima de restrição utilizada na temperatura de incubação apropriada.

Tabela 3: Descrição das amostras usadas para o seqüenciamento do DNA.

Cepas ou amostras	5'-SAG2 ^a	3'-SAG2 ^b	SAG3	GRA6
RH	<u>I/II</u> ^c	I/III	<u>I</u>	<u>I</u>
Me-49	<u>I/II</u> ^c	II	<u>II</u>	<u>II</u>
VEG	<u>III</u> ^c	I/III	<u>III</u>	<u>III</u>
CSd	I/II e III ^d	neg ^e	<u>II</u>	<u>II</u>
CSe	I/II	neg ^e	<u>II</u>	neg ^e
CSf	<u>I/II e III</u> ^d	I/III	II	neg ^e

^a Genótipos I e II são os mesmos; ^b Genótipos I e III são os mesmos; ^c Produtos do Nested-PCR de cada marcador foram usados para o seqüenciamento do DNA (sublinhados); ^d bandas de DNA presentes em ambos os alelos ; ^e neg: produto não amplificado

4. Resultados

4.1. PCR

As 87 amostras clínicas foram positivas na PCR, os marcadores B22 (5'AACGGGCGAGTAGCACCTGAGGAGA3') e B23 (5'TGGGTCTACGTCGATGGCATGACAAC3') amplificaram uma sequência de 115 pares de bases de uma região repetitiva do gene B1 de *T. gondii*. (Figura 4).

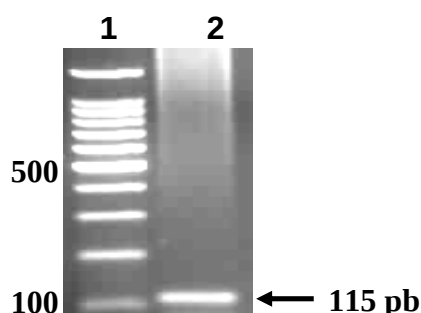


Figura 4: Produto da PCR da amostra analisada em gel de agarose 2%. (1) Massa molecular de 100 pb; (2) Amostra clínica.

4.2. Validação das reações de genotipagem

Antes de genotipar as amostras clínicas foi necessário validar cada passo da reação de PCR-RFLP e escolher os marcadores. As reações foram padronizadas utilizando-se cepas padrões (RH, ME-49 e VEG). A escolha dos marcadores foi baseada nos trabalhos de Howe et al., 1997 e Khan et al., 2005b. Cada marcador será descrito em detalhes nos itens abaixo. A Figura 5 mostra no mapa genético de *T. gondii* a localização dos marcadores escolhidos.

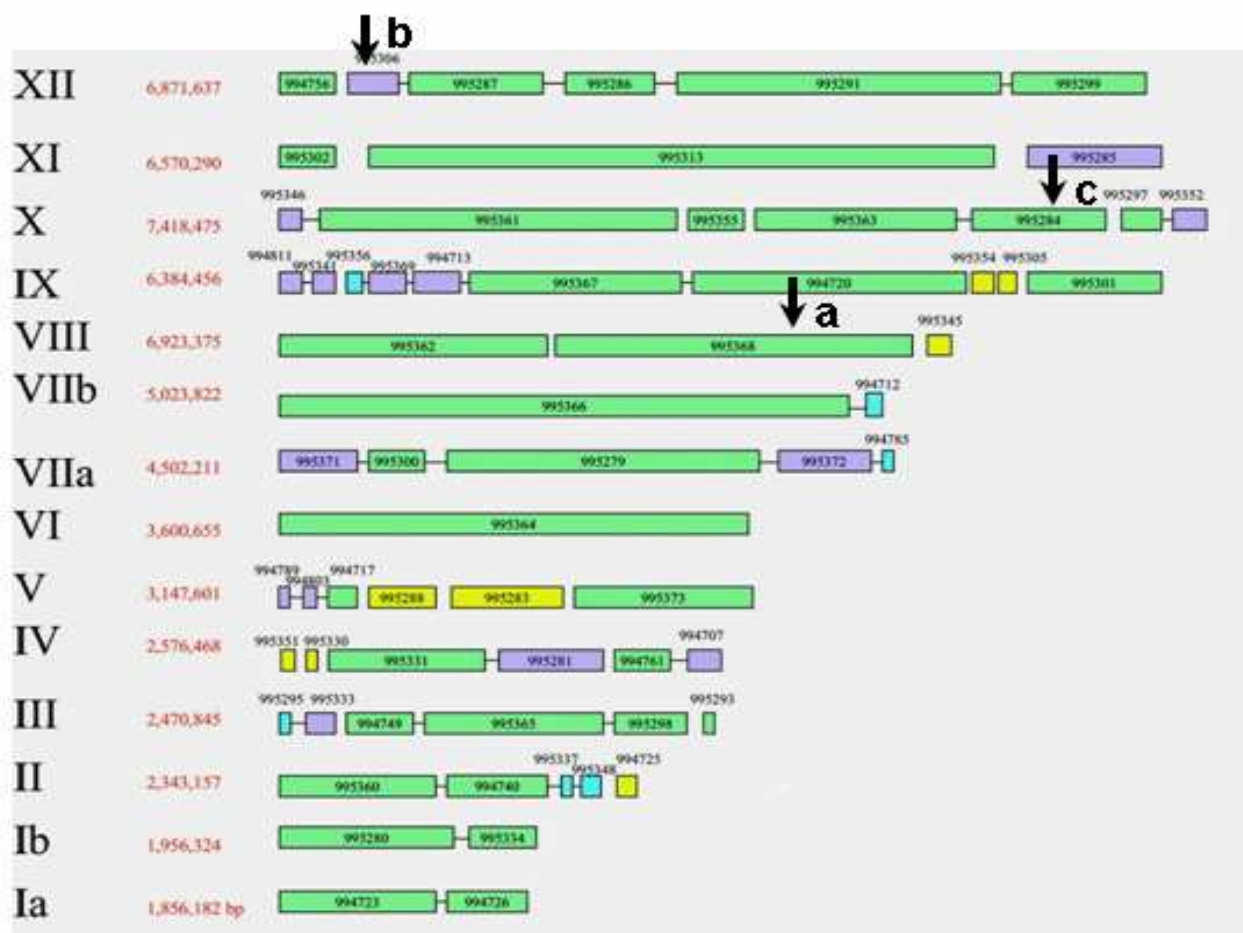


Figura 5: Cromossomos de *T. gondii* e a localização dos marcadores (Khan et al., 2005a). ^a Gene SAG2 contendo 5'-SAG2 e 3'-SAG2; ^b Gene SAG3 e ^c Gene GRA6.

Os primeiros marcadores escolhidos foram 5'-SAG2 e 3'-SAG2, Ambos projetados a partir do gene SAG2, localizado no cromossomo VIII (Howe et al., 1997; Khan et al., 2005a). O marcador 5'-SAG2 tem como alvo uma seqüência localizada na região 5' e o 3'-SAG2, uma seqüência próximo a região 3' do gene (Figura 6A). Para facilitar o entendimento, as figuras 6B e 6C mostram o esquema do 1º PCR e a localização dos iniciadores externos. Todos os iniciadores destes marcadores e dos outros descritos a seguir foram adicionados numa única reação (1º PCR-Multiplex). Este produto foi utilizado para amplificar as regiões internas de cada marcador. No 2º PCR (ou nested-PCR) os iniciadores internos (F e R2) do marcador da região 5' amplificaram um segundo produto de 242 pb (Figura 6D); e da região 3', um produto de 222 pb (Figuras 6E) Os fragmentos de 242 e 222 pb foram tratados com as enzimas de restrição *Sau3AI* e *HhaI* respectivamente. Os fragmentos no marcador 5'-SAG2 digeridos foram capazes de distinguir o genótipo III dos genótipos I e II (Figura 6F). Os fragmentos digeridos do marcador 3'-SAG2 distinguiram o genótipo II dos genótipos I e III (Figura 6G).

A seguir, optamos pelo marcador SAG3, projetado a partir do gene SAG3, localizado no cromossomo XII (Grigg et al., 2001b; Khan et al., 2005a) (Figura 7A). A figura 7B mostra o esquema do 1º PCR e a localização dos iniciadores externos. No 2º PCR, os iniciadores internos amplificaram um segundo produto de 225 pb (Figura 7C), que tratado com a enzima de restrição *NciI* distinguiu os genótipos I, II e III (Figura 7D).

O próximo marcador escolhido foi GRA6, projetado a partir do gene GRA6, localizado no cromossomo X (Khan et al., 2005a, Khan et al., 2005b) (Figura 8A). A figura 8B mostra o esquema do 1º PCR e a localização dos iniciadores externos. No 2º PCR foram utilizados iniciadores internos que amplificaram um segundo produto de 351 pb (Figura 8C), que digerido com a enzima de restrição *MseI* distinguiu os genótipos I, II e III (Figura 8D).

