

Isabelle Martins Ribeiro Ferreira

**GENOTIPAGEM DE CEPAS POLIMÓRFICAS DE
Toxoplasma gondii PROVENIENTES DE PACIENTES COM
TOXOPLASMOSE**

**Tese 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 Doutor em
Ciências.**

Área de Concentração:
Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Vera Lucia Pereira-Chioccola

SÃO PAULO

2012

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 cepas polimórficas de *Toxoplasma gondii*
provenientes de pacientes com toxoplasmose / Isabelle Martins Ribeiro
Ferreira, São Paulo, 2012.

Tese (doutorado) - 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-Chioccola

1. Toxoplasmose
2. Reação em cadeia de polimerase
3. Polimorfismo de fragmento de restrição
4. Genótipo

SES/CCD/CD-253/11

Dedico este trabalho

Ao meu pai Paulo de Tarso (in memoriam)

Pelo exemplo de vida.

Pelo caráter e dignidade.

Pelo incentivo, amor e paciência.

Pelos esforços em minha educação.

*Suas palavras foram essenciais para que eu alcançasse mais
essa etapa da minha vida.*

Minha eterna gratidão.

À minha mãe Maria da Graça

Pelos cuidados e dedicação

Pelo amor, carinho e confiança.

Pelo apoio e compreensão.

Pela alegria e o sorriso.

Obrigada por sempre estar ao meu lado.

Agradecimentos

À Deus por tudo.

Ao meu esposo Adílson, pelo amor, apoio e exemplo de determinação.

Aos meus filhos amados Gabrielle e Lucas, pelas alegrias e compreensão nos momentos difíceis.

À Prof^a Dr^a Vera Lucia Pereira Chioccola, a quem admiro pela competência de ensinar. Obrigada pela amizade, incentivo, e oportunidade em realizar este trabalho.

As minhas eternas amigas Thais e Cristina, por todos os momentos de convivência. Ser amigo é abrandar as tristezas, é estar presente, é torcer pelo sucesso. Obrigada meninas.

Ao meu grande amigo Fábio Colombo, caminhamos juntos e chegamos aqui. Obrigada por tudo.

Ao meu amigão Rafael Tonini Mesquita (garoto real time), por todos os momentos de convivência e aprendizado.

Ao meu amigo biólogo Fernando pela amizade e incentivo na etapa final desta tese.

Aos amigos do Instituto Adolfo Lutz, Gabi, Juliana, Carol, Jerffeson, Ricardo, Cida, Lázaro, Débora, Denise, Simone, Aparecida Helena, Margareth, Alexandre, Mari e Marilena pela agradável convivência e amizade.

A todos os professores, pesquisadores, e funcionários que contribuíram direta ou indiretamente na minha formação profissional.

Aos meus irmãos Paulo de Tarso, Daniele e Gisele, não é por acaso que somos uma família. O amor de vocês foi fundamental.

A todos os meus familiares, pela torcida.

Este trabalho teve apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - Processo nº 2008/09311-0.

Isabelle Martins Ribeiro Ferreira teve apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - Processo nº2009/05505-8.

"Se queremos progredir, não devemos repetir a história, mas fazer uma história nova." (Mahatma Gandhi)