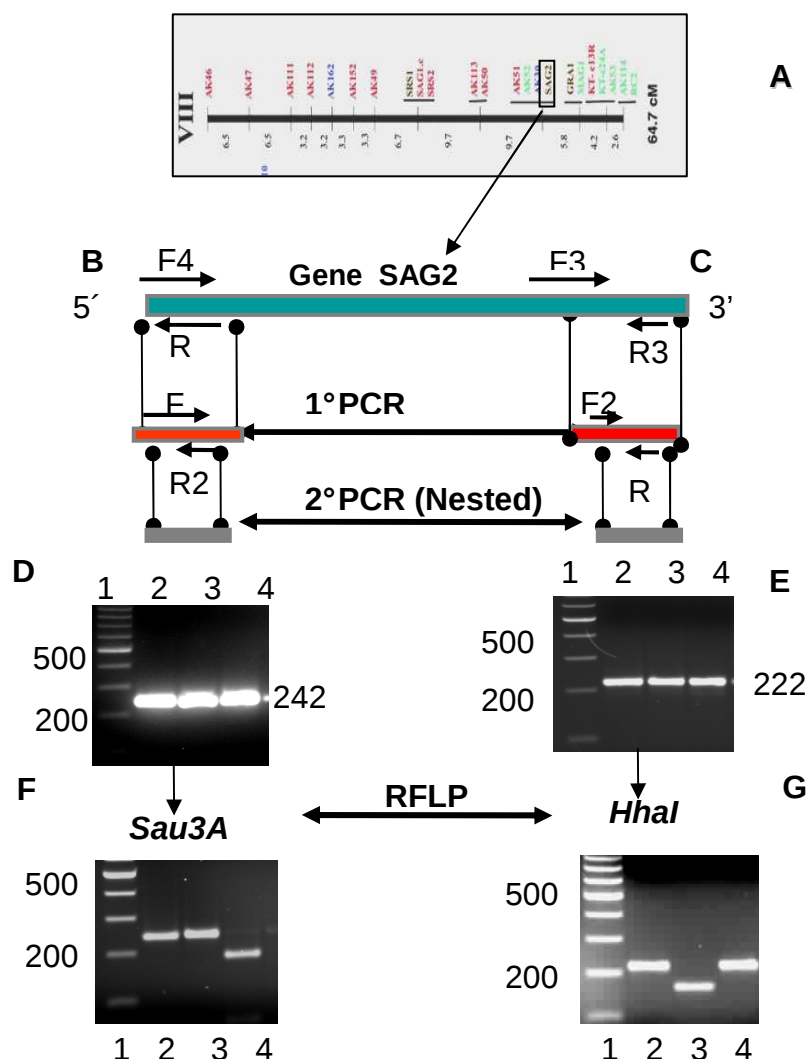


Figura 6: Localização do gene SAG2 no cromossomo VIII (A). Localização dos iniciadores F4 e R, na região 5' (B), e F3 e R3, na região 3' (C). Todos os iniciadores destes marcadores e dos outros descritos a seguir foram adicionados numa única reação (1° PCR - Multiplex). Amostras do 1° produto foram re-amplificadas (2° PCR ou "Nested") com os iniciadores internos F e R2 para o marcador 5'- SAG2 que amplificaram um produto de 242 pb (D), tratados com *Sau3A*/ geraram um perfil que distingue o genótipo do tipo III (F). Os iniciadores internos F2 e R (marcador 3'- SAG2) amplificaram um produto de 222 pb (E), tratados com *HhaI* geraram um perfil que distingue o tipo II (G). As amostras foram analisadas em gel de agarose 2%. (1) Massa molecular de 100 pb; (2) cepa RH - Tipo I; (3) cepa ME- 49 - Tipo II; (4) cepa VEG - Tipo III.

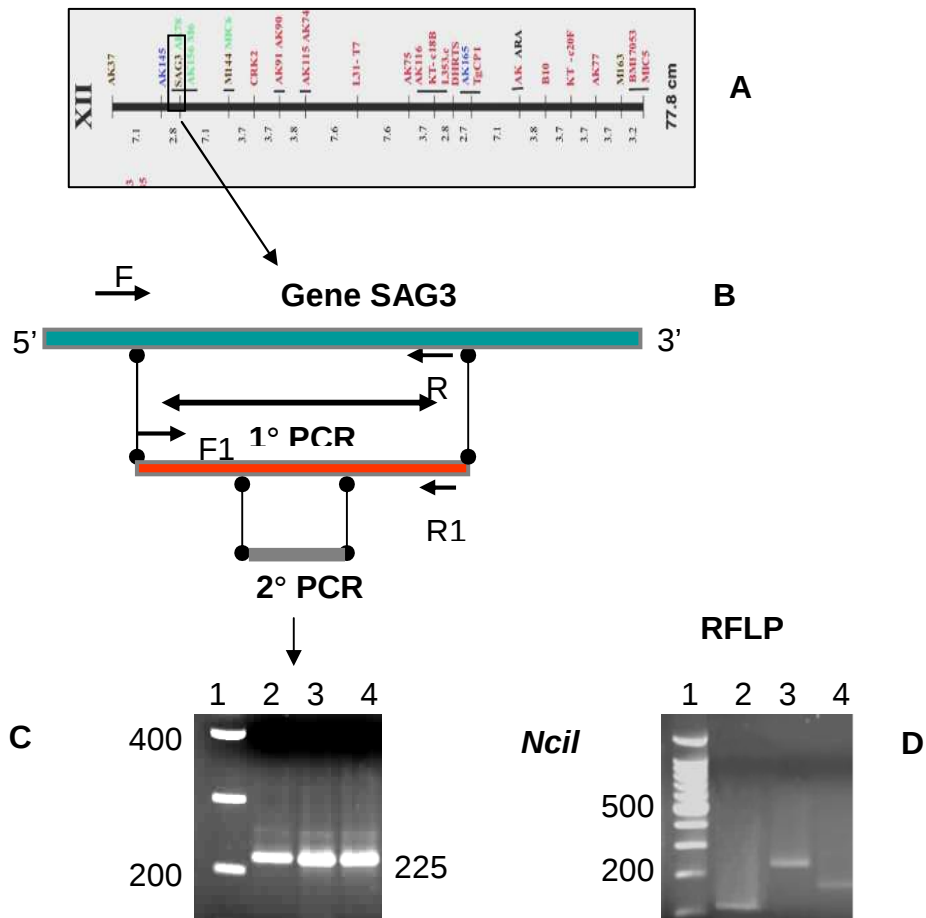


Figura 7: Localização do gene SAG3 no cromossomo XII (A). Localização dos iniciadores externos F e R (1°PCR - Multiplex) (B). Amostras do 1° produto foram re-amplificadas (2° PCR ou "Nested") com os iniciadores internos F1 e R1 que amplificaram produtos de 225 pb (C), tratados com *NciI* geraram um perfil que distingue os genótipos I, II e III (D). As amostras foram analisadas em gel de agarose 2%. (1) Massa molecular de 100 pb; (2) cepa RH - Tipo I; (3) cepa ME- 49 - Tipo II; (4) cepa VEG - Tipo III.

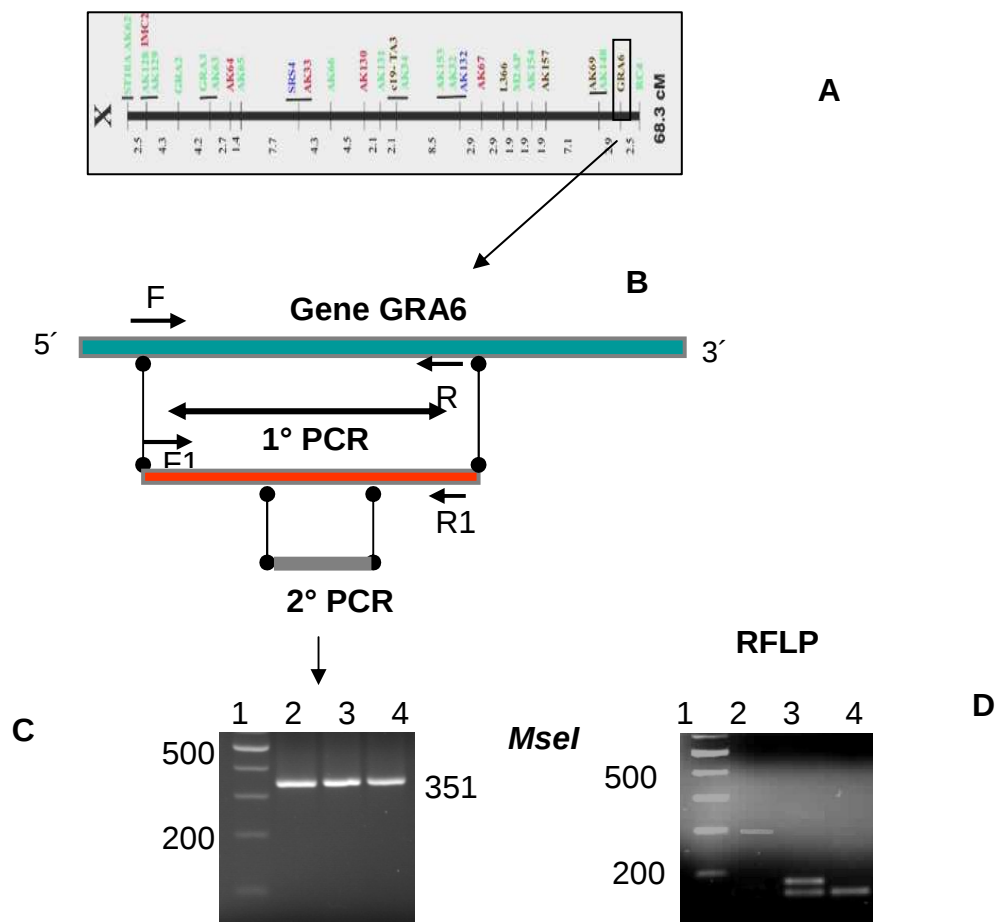


Figura 8: Localização do gene GRA6 no cromossomo X (A). Localização dos iniciadores F e R (1° PCR - Multiplex) (B). Amostras do 1° produto foram re-amplificadas (2° PCR ou "Nested") com os iniciadores internos F1 e R1 que amplificaram produtos de 351 pb (C), tratados com *MseI* geraram um perfil que distingue os genótipos I, II e III (D). As amostras foram analisadas em gel de agarose 2%. (1) Massa molecular de 100 pb; (2) cepa RH - Tipo I; (3) cepa ME -49 - Tipo II; (4) cepa VEG - Tipo III.

4.3 Caracterização genotípica das amostras clínicas

Todas as 87 amostras de DNA utilizadas neste trabalho analisadas por PCR-RFLP foram extraídas de amostras clínicas de pacientes com toxoplasmose cerebral e AIDS. Os critérios de diagnóstico foram baseados nos dados descritos no item 3.1 de Materiais e Métodos. A tomografia computadorizada e/ou ressonância magnética e o diagnóstico laboratorial (ELISA, IFI e PCR) confirmaram os dados clínicos.

Todos os iniciadores externos, assim como foi feita com as cepas padrão, foram adicionados em uma única reação (1º PCR-Multiplex). Na Nested-PCR, cada reação foi realizada separadamente com os iniciadores internos. Com o marcador 5'-SAG2 resultou em uma amplificação de 242 pb, o marcador 3'-SAG2 em uma amplificação de 222 pb, o marcador SAG3 em uma amplificação de 225 pb, e o marcador GRA6 em uma amplificação de 351 pb. Os fragmentos amplificados da Nested-PCR no marcador 5'-SAG2 digerido com a enzima de restrição *Sau3AI* distinguiu o genótipo III dos genótipos I e II, no marcador 3'-SAG2 utilizando a enzima *HhaI* distinguiu o genótipo II dos genótipos I e III, no marcador SAG3 utilizando a enzima *NciI* distinguiu os genótipos I, II e III, e no marcador GRA6 utilizando a enzima *MseI* distinguiu os genótipos I, II e III. A Tabela 4 apresenta de forma sintética os resultados obtidos. Dos 87 pacientes, 40 (46%) albergaram cepas com características genotípicas do tipo I, 9 (11%) do tipo II e 4 (4%) do tipo III. 13 (15%) amostras apresentaram genótipos polimórficos (atípicos) tendo alelos dos tipos I, II e III determinadas por mais de um marcador molecular (por diferentes *loci* 5'-SAG2, 3'-SAG2, SAG3 e GRA6). Amostras de 6 (7%) pacientes apresentaram alelos do tipo I ou II determinados somente pelo marcador 5'-SAG2. Finalmente, amostras de 15 (17%) pacientes com toxoplasmose cerebral não foram classificadas por nenhum destes marcadores. Nenhum produto foi detectado de controles negativos para todos os marcadores, verificando a ausência de contaminação.

A porcentagem dos genótipos encontrados entre os isolados dos pacientes esta ilustrada na Figura 9.

Os resultados do PCR-RFLP geraram alguns resultados conflitantes (i) 9 isolados clínicos classificados como tipo II são incomuns na América do Sul, e (ii) um elevado polimorfismo entre alelos de 13 isolados clínicos. Para ilustrar a figura 10 mostra produtos de restrição dos marcadores 5'-SAG2 e 3'-SAG2 de três isolados polimórficos (CSa, CSb e CSc), tendo a combinação dos três alelos I/II/III.

Para confirmar estes resultados, foi realizado o seqüenciamento de algumas amostras. Foram selecionadas duas amostras consideradas polimórficas (CSd e CSf) e uma considerada tipo II (CSe). A amostra CSd foi classificada como tipo II por SAG3 e GRA6, I/II ou III por 5'-SAG2 e negativo por 3'-SAG2. CSe foi classificada como tipo II por SAG3, I/II por 5'-SAG2, e negativo para SAG3 e GRA6. A amostra CSf como tipo II por SAG3, I/II ou III por 5'-SAG2, I/III por 3'-SAG2 e negativo para o GRA6.

As amostras seqüenciadas foram os produtos da Nested-PCR gerados pelos marcadores 5'-SAG2, SAG3 e GRA6. A fim de comparação das amostras clínicas com os arquétipos, os fragmentos da Nested-PCR das cepas RH, ME-49 e VEG também foram seqüenciadas. Todas as seqüências foram comparadas com outras já descritas. Os alinhamentos foram feitos no "NCBI/ nucleotide-nucleotide BLAST" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

A seqüência da amostra CSd (número de acesso Genbank EU053932) do marcador GRA6 (classificada como tipo II por este marcador) foi comparada com os genótipos arquétipos (I, II e III - número de acesso GenBank EU053933, EU053934, EU053935 respectivamente), sendo encontradas diferenças nucleotídicas (Figura 11A). Da mesma forma a figura 11B mostra as seqüências das amostras Csd e CSe (número de acesso Genbank EU053939 e EU053940 respectivamente) do marcador SAG3 (ambas classificadas como tipo II para este marcador) também comparadas com os três genótipos arquétipos (I, II e III - número de acesso GenBank EU053938, EU053937, EU053936 respectivamente). Finalmente a Figura 11C mostrou a seqüência da amostra CSf (número de acesso Genbank EU053941) do marcador 5'-SAG2 (classificada como tipo I/II e III para este

marcador) com algumas diferenças nucleotídicas quando comparadas com os genótipos I, II e III (número de acesso GenBank EU053942, EU053943, EU053944 respectivamente).

Tabela 4: Genótipos de *T. gondii* de pacientes com AIDS e Toxoplasmose cerebral ^a Genótipos I e II são os mesmos; ^b Genótipos I e III são os mesmos; ^c Ambos: bandas de DNA presentes em ambos alelos (I/II ou III para 5'-SAG2 ou I/III ou II para 3'-SAG2); ^d neg: produto não amplificado

<i>Locus</i> (Localização dos cromossomos)																	
Tipos de alelos																	
Genótipo	5'-SAG2 ^a (VIII)				3'-SAG2 ^b (VIII)				SAG3 (XII)				GRA6 (XI)				Número de pacientes
	I/II	III	ambos ^c	neg ^d	I/III	II	ambos ^c	neg ^d	I	II	III	neg ^d	I	II	III	neg ^d	
I	40	-	-	-	33	-	-	7	31	-	-	9	26	-	-	14	40
II	9	-	-	-	-	2	-	7	-	7	-	2	-	2	-	7	9
III	-	4	-	-	3	-	-	1	-	-	1	3	-	-	2	2	4
Polimórfico	1	1	8	3	7	-	2	4	1	8	-	4	1	1	-	11	13
I/II	6	-	-	-	-	-	-	6	-	-	-	6	-	-	-	6	6
Não determinadas	-	-	-	15	-	-	-	15	-	-	-	15	-	-	-	15	15
Total	56	5	8	18	43	2	2	40	32	15	1	39	27	3	2	55	87

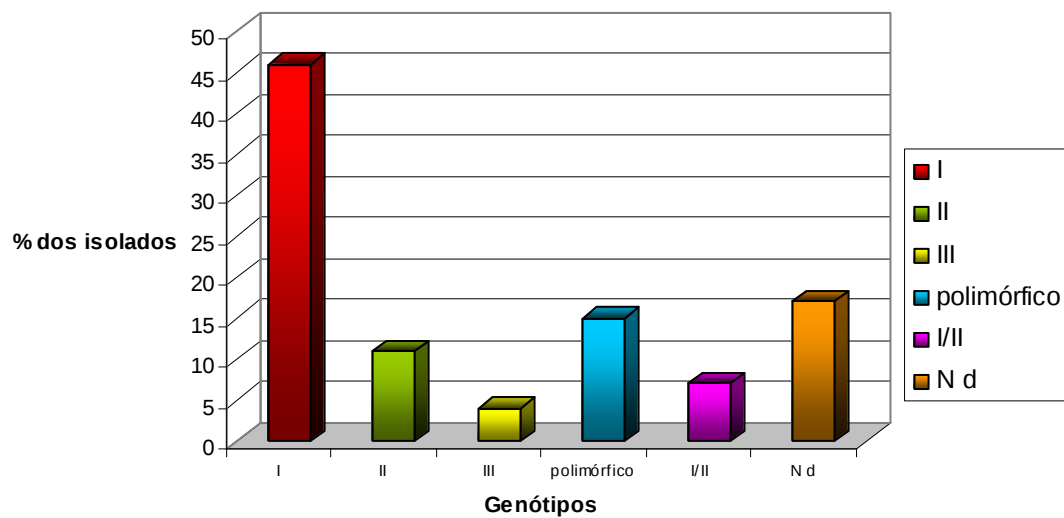


Figura 9: Distribuição dos genótipos determinados pela PCR-RFLP do *locus* SAG2, SAG3 e GRA6, das amostras *T. gondii* de isolados de pacientes com AIDS e toxoplasmose cerebral.

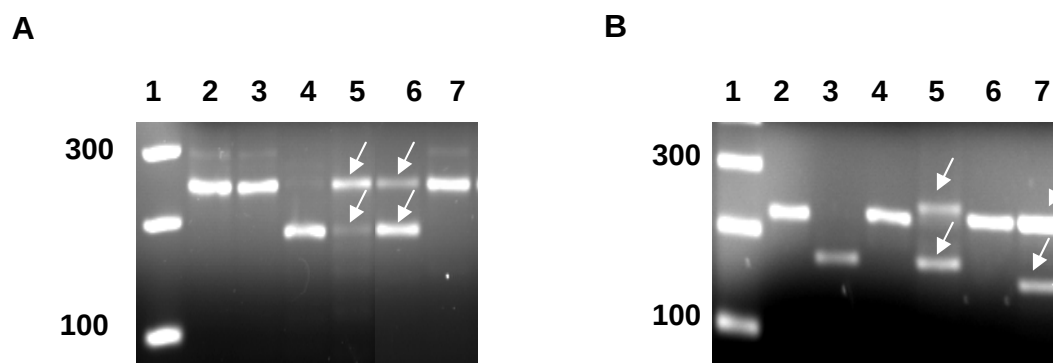


Figura 10: RFLP - produto amplificado de amostras clínicas polimórficas. 5'-SAG2 (A) e 3'-SAG2 (B) os produtos amplificados foram digeridos com a enzima de restrição *Sau3AI* e *HhaI* respectivamente. Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio: 1- Massa molecular (100pb); 2- Cepa RH (tipo I); 3- Cepa ME-49 (tipo II); 4- Cepa VEG (tipo III); 5, 6 e 7 - Amostras clínicas CSa, CSb e CSc. As setas mostram as combinações de alelos. Os orifícios receberam 5 µl do produto digerido.