RESUMO

Este estudo investigou as características genéticas de amostras de *Toxoplasma gondii* provenientes de 62 pacientes com toxoplasmose no estado de São Paulo, Brasil. Amostras de DNA foram isoladas de sangue, líquido cefalorraquidiano e líquido amniótico de 25 pacientes com toxoplasmose cerebral e AIDS, 2 pacientes com toxoplasmose aguda, 12 pacientes com toxoplasmose ocular, 6 recém-nascidos com toxoplasmose congênita e 17 mulheres grávidas com infecção aguda. O diagnóstico da toxoplasmose foi baseado em características clínicas, radiológicas e laboratoriais. A genotipagem foi realizada por multilocus PCR-RFLP incluindo os marcadores SAG1, SAG2 (5'- SAG2 e 3'-SAG2, alt.SAG2) SAG3, BTUB, GRA6, C22-8, C29-2, L358, PK1 e APICO. Entre as 62 amostras clínicas, 20 (32%) foram genotipadas com sucesso em 8 ou mais loci gênicos, e somente estas comparadas com exames clínicos e laboratoriais. As outras 42 amostras (68%) obtiveram resultado em até 7 loci gênicos. Dentre as 20 amostras, três genótipos foram identificados e comparados aos listados no ToxoDB. Dezoito (90%) amostras pertencem ao genótipo ToxoDB # 65 e as outras duas amostras foram identificadas com os genótipos ToxoDB # 6 e # 71, respectivamente (<http://toxodb.org/toxo/>). Os pacientes portadores de genótipos # 6 e # 71 tiveram toxoplasmose cerebral atípica e severa caracterizada por encefalite difusa sem lesões cerebrais expansivas. Estes resultados indicam que o genótipo # 65 de *T. gondii* podem ter uma alta frequência na toxoplasmose humana no Estado de São Paulo, Brasil. Este achado incomum destaca a necessidade de investigar a possível associação dos genótipos do parasita com toxoplasmose humana.

ABSTRACT

This study investigated the genetic characteristics of *Toxoplasma gondii* samples collected from 62 patients with toxoplasmosis in Sao Paulo State, Brazil. DNA samples were isolated from blood, cerebrospinal fluid and amniotic fluids of 25 patients with cerebral toxoplasmosis and AIDS, 2 patients with acute toxoplasmosis, 12 patients with ocular toxoplasmosis, 6 newborns with congenital toxoplasmosis and 17 pregnant women with acute infection. Diagnosis of toxoplasmosis was based in clinical, radiological and laboratory features. Genotyping was performed using multilocus PCR-RFLP genetic markers including SAG1, SAG2 (5'- SAG2 and 3'-SAG2, alt.SAG2) SAG3, BTUB, GRA6, C22-8, c29-2, L358, PK1 and Apico. Among the 62 clinical samples, 20 (32%) were successfully genotyped at 8 or more genetic loci, and only these compared with clinical and laboratory features. The other 42 (68%) had resulted in until 7 genetic loci. Among 20 samples, three genotypes were identified and compared to those listed in ToxoDB. Eighteen (90%) samples belonged to ToxoDB Genotype #65 and the other two samples were identified as ToxoDB Genotypes #6 and #71, respectively (<http://toxodb.org/toxo/>). Patients presenting Genotypes #6 and #71 had severe and atypical cerebral toxoplasmosis, characterized by diffuse encephalitis without extensive brain lesions. These results indicate that *T. gondii* Genotype #65 may have a high frequency in causing human toxoplasmosis in Sao Paulo State, Brazil. This unusual finding highlights the need to investigate the possible association of parasite genotypes with human toxoplasmosis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AIDS** - Síndrome da imunodeficiência adquirida
- BSA** – Albumina sérica bovina
- CD4** - Grupamento de diferenciação 4 ou “Cluster of Differentiation”
- cnPCR** - PCR convencional
- CDC** - “Centers for Disease Control”
- DNA** - Ácido desoxirribonucléico
- D.O.** - Densidade ótica
- dATP** - 2'- desoxiadenosina - 5'- trifosfato
- dCTP** - 2'- desoxicitosina - 5'- trifosfato
- dGTP** - 2'- desoxiguanosina - 5'- trifosfato
- dTTP** - 2'- desoxitimidina - 5'- trifosfato
- EDTA** - Ácido etilenodiamino tetra - acético
- ELISA** – “Enzyme-linked Immunosorbent Assay”
- g** - Aceleração da gravidade terrestre ($9,8\text{m/s}^2$)
- g** – grama(s)
- HAART** – Terapia antiretroviral de alta eficiência
- HIV** - Vírus da imunodeficiência humana
- IFI** - Imunofluorescência indireta
- IgG** - Imunoglobulina da classe G
- IgM** - Imunoglobulina da classe M
- Kb** - Kilobase
- LCR** - Líquido cefalorraquidiano
- LA**- Líquido amniótico
- MgCl₂** - Cloreto de magnésio
- M** - Molar
- Mb** – Megabase
- mM** - milimolar
- ml** – mililitro(s)

mg – miligrama(s)