A I 1 TGCTCTTCTGGTG-CACGTATTT-CGCT-TGTTGGTGA-TACCTTTTTTCTTGCTTCTG-CGGAGAAACGGCACACGGTGAATTCCATATGACACACA 10 0
 IIGCTC.....C.....A...T...C...T.C...C.A.C.....T.....GG-..
 III GCAG.....GCTC.C.....C...AA.....C...C.....A...T.....T.....
 CSd .A.....CTC.....GT-.....CT.....GGA...T...C...T.C.....C.....T.....GG-..

 I 101 TGAATACCTTCTGTC-TTTAACTGTGTCCAAAATTGCTGTGGTCTTTGTTTACTTCACTGCC-GTACTCGTCAATTCCTGGGGGATTCCCTGTACACT 200
 IIA.....C.....A...A..A.....-..G.T...A.A.A.....G..T...G...T...CG-..
 III ...A.....C.....A.....
 CSd A.CG.....C.....A.T...TTG..T.....A.A.....GT...T...G..G....CG-..

 I 201 CCCACAAAATGGTGTAAAGCAAACCCCTTCGCAAACCGGTTCCAGCGATGTACTTCCCGCTCATTGGGGA-CCACTGAAGACTATGT-CAACTCTTCAA 301
 II ..A.....A..G...C.....G.....G...G..G..A.T..T...GT...A.....A.....CTG...C.TC..
 IIIGCG...G.....T.....A.G...AAA.A.....A.....
 CSd .AA.G....A..G...C.....G.....G...G..A.T..T...GT...CAAA.A.....A.C....TG.CTCT.CA.C

B I 1 GACAGGTAGCCATTTCGCG-CTCGCGCCGG-CTGACTTTCTGTTCCAGCTTGAGTTTCCCGTCAGTTTCCGGCTGCGATCCTCCGCTTCTGGATGGCC 100
 II ..AG..GG.G.....C.T.....A.....
 III ..A.....-.....
 CSd .GA.C.....C.G....TGA.AGGTG..GG....AGAT-.....A...T.....A.....A.A.....
 CSe ..ACAA.GA.G...T.T.....TGA.AGGTG..GGG....AAGAT-.....A.-.....A.C.T..A...A.....

 I 101 GCCTCCGCCTCTCCCCACTTTCTGGGGTTCGGGCAACTCTCACTTTGACGTTGCAGAAGGGCGGCCGTCCACAGTGAGTGAACACCCGACAAGAA 198
 IIC...T.....
 III
 CSdT.....T.....G.....T.....C.....
 CSeT.....A.....T.....G.....T.....

C I 1 GCTA-CGAGC-CTGCCTGCGATTCTGTGTGTTGTTTC-CGGGTTGCAGTTCTAGGAAGTGAAGTTGTGATTGTGCACAATTGCGGTGTGACACCTTCTGTC 100
 IIG...T.....
 III .A..A.....G...T...-AC.....A.....
 CSf CA.....G...T.....C.....A.....

 I 101 TCGTTCCAATCTTTGTCTTGTGCGGAAGTATGAGTTTCTCAAAGACCACGAGCCTAGCGTCGCTAGCGCTCACGGGCTTGTGTTGTTCAAGTTTCGCTCTTGA 205
 II
 III
 CSf

Figura 11: Análise do polimorfismo de nucleotídeos nas seqüências dos genes: (A) GRA6 - Amostras de *T. gondii*: RH (I); ME-49 (II); VEG (III) (número de acesso Genbank EU053933, EU053934, EU053935 respectivamente) e amostra clínica CSd (número de acesso Genbank EU053932). (B) SAG3 - Amostras de *T. gondii*: RH (I); ME-49 (II); VEG (III) (número de acesso Genbank EU053938, EU053937, EU053936 respectivamente) e amostra clínica CSd e CSe (número de acesso Genbank EU053939, EU053940 respectivamente). (C) 5'-SAG2 - Amostras de *T. gondii*: RH (I); ME49 (II); VEG (III) (número de acesso Genbank EU053942, EU053943, EU053944 respectivamente) e amostra clínica CSf (número de acesso Genbank EU053941). Pontos (.) indicam nucleotídeos idênticos e traços (-), deleções comparadas com a seqüência da cepa RH (primeira linha). As letras traçadas indicam o mesmo nucleotídeo em ambas as amostras.

5. Discussão

A toxoplasmose é uma doença assintomática em grande parte da população mundial, mas quando é associada à AIDS via de regra ocorre a doença neurológica devido ao caráter oportunista do parasita. No Brasil, apesar dos avanços no tratamento da AIDS, a prevalência toxoplasmose cerebral em pacientes com esta doença ainda é alta e com considerável morbidade e mortalidade (Marins et al., 2003; Vidal et al. 2003; Antinori et al., 2004). Portanto estudos que avaliem diferentes parâmetros da infecção podem contribuir para o melhor entendimento desta infecção oportunista, bem como, a sua prevenção. Assim, este trabalho foi desenvolvido para genotipar cepas de *T.gondii* isoladas diretamente de amostras de DNA de sangue ou LCR de pacientes como objetivo de analisar a prevalência de cepas em pacientes brasileiros.

Os trabalhos pioneiros de genotipagem de cepas de *T.gondii* empregavam a PCR-RFLP com um único marcador. Somente as cepas clonais (tipos I, II e III) eram genotipadas, principalmente porque eram isoladas na Europa e América do Norte (Howe e Sibley, 1995; Howe e Sibley, 1997; Fuentes et al., 2001; Ajzenberg et al., 2004; Dardé, 2004). Mais recentemente, com o emprego de outros marcadores foram descritas recombinações entre os 3 arquétipos (Khan et al., 2005b; Ferreira et al., 2006; Su et al., 2006; Belfort-Neto et al., 2007; Dubey et al., 2007). Estes trabalhos relatam a presença de cepas não clonais e com uma elevada taxa recombinação. A partir da evolução da PCR-RFLP, outros estudos mostraram que as cepas na América do Sul são notadamente diferentes daquelas isoladas em hospedeiros da Europa ou Estados Unidos, na qual pode ser notada a predominância de cepas do tipo II (Howe e Sibley, 1995; Dardé, 1996; Owen e Trees, 1999; Dubey et al., 2003; Dubey et al., 2004). Tais estudos foram na sua maioria, realizados em cepas isoladas de animais domésticos, e mostraram que as cepas de nosso continente são mais virulentas e predominantemente do tipo I e III. (Dubey et al., 2003; Dardé, 2004; Santos et al., 2005; Da Silva et al., 2005; Khan et al., 2006; Lehmann

et al., 2006; Pena et al., 2006). Contudo, mais recentemente, ainda, com o desenvolvimento de outros marcadores foram descritas diferentes recombinações entre os 3 arquétipos . (Ferreira et al., 2006; Su et al., 2006; Belfort-Neto et al., 2007; Dubey et al., 2007). Estes trabalhos relatam a presença de cepas não clonais e com uma elevada taxa de recombinação, em razão do alto índice de transmissão da infecção que vigora em nosso meio. Portanto, para obter sucesso na genotipagem de cepas, principalmente, do Brasil, sugere-se o uso de diferentes marcadores. Alguns trabalhos utilizaram até 11 marcadores genéticos (Khan et al., 2005b; Ferreira et al., 2006; Su et al., 2006; Dubey et al., 2007). Recentemente, Pena et al. (2008), usando diferentes marcadores, analisaram 46 isolados de *T.gondii* provenientes de gatos do Estado de São Paulo e descreveram uma elevada diversidade genética, com 20 genótipos que divergem dos três genótipos clonais.

Este trabalho foi pioneiro no uso de um grande número de amostras clínicas, ao contrário de trabalhos anteriores cuja amostragem proveniente de pacientes foi reduzida (Khan et al., 2005b; Vallochi et al., Ferreira et al., 2006; 2005; Khan et al., 2006). Apesar do uso de somente quatro marcadores, foi possível diagnosticar uma alta diversidade gênica nestes isolados. Os dois marcadores que amplificam regiões do gene SAG2 utilizando a combinação de polimorfismos dos lados 5' e 3' genotiparam mais que 80% das amostras clínicas. O marcador que amplifica uma região do gene SAG3 distinguiu 55% das amostras, e o marcador dirigido para o gene GRA6, determinou somente 36% da amostras mostrando ser o marcador menos sensível. Contudo, 17% da amostras (de 15 pacientes) com PCR positiva não tiveram produtos amplificados em nenhum dos quatro marcadores. Estes resultados demonstram que mesmo usando quatro marcadores obteve-se baixa sensibilidade na genotipagem, quando comparados com os resultados obtidos na PCR, que foi realizada com o marcador B22-B23 do gene B1. A baixa sensibilidade destes marcadores pode ser atribuída aos seguintes fatores: A PCR foi realizada por um marcador, que amplifica um fragmento do gene B1 e se apresenta em 35

cópias por genoma (Van de Ven et al., 1991; Lamoril et al., 1996). Em contrapartida, as genotipagens foram realizadas por marcadores que amplificam fragmentos dos genes SAG2, GRA6 e SAG3 que se apresentam em cópia única por genoma (Khan et al., 2005b; Su et al., 2006). Outra possibilidade é o uso direto das amostras clínicas, onde na maioria das vezes, existe baixa quantidade de DNA do parasita. Estes resultados estão de acordo com outros autores que também realizaram as genotipagens diretamente de amostras clínicas (Fuentes et al., 2001; Gallego et al., 2006).

Além das 15 amostras (17%) não genotipadas, 46% foram classificadas como cepas do tipo I; 4%, cepas do tipo III; 11% foram classificadas como cepas do tipo II; e 15% mostraram genótipos incomuns. A predominância de cepas do tipo I infectando pacientes imunodeprimidos corrobora com estudos anteriores. Vallochi et al. (2005) verificaram uma predominância de cepas do tipo I, apesar do uso de somente do marcador SAG2 e reduzido número amostras clínicas brasileiras com retinocoroidite. Resultados similares foram descritos também, por Khan et al. (2005b) utilizando pequeno número amostras de pacientes imunocomprometidos americanos.

Como isolados do tipo II foram pouco relatados na América do Sul, o passo seguinte foi investigar as amostras destes resultados. Duas hipóteses foram levantadas, uma seria a possibilidade de encontrar cepas do tipo II por um ou mais marcadores uma vez que foi analisado um considerável número de amostras. A segunda hipótese seria relacionada à baixa reprodutibilidade dos resultados pela PCR-RFLP. Algumas amostras, quando repetidas mostraram resultados divergentes. Como o genoma apresenta diferentes recombinações, eventualmente seria possível detectar uma sequência do tipo II. Isso não exclui a possibilidade do mesmo ocorrer também com as cepas do tipo I e III. Atribuímos a esta baixa reprodutibilidade ao alto índice de recombinações destes isolados clínicos. Para avaliar esta hipótese, a amostra CSe, classificada como tipo II, foi escolhida aleatoriamente para o sequenciamento. O resultado revelou um elevado polimorfismo quando foi comparado com as sequências das cepas RH, ME-49 e VEG (tipos I, II e III).

Estes dados sugerem que os 9 isolados classificados como tipo II poderiam classificados como cepas polimórficas, uma vez que em nenhuma das 9 amostras foi genotipada como tipo II nos 4 marcadores.

Resultados similares podem ser atribuídos aos 13 isolados que mostraram genótipos incomuns e tiveram alelos dos tipos I, II e III em diferentes ou mesmo *locus*. O seqüenciamento de cepas deste tipo (amostras CSd e CSf) apresentaram similar polimorfismo do isolado CSe sendo classificada como polimórfica. Cepas polimórficas já foram relatadas anteriormente infectando porcos e galinhas brasileiros (Ferreira et al., 2006; Belfort-Neto, 2007; Dubey et al., 2007).

Estes dados sugerem que uma considerável parte da população brasileira deve estar infectada com cepas polimórficas. Esta diversidade genética não foi ainda encontrada nas amostras isoladas na Europa e nos Estados Unidos (Khan et al., 2007). Conclui-se, então, que os marcadores utilizados neste estudo foram impróprios para genotipar considerável parcela das amostras estudadas, desde que todos foram desenhados para discriminar cepas norte americanas ou européias.

De acordo com estudos preconizados por Ajzenberg et al. (2004), Khan et al. (2005a) e Dubey et al. (2007), mudanças nos genes de *T.gondii* podem ocorrer. Seria necessário que um hospedeiro definitivo ingerisse mais de uma presa, aproximadamente ao mesmo tempo, e estas estivessem infectadas por dois ou mais tipos de cepas. Supõe-se que além deste mecanismo, possam ocorrer mutações do parasita no hospedeiro intermediário (humanos ou animais domésticos). Assim, dispensa-se a recombinação do parasita na fase sexual pela exclusão do ciclo no hospedeiro definitivo. As mudanças genéticas ocorridas pode relacionar-se à manutenção do parasita em hospedeiros intermediários como pode ser visto nas cepas brasileiras. As mutações nas cepas poderiam induzir diferentes comportamentos no hospedeiro. Esta hipótese pode ser reforçada pela elevada prevalência de toxoplasmose na população brasileira. Dos indivíduos infectados, 10 a 20% desenvolvem a toxoplasmose ativa com elevada taxa de gravidade, morbidade e mortalidade. Adicionalmente,

daqueles que adquirem AIDS, considerável parte desenvolve a toxoplasmose cerebral severa, pois os parasitas são facilmente detectados no sangue periférico e LCR (Vidal et al. 2004; Colombo et al., 2005)

Apesar de não ter sido feita a avaliação da severidade da doença na admissão dos 87 pacientes incluídos neste estudo e nem após as duas semanas de tratamento, todos apresentaram características clínicas e radiológicas típicas de toxoplasmose cerebral e com sucesso no tratamento específico durante duas semanas.

6.Conclusões

- a)** Predominância da cepa tipo I (46%) infectando os pacientes.
- b)** Considerável porcentagem das amostras (15%) apresentou um elevado polimorfismo. Estes dados corroboram com a maioria dos trabalhos feitos na América do Sul, mostrando uma diversidade genética distinta daquelas encontrada na Europa e América do Norte.
- c)** Apesar do uso de quatro marcadores obteve-se uma baixa sensibilidade, quando compararmos com os resultados obtidos na PCR realizada com o marcador B22 - B23 do gene B1.
- d)** Os marcadores utilizados neste trabalho, que foram desenhados para genotipar cepas européias e norte americanas apresentaram baixa sensibilidade quando ensaiados em amostras brasileiras.

7. Referências Bibliográficas

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

Ajzenberg D, Cogné N, Paris L, Bessieres MH, Thulliez P, Fillisetti 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: 684-689.

Ajzenberg, D, Banñuls AL, Su C, Dume`tre A, Demar M, Carme B, et al. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. Int. J. Parasitol. 2004; 34: 1185-1196.

Alonso R, Martinez E, Laynez P, Miguelez M, Piñero JE, Valladares B. Detección mediante reacción en cadena de la polimerasa anidada de *Toxoplasma gondii* en pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. Med Clin. 2002; 118: 294-296.

Amato Neto V, Medeiros EAS, Levi GC, Duarte MIS. Toxoplasmose. 4º. Ed. Sarvier Editora de Livros Médicos - São Paulo. 1995; 29-37.

Amendoeira MRR; Da Costa T, Spalding SM. *Toxoplasma gondii* Nicolle e Manceaux, 1909 (Apicomplexa: Sarcocystidae) e a Toxoplasmose. Revista Souza Marques. 1999;1: 15-35.

Ammassari A, Cingolani A, Pezzotti P, De Luca A, Murri R, Giancola ML, Larocca LM, Antinori A. AIDS-related focal brain lesions in the era of highly active antiretroviral therapy. Neurology. 2000; 55: 1194-1200.

Antinori A, Ammassari A, De Luca A, Cingolani A, Murri R, Scoppettuolo G, et al. Diagnosis of AIDS-related focal brain lesions: A decision-making analysis based on clinical and neuroradiologic characteristics combined with polymerase chain reaction assays in CSF. *Neurology*. 1997; 48: 687-694.

Antinori S, Ridolfo AL, Gianelli E, Piazza M, Gervasoni C, Monforte AA. The role of lumbar puncture in the management of elevated intracranial pressure in patients with AIDS-associated cryptococcal meningitis. *Clin Infect Dis*. 2000; 31: 1309-1311.

Antinori A, Larussa D, Cingolani A, Lorenzini P, Bossolasco S, Finazzi MG, et al. Prevalence, associated factors, and prognostic determinants of AIDS-related toxoplasmic encephalitis in the era of advanced highly active antiretroviral therapy. *HIV/AIDS*. 2004; 39: 1681-1691.

Araújo FAP, Souza WJS, Silva NRS, Rodrigues RJD. Inquérito epidemiológico sobre a toxoplasmose em granjas de suínos na região da grande Erechim, RS, Brasil. *Arq Fac Vet UFRGS*. 2000; 28:61-69.

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

Barragan A, Sibley LD. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. *Trends in Microbiology*, Limerick. 2003; 11: 426-430.

Beamon MH, Luft BJ, Remington JS. Prophylaxis for toxoplasmosis in AIDS. *Ann Intern Med*. 1992; 117: 163-164.

Belfort-Neto R, Nussenblatt V, Rizzo L, Muccioli C, Silveira C, Nussenblatt R., et al. High prevalence of unusual genotypes of *Toxoplasma gondii*

infection in pork meat samples from Erechim, Southern Brazil. An. Acad. Bras. Cienc. 2007; 79: 111-114.

Bertozi LC, Suzuki LA, Rossi CL. Serological diagnosis of toxoplasmosis: usefulness of IgA detection and IgG avidity determination in a patient with a persistent IgM antibody response to *Toxoplasma gondii*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1999; 41: 175-177.

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

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

Bowie WR, King AS, Werker DH. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. Lancet. 1997; 350:173-177.

Brindley PJ, Gazzinelli RT, Denkers EY, Davis SW, Dubey JP, Belfort Jr. R, et al. Differentiation of *Toxoplasma gondii* from closely related coccidia by riboprint analysis and a surface antigen gene polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg. 1993; 48: 447-456.

Brooks RG, McCabe RE, Remington JS. Role of serology in the diagnosis of toxoplasmic lymphadenopathy. Rev. infect. Dis. 1987; 9: 1055-1062.

Buchbinder S, Blatz R, Rodloff AC. Comparison of real-time PCR detection methods for B1 and P30 genes of *Toxoplasma gondii*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2003; 45: 269-71.

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.

Burg JL, Perelman D, Kasper LH, Ware PL, Boothroyd JC. Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 1988; 141:3584–3591.

Burg JL, Grove CM, Pouletty P, Boothroyd JC. Directed and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1989; 27:1787–1792.

Camargo ME, Leser PG, Rocca A. Rheumatoid factors as a cause for false positive IgM anti-Toxoplasma fluorescent tests. A technique for specific results. *Rev Inst MedTrop São Paulo.* 1972; 14: 310-313.

Camargo ME. Toxoplasmosis *In*: Ferreira AW, Ávila SLM (eds) Diagnóstico Laboratorial das principais doenças auto-imunes. Editora Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro. 1996; 165-174.

Cantos GA, Prando MD, Siqueira MV, Teixeira RM. Toxoplasmose: ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e diagnóstico. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 2000; 46:335-341.

Centers for Disease Control and Prevention. Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *JAMA.* 1993; 10: 729-730.

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

Chabbert E, Lachaud L, Crobu L, Bastien P. Comparison of two widely used PCR primer systems for detection of toxoplasma in amniotic fluid, blood, and tissues. J Clin Microbiol. 2004; 42: 1719-1722.

Cingolani A, De Luca A, Ammassari A, Murri R, Linzalone A, Grillo R, Antinori A. PCR detection of *Toxoplasma gondii* DNA in CSF for the differential diagnosis of AIDS-related focal brain lesions. J Med Microbiol. 1996; 45: 472-476.

Cingolani A, De Luca A, Larocca LM, Ammassari A, Scerrati M, Antinori A, Ortoni L. Minimally invasive diagnosis of acquired immunodeficiency syndrome-related primary central nervous system lymphoma. J Natl Cancer Inst. 1998; 90: 364-369.

Cinque P, Vago L, Dahl H, Brytting M, Terreni MR, Fornara C, et al. Polymerase chain reaction on cerebrospinal fluid for diagnosis of virus-associated opportunistic diseases of the central nervous system in HIV-infected patients. AIDS. 1996; 10: 951-958.

Coelho RAI.; Kobayashi M; Carvalho LB. Prevalence of IgG antibodies specific to *Toxoplasma gondii* among blood donors in Recife, Northeast Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2003; 45: 229- 231.

Cohen BA. Neurological manifestations of toxoplasmosis in AIDS. Sem Neurol. 1999; 19: 201-211.

Colombo FA, Vidal JE, Penalva de Oliveira AC, Hernández AV, Bonasser-Filho F, Nogueira RS, et al. Diagnosis of cerebral toxoplasmosis in AIDS patients in Brazil: importance of molecular and immunological methods using peripheral blood samples. J. Clin. Microbiol. 2005; 43: 5044-5047.

Contreras MD, Sandoval ML, Salinas P, Muñoz P, Vargas S. Utilidad diagnóstica de ELISA IgG, IgM, IgA y ELISA avidéz de IgG em toxoplasmosis reciente y cronica. BolChil. Parasitol 2000; 55: 1-10.

Coutinho SG, Morgado A, Wagner M, Lobo R, Suttmoller F. Outbreak of human toxoplasmosis in a rural área. A three years serologic follow-up study. Mem Inst Oswaldo cruz. 1982; 77:29-36.

Cozon GJ, Ferrandiz J, Nebhi H, Wallon M, Peyron F. Estimation of the avidity of immunoglobulin G for routine diagnosis of chronic *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1998; 17: 32-36.

Da Silva AV, Pezerico SB, de Lima VY, d'Arc Moretti L, Pinheiro JP, Tanaka EM, et al. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains isolated from dogs with neurological signs. 2005; 127: 23-27.

Dannemann BR, Israelski DM, Leoung GS, McGraw T, Mills J, Remington JS. Toxoplasma serology, parasitemia and antigenemia in patients at risk for toxoplasmic encephalitis, AIDS. 1991; 5: 1363-1365.

Dardé ML, Bouteille B, Pestre-Alexandre M. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. J Parasitol. 1992; 78: 731-734.

Dardé ML. Biodiversity in *Toxoplasma gondii*. Curr Top Microbiol Immunol. 1996; 219: 27-41.

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

Decoster A, Darcy F, Caron A. IgA antibodies against P30 as markers of congenital and acute toxoplasmosis. *Lancet*. 1988; 2:1104-1107.

Dubey JP, Frenkel JK. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *J Protozool*. 1972; 1:155-77.

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

Dubey JP, Beattie CP. Toxoplasmosis of animals and man. Press 1988; 41-60.

Dubey JP, 1996. *Toxoplasma gondii*, p 84. In S. Baron, R., C. Peake, D. A. James, M. Susman, C. A. Kennedy, M. J. D. Singleton, and S. Schuenke (ed.), Medical Microbiology, 5th ed. The University of Texas. Texas. [Online.] www.ncbi.nlm.nih.gov/books

Dubey JP. Toxoplasmosis - An overview. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1991; 22 : 88-119.

Dubey JP. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 1998; 7: 1019-1024.

Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structure of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. *Clin Microbiol. Rev* 1998; 11 (2): 267-299.

Dubey JP, Graham DH, Blackston CR, Lehmann T, Gennari SM, Ragozo AM, et al. Biological and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from São Paulo, Brazil: unexpected findings. *Int J Parasitol*. 2002; 32: 99-105.

Dubey JP, Navarro IT, Graham DH, Dahl E, Freire RL, Prudêncio LB, et al. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens from Paraná, Brazil. *Veterinary Parasitology*. 2003; 117: 229-234.

Dubey JP, Navarro IT, Sreekumar C, Dahl E, Freire RL, Kawabata HH, et al. *Toxoplasma gondii* infections in cats from Paraná, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. *J. Parasitol.* 2004; 90: 721-726.

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

Dupon M, Cazenave J, Pellegrin JL, Ragnaud JM, Cheyrou A, Fischer I, et al. Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR and tissue culture in cerebrospinal fluid and blood of human immunodeficiency virus-seropositive patients. *J Clin Microbiol.* 1995; 33: 2421-2426.

Dupouy-Camet J, de Souza SL, Maslo C, Paugam A, Saimot AG, Benarous R, et al. Detection of *Toxoplasma gondii* in venous blood from AIDS patients by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1993; 31: 1966-1969.

Eggers C, Grob U, Klinker H, Schalke B, Stellbrink HJ, Kunze K. Limited value of cerebrospinal fluid for direct detection of *Toxoplasma gondii* in toxoplasmic encephalitis with AIDS. *J Neurol.* 1995; 242: 644-649.

Fazaeli A, Carter PE, Darde ML, Pennington TH. Molecular typing of *Toxoplasma gondii* strains by GRA6 gene sequence analysis. *Int J Parasitol.* 2000; 30:637-42.

Ferguson DJ. *Toxoplasma gondii* and sex: essential or optional extra? Trends of Parasitology. 2002; 18: 355-359.

Ferreira MS. Infections by protozoa in immunocompromised hosts. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000; 95 (suppl I): 159-162.

Ferreira AW, Ávila SLM. Sorologia: Importância e Parâmetros. In: Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-imunes. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan: 2001. p. 1-8.

Ferreira AM, Vitor RWA, Gazzinelli RT, Melo MN. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR –RFLP. Inf. Gen. Evolut. 2006; 6: 22–31.

Filice GA, Hitt JA, Mitchell CD, Blackstad M, Sorensen SW. Diagnosis of *Toxoplasma* parasitemia in patients with AIDS by gene detection after amplification with polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1993; 31: 2327- 2331.

Franzen C, Altfeld M, Hegener P, Hartmann P, Arendt G, Jablonowski H, et al. Limited value of PCR for detection of *Toxoplasma gondii* in blood from human immunodeficiency virus-infected patients. J Clin Microbiol. 1997; 35: 2639-2641.

Fuentes I, Rodriguez M, Domingo CJ, del Castillo F, Juncosa T, Alvar J. Urine sample used for congenital toxoplasmosis diagnosis by PCR. J Clin Microbiol. 1996; 34: 2368-71.

Fuentes I, Rubio JM, Ramirez 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: 1566-1570.

Gallego C, Saavedra-Matiz C, Gómez-Marín JE. Direct genotyping of animal and human isolates of *Toxoplasma gondii* from Colombia (South America). *Acta Tropica* 2006; 97: 161-167

Garcia JS, Navarro IT, Ogawa L, Oliveira RC, Garcia SMF et al. Seroepidemiologia da toxoplasmose e avaliação ocular pela tela de Amsler em pacientes da zona rural, atendidos na unidade de saúde do município de Jaguapitã, PR, Brasil. *Ver Bras Med Trop* 1999; 32: 671-676.

Garweg JG, Jacquier P, Boehnke M. Early aqueous humor analysis in patients with human ocular toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 996-1001.

Glasner PD, Silveira C, Kruszon-Moran D, Martins MC, Burnier Jr M, Silveira S, Camargo ME, Nussenblatt RB, Kaslow RA, Belfort Jr. R. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in Southern Brazil. *American Journal of Ophthalmology*.1992; 114: 136-144.

Gianotti N, Cinque P, Castagna A, Novati R, Moro M, Lazzarin A. Diagnosis of toxoplasmic encephalitis in HIV-infected patients. *AIDS*. 1997; 11: 1529-1530.

Gilbert R. Screening option in the management of congenital toxoplasmosis. *Clinical Laboratory International*. 2004; 28: 8-12.

Grigg ME, Bonnefoy S, Hehl AB, Suzuki Y, Boothroyd JC. Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. *Science*. 2001a; 294: 161-165.

Grigg ME, Ganatra J, Boothroyd JC, Margolis TP. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. *J. Infect. Dis*. 2001b; 184: 633–639.

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

Grigg ME, Suzuki Y. Sexual recombination and clonal evolution of virulence in *Toxoplasma*. Microbes Infect. 2003; 5: 685-90.

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

Grover CM, Thulliez P, Remington JS, Boothroyd JD. Rapid prenatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid. J clin microbial. 1990; 28: 2297-2301.

Guimarães ACS, Kawarabayashi M, Borges MM, Tolezano JE, Andrade Jr HF. Regional variation in toxoplasmosis seronegativity in the São Paulo metropolitan region. Rev Inst Méd Trop SP. 1993; 35: 479-483.

Hedman K, Lappalainen M, Seppala I, Makela O. Recent primary *Toxoplasma* infection indicated by a low avidity of epecific IgG. J. Infect Dis. 1989; 159: 736-739.

Hellerbrand C, Goebel FD, Disko R. High predictive value of *Toxoplasma gondii* IgG antibody levels in HIV-infected patients for diagnosis of cerebral toxoplasmosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1996; 15: 869-872.

Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. Clin Microbiol Infect. 2002; 8: 634-640.

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

Hohlfeld P, Daffos F, Thulliez P, Aufrant C, Couvreur J, MacAleese J, et al. Fetal toxoplasmosis outcome of pregnancy and infant follow-up after in utero treatment. J Pediatr 1989; 115: 765-9.

Hohlfeld P, Daffos F, Costa JM, 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; 331: 695-699.

Holliman RE. Toxoplasmosis and the acquired immune deficiency syndrome. J Infect. 1988; 16: 121-128.

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

Howe DK; Summers BC, Sibley LD. Acute virulence in mice is associated with markers on chromosome VIII in *Toxoplasma gondii*. Infect Immun. 1996; 64: 5193-5198.

Howe DK, Honoré S, Derouin F, Sibley LD. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. J. Clin. Microb. 1997; 35: 1411-1414.

James GS, Sintchenko VG, Dickeson DJ, Gilbert GL. Comparison of cell culture, mouse inoculation, and PCR for detection of *Toxoplasma gondii*: effects of storage conditions on sensitivity. J Clin Microbiol. 1996; 34: 1572-1575.

Jenun PA, Holberg-Petersen M, Melby KK, Stray-Pedersen B. Diagnosis of congenital *Toxoplasma gondii* infection by polymerase chain reaction (PCR) on amniotic fluid samples. The Norwegian experience. APMIS.1998; 106: 680-686.

Joss AW, Chatterton JM, Evans R, Ho-Yen Do. *Toxoplasma* polymerase chain reaction on experimental blood samples. J Med Microbiol.1993; 38: 38-43.

Jones CD, Okhravi N, Adamson P, Tasker S, Lightman S. Comparison of PCR detection methods for B1, P30, and 18S rDNA genes of *T. gondii* in aqueous humor. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2000; 41: 634-644.

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

Julander I, Martin C, Lappalainen M, Guy E, Isberg B, Evengard B. Polymerase chain reaction for diagnosis of cerebral toxoplasmosis in cerebrospinal fluid in HIV-positive patients. Scand J Infect Dis. 2001; 33: 538-541.

Kawarabayashi M, Aureliano DP, Raymundo ML, Garcia RA, Costa-Silva TA, Castellão KG, et al. Frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em mulheres atendidas nas unidades da rede de saúde pública da região metropolitana de São Paulo (2001-2005). Rev. Inst. Adolfo Lutz. 2007; 66: 63-67.

Kawazoe U. *Toxoplasma gondii*. In: NEVES, D.P. Parasitologia Médica. 9. ed. São Paulo: Atheneu, 1995. p.174-187.

Khalifa KES, Roth A, Roth B, Arasteh KN, Janitschke K. Value of PCR for evaluating occurrence of parasitemia in immunocompromised patients with cerebral and extracerebral toxoplasmosis. J. Clin. Microbiol. 1994 ;32: 2813-2819.

Khan EA, Correa AG. Toxoplasmosis of the central nervous system in non-human immunodeficiency virus-infected children: case report and review of the literature. The Pediatric Infectious Diseases Journal.1997; 16: 611-618.

Khan AS, Taylor C, Su AJ, Mackey J, Boyle RH, Cole, et al. Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. Nucleic Acids Res. 2005a. 33: 2980–2992.

Khan A, Su C, German M, Storch GA., Clifford DB., Sibley LD. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from immunocompromised patients reveals high prevalence of type I strains. J. Clin. Microbiol. 2005b; 43, 5881–5887.

Khan A, Jordan C, Muccioli C, Vallochi AL, Rizzo LV, Belfort Jr, Ricardo WA, Silveira C, Sibley LD, Genetic divergenci of *Toxoplama gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. Emerg.Infect Dis. 2006; 12:942-949.

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. PNAS. 2007; 104: 14872–14877.

Kravetz JD, Federman DG. Toxoplasmosis in pregnancy. Am J Med. 2005; 118: 212-216.

Lamoril J, Molina JM, de Gouvello A, Garin YJ, Deybach JC, Modai J, et al. Detection by PCR of *Toxoplasma gondii* in blood in the diagnosis of cerebral toxoplasmosis in patients with AIDS. J Clin Pathol. 1996; 49: 89-92.

Lappalainen M, Hedman K. Serodiagnosis of toxoplasmosis. The impact of measurement of IgG avidity. Ann Ist Super Sanita. 2004; 40: 81-88.

Lehmann T, Marcet PL, Graham DH, Dahl ER, Dubey JP. From the Cover: Globalization and the population structure of the *Toxoplasma gondii*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2006; 103: 11423-11428.

Lekutis C, Ferguson DJ, Boothroyd JC. *Toxoplasma gondii*: identification of a developmentally regulated family of genes related to SAG2. Exp Parasitol. 2000; 96: 89-96.

Liesenfeld O, Montoya JG, Kinney S, Press C, Remington JS. Effect of testing for IgG avidity in the diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women: experience in a US reference laboratory. J Infect Dis. 2001; 183: 1248-1253.

Leser, P. G. et al. A utilização do teste de avidéz de IgG para auxiliar a interpretação das reações sorológicas para toxoplasmose com IgM positiva. Rev Soc Bras Med Fetal. 2000; 5: 16-20.

Lindstrom I, Kaddu-Mulindwa DH, Kironde F, Lindh J. Prevalence of latent and reactivated *Toxoplasma gondii* parasites in HIV-patients from Uganda. Acta Tropica. 2006; 100: 218-222.

Literák I, Rychlík I, Svobodová V, Pospíšil Z. Restriction fragment length polymorphism and virulence of Czech *Toxoplasma gondii* strains. Int J Parasitol, 28: 1367-1374, 1998.

Luft BJ, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis. Clin. Infect. Dis. 1992; 15: 211-222.

Luft BJ, Hafner R, Korzun AH, Leport C, Antoniskis D, Bosler EM, et al. Toxoplasmic encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome - Members of the ACTG 077p/ANRS 009 Study Team. N Engl J Med. 1993; 329: 995-1000.

Luft BJ, Chua A. Central Nervous System toxoplasmosis in HIV: pathogenesis, diagnosis, and therapy. Curr Infect Dis Rep. 2000; 2: 358-362.

Marins JR, Jamal LF, Chen SY, Barros MB, Hudes ES, Barbosa AA, et al. Dramatic improvement in survival among adult Brazilian AIDS patients. AIDS. 2003; 17: 1675-1682.

Meireles LR, Galisteo AJ Jr, Pompeu E, Andrade HF Jr. Toxoplasma gondii spreading in an urban area evaluated by seroprevalence in free-living cats and dogs. Trop Med Int Health. 2004; 9: 876-81.

Minkoff H, Remington JS, Holman S, Ramirez R, Goodwin S, Landesman S. Vertical transmission of *Toxoplasma* by human immunodeficiency virus-infected women. Am J Obstet Gynecol. 1997; 176: 555-559.

Montoya JG, Remington JS. Toxoplasmic chorioretinitis in the setting of acute acquired toxoplasmosis. Clinical Infectious Diseases. 1996; 23: 277-282.

Montoya JG, Parmley S, Liesenfeld O, Jaffe GJ, Remington JS. Use of the polymerase chain reaction for diagnosis of ocular toxoplasmosis. Ophthalmology. 1999; 106: 1554-1563.

Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. The Lancet. 2004; 363: 1965-1976.

Mordue DG, Monroy R , La Regina M, Dinarello CA, Sibley LD. Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. J Immunol.. 2001; 167: 4574-84.

Neto EC, Anele E, Rubim R, Brites A, Schulte J, Becker D, et al. High prevalence of congenital toxoplasmosis in Brazil estimated in a 3-year prospective neonatal screening study. Int J Epidemiol 2000; 29: 941-947.

Nicolle C.; Manceaux L. Sur une infection a corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. C R Acad Sci (Paris). 1908; 147: 763-766.

Nóbrega OT, Karnikowski MGO. Na estimation of the frequency of gestational toxoplasmosis in the Brazilian Federal District. Rev Soc Bras Med Trop. 2005; 38: 358-360.

Novati R, Castagna A, Morsica G, Vago L, Tambussi G, Ghezzi S, et al. Polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii* DNA in the cerebrospinal fluid of AIDS patients with focal brain lesions. AIDS. 1994; 8: 1691-1694.

Nowakowska D, Colon 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. Journal of Clinical Microbiology. 2006; 44: 1382-1389.

Nussenblatt RB, Belfort Jr. R. Ocular Toxoplasmosis: An old disease revisited. Journal of American Medical Association .1994; 271: 304-307.

Oksenhendler E, Charreau I, Tournier C, Azihary M, Carbon C, Aboulker JP. *Toxoplasma gondii* infection in advanced HIV infection. AIDS. 1994.; 8: 483-487.

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

Parmley SF, Goebel FD, Remington JS. Detection of *Toxoplasma gondii* in cerebrospinal fluid from AIDS patients by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1992; 30: 3000-3002.

Peyron F, Lobry JR., Musset K, Ferrandiz J, Gomez-Marin JE., Petersen E, et al. Serotyping of *Toxoplasma gondii* in chronically infected pregnant women: predominance of type II in Europe and types I and III in Colombia (South America). Microbes Infect. 2006; 8:2333-2340.

Pelloux H, Dupouy-Camet J, Derouin F, Aboulker JP, Raffi F. 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. Bio-Toxo Study Group. AIDS. 1997; 11: 1888-1890.

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

Pena HF, Gennari SM, Dubey JP, Su C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. Int J Parasitol. 2008; 38:561-569.

Petersen E, Pollak A, Reiter-Owona I. Recent trends in research on congenital toxoplasmosis. Int. J. Parasitol. 2001; 31: 115-144.

Pfefferkorn LC e Pfefferkorn ER. *Toxoplasma gondii*: genetic recombination between drug resistant mutants. Exp. Parasitol. 1980; 50:305-316.

Portegies P, Solod L, Cinque P, Chaudhuri A, Begovac J, Everall I, et al. 2004. Guidelines for the diagnosis and management of neurological complications of HIV infection. Eur J Neurol 2004. 11, 297-304.

Porter SB, Sande MA. Toxoplasmosis of the central nervous system in the acquired immunodeficiency syndrome. N. Eng. J. Med. 1992; 327: 1643-1648.

Priya J, Calderón MM, Gilman RH, Quispe ML, Cok J, Ticona E, et al. Optimization and evaluation of a PCR assay for detecting toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. J. Clin. Microbiol. 2002; 40: 4499-4503.

Remington JS, Klein JO. Infections diseases of the fetus and newborn infant. 4^a ed. W B Saunders Company. 1995: 140-268.

Remington JS, McLeod R, Thulliez P, Desmonts G. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein J, eds. Infectious diseases of the fetus and newborn infant, 5th edn. Philadelphia: WB Saunders. 2001: 205-346.

Remington JS.; Thulliez P.; Montoya J.G. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. J Clin Microbiol. 2004; 42: 941-945.

Reiter-Owona I, Petersen E, Joynson D, Aspöck H, Darde ML, Disko R, et al. The past and present role of the Sabin-Feldman dye test in the serodiagnosis of toxoplasmosis. Bull World Health Organ. 1999; 77: 929-35.

Rey L. *Toxoplasma gondii* e Toxoplasmose. In: Parasitologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001; p.321-334.

Renold C, Sugar A, Chave JP, Perrin L, Delavelle J, Pizzolato G, et al. *Toxoplasma* encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Medicine. 1992; 71: 224-239.

Roberts F, McLeod R. Pathogenesis of toxoplasmic retinochoroiditis . Parasitol. Today. 1999; 15: 51-57.

Roth A, Roth B, Höffken G, Steuber S, Khalifa KI, Janitschke K. Application of the polymerase chain reaction in the diagnosis of pulmonary toxoplasmosis in immunocompromised patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1992; 11 : 1177-81.

Sacktor N. The epidemiology of human immunodeficiency virus-associated neurological disease in the era of highly antiretroviral therapy. J. Neurovirol. 2002; 8: 115-121.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press. 1989.

Santos CB, de Carvalho AC, Ragozo AM, Soares RM, Amaku M, Yai LE, Dubey JP, Gennari SM. First isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from finishing pigs from Sao Paulo State, Brazil. 2005; 131: 207-211.

Schoondermark-van de Ven E, Galama J, Kraaijeveld C, van Druten J, Meuwissen J, Melchers W. Value of the polymerase chain reaction for the detection of *Toxoplasma gondii* in cerebrospinal fluid from patients with AIDS. Clin Infect Dis. 1993; 16: 661-666.

Sibley LD, Boothroyd JC. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. Nature (London). 1992; 359:82-85.

Sibley LD, Mordue DG, Su C, Robben PM, Howe DK. Genetic approaches to studying virulence and pathogenesis in *Toxoplasma gondii*. Philosophical

transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences. 2002; 357: 81-88.

Silveira C, Belfort R, Burnier M, Nussennblatt R, Acquired toxoplasmic infection as the cause of toxoplasmic retino-chorioditis in families. Am J Ophthalmol 1988; 106: 362-364.

Soldati D, Meissner M. *Toxoplasma* as a novel system for motility. Curr Opin Cell. Biol. 2004; 16: 32-40. Review.

Splendore A. Um nuovo protozoa parassita dei conigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'una malattia Che ricorda in molti ponti il kala-azar dell'uomo. Ver. Soc. Sci. São Paulo. 1908; 3: 109-112.

Su C, Evans D, Cole RH, Kissinger JC, Ajioka Jw Sibley LD. Recent expansion of *Toxoplasma* though enhanced oral transmission. Science. 2003; 299: 414-416.

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

Suzuki Y. Immunopathogenesis of cerebral toxoplasmosis. J. Infect. Dis. 2002; 186: 234-240.

Takahashi EEH, Rossi CL. Use of three immunological techniques for the detection of *toxoplasma sp* IgA antibodies in acute toxoplasmosis. J. Cli.Path.1994;1101-1104.

Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. International Journal for Parasitology. 2000; 30:1217-1258.

Tibayrenc M e Ayala FJ. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. Trends in Parasitology. 2002; 18: 405-410.

UNAIDS – Joint United Nations Programme on HIV/AIDS disponível:
[URL:http://www.unAIDS.org/epi/2005/doc/EPIupdate2005_html_en/epi05_02_en.htm](http://www.unAIDS.org/epi/2005/doc/EPIupdate2005_html_en/epi05_02_en.htm).

Vallochi A, Muccioli C, Martins M, Silveira C, Belfort Jr R, Rizzo L. The genotype of strains causing ocular toxoplasmosis in humans in Brazil. Am. J. Ophthalmol. 2005; 139: 350-351.

Van de Ven E. Identification of *Toxoplasma gondii* infections by B1 gene amplification . J Clin Microbiol.1991; 29: 2110-2114.

Vidal JE, Penalva de Oliveira AC. Importance of *Toxoplasma gondii* antibody titres in patients with toxoplasmic encephalitis and AIDS. J Neurovirol. 2002; 8: 91.

Vidal JE, Penalva de Oliveira AC, Hernandez AV. Prognostic factors of clinical response in patients with toxoplasmic encephalitis and AIDS in the HAART era. J Neurovirol. 2003; 60:16-17.

Vidal JE, Colombo FA, Penalva de Oliveira AC, Focaccia R, Pereira-Chioccia VL. PCR assay using cerebrospinal fluid for diagnosis of cerebral toxoplasmosis in Brazilian AIDS patients. J. Clin. Microbiol. 2004; 42: 4765-4768.

Villard O, Filisetti D, Roch-Deris F, Garweg J, Flament J, Candolfi E. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, immunoblotting, and PCR for diagnosis of toxoplasmic chorioretinitis. J. Clin. Microbiol. 2003; 41: 3537-3541.

Villena I, Aubert D, Brodard V. Detection of specific immunoglobulin E during maternal, fetal, and congenital toxoplasmosis. J. Clin. Microbiol. 1999; 37: 3487-3490.

Zakimi S, Kyan H, Oshiro M, Sugimoto C, Xuenan X, Fujisaki K. Genetic characterization of GRA6 genes from *Toxoplasma gondii* from pigs in Okinawa, Japan. The Journal of Veterinary Medical Science. 2006; 68: 1105-1107.

8. Anexos

Anexo 1- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENAÇÃO DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
CEPIAL

São Paulo, 17 de janeiro de 2006 .

Ilmo(a) Sr(a).: **VERA LUCIA PEREIRA CHIOCCOLA**

Coordenador(a) do Projeto de Pesquisa: **GENOTIPAGEM DE ISOLADOS DE Toxoplasma gondii DE PACIENTES COM AIDS E TOXOPLASMOSE CEREBRAL E A CORRELAÇÃO COM A DOENÇA.**

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz (CEPIAL), em reunião ordinária do mês JANEIRO, apresentou o PARECER, enquadrando o referido projeto na categoria **APROVADO**, de acordo com a Resolução 196/96 sobre Pesquisas Envolvendo Seres Humanos / CNS / MS , Brasília, 1996.

Atenciosamente

Assinatura manuscrita em azul da Dra. Júlia Maria Martins de Souza Felipe.

Dra. Júlia Maria Martins de Souza Felipe
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Instituto Adolfo Lutz
CEPIAL

Anexo2 - Parecer do Conselho Técnico e Científico do Instituto Adolfo Lutz.



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
CTC / IAL



APROVAÇÃO DE PROJETOS DE PESQUISA

IAL/CCD/CEPIAL/CTC
PROJETO CCD- BM-Nº 47/05

Coordenadora: Vera Lucia P Chioccola

Projeto: Genotipagem de isolados de *Toxoplasma gondii* de pacientes com Aids e toxoplasmose cerebral e a correlação com a doença.
Senhora Coordenadora:

Comunicamos que o projeto supra citado foi cadastrado no Conselho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz, após aprovação na CCD/BM e CEPIAL.

Início: 2005

Término: 2007

Recebido no CTC/IAL e cadastrado em 03/03/2006

Myrna Sabino
Presidente do CTC/IAL

Via 1: Coordenador
Via 2: CCD/BM
Via 3: CTC

Anexo 3 - Ferreira IM, Vidal JE, Costa-Silva TA, Meira CS, Hiramoto RM, Penalva de Oliveira AC, Pereira-Chioccolla VL. *Toxoplasma gondii*: Genotyping of strains from Brazilian AIDS patients with cerebral toxoplasmosis by multilocus PCR-RFLP markers. *Exp Parasitol*. 2008; 118: 221-227

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)