PCR- Reação em cadeia da polimerase

pb - Pares de base

pH - concentração de hidrogênio iônico

qrtPCR - PCR Real time

RFLP- Polimorfismo de comprimento de fragmentos de DNA gerados por enzima de restrição

SNC - Sistema nervoso central

Taq - *Thermophilus aquaticus*

TBE - Tris/ Borato/ EDTA

Tris - HCl – Tris/ ácido clorídrico

UV – Ultravioleta

uM - Micromolar

ul – Microlitro

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1 - Marcadores moleculares com seus respectivos genes e localização utilizados na genotipagem de isolados de <i>T.gondii</i> de amostras clínicas humanas.....	50
Tabela 2 - Iniciadores utilizados no 1ºPCR (Multiplex) e 2ºPCR (Nested) e enzimas de restrição.....	56
Tabela 3 - Resultado clínico e laboratorial dos 20 pacientes genotipados.....	68
Tabela 4 - Genótipos de <i>T. gondii</i> determinados em 20 amostras clínicas humanas.....	69
Tabela 5. - Genotipagem de isolados de <i>T. gondii</i> de 42 amostras clínicas humanas.....	70
Figura 1 - Ilustração das estruturas e organelas de <i>T.gondii</i>	19
Figura 2 - Taquizoítos em líquido peritoneal de camundongo (A), cisto contendo bradizoítos encistados em músculo, coloração (B), Oocisto esporulado.....	19
Figura 3 - Vias de transmissão de <i>T. gondii</i>	22
Figura 4 - Mapa genômico de <i>T. gondii</i> constituído de 11 cromossomos.....	29
Figura 5 - Mapa genômico de <i>T. gondii</i> constituído de 14 cromossomos.....	30

Figura 6 - Localização dos genes SAG1 e SAG2 no cromossomo VIII de <i>T. gondii</i>	51
Figura 7- . Localização do gene SAG3 no cromossomo XII de <i>T. gondii</i>	51
Figura 8 -. Localização do gene GRA6 no cromossomo X de <i>T. gondii</i>	52
Figura 9 - Localização do gene BTUB no cromossomo IX de <i>T. gondii</i>	52
Figura 10 - Localização do gene C22-8 no cromossomo Ib de <i>T. gondii</i>	53
Figura 11 - Localização do gene C29-2 no cromossomo III de <i>T. gondii</i>	53
Figura 12 - Localização do gene L358 no cromossomo V de <i>T. gondii</i>	53
Figura 13 - Localização do gene PK1 no cromossomo VI de <i>T. gondii</i>	53
Figura 14 - Perfil de restrição enzimática de produto do gene SAG1 digerido com as enzimas <i>Sau96I</i> e <i>HaeII</i> que distigüe os genótipos I, II/III e u-1 de <i>T.gondii</i>	58
Figura 15 - Perfil de restrição enzimática de produto do gene SAG2 (5'-SAG2 e 3'- SAG2 digerido com as enzimas <i>MboI</i> e <i>HhaI</i> que distigüe os genótipos I, II e III de <i>T.gondii</i>	59

Figura 16 - Perfil de restrição enzimática de produto do gene SAG2 digerido com as enzimas <i>Hinfl</i> + <i>TaqI</i> que distigüe os genótipos I, II e III de <i>T.gondii</i>	60
Figura 17 - Perfil de restrição enzimática de produto do gene SAG3 digerido com a enzima <i>NciI</i> que distigüe os genótipos I, II e III de <i>T.gondii</i>	60
Figura 18 - Perfil de restrição enzimática de produto do gene GRA6 digerido com a enzima <i>MseI</i> que distigüe os genótipos I, II e III.....	61
Figura 19 - Perfil de restrição enzimática de produto do gene BTUB digerido com as enzimas <i>BsiEI</i> e <i>TaqI</i> que distigüe os genótipos I, II e III de <i>T.gondii</i>	61
Figura 20 - Perfil de restrição enzimática de produto do gene C22-8 digerido com as enzimas <i>BsmAI</i> + <i>MbolI</i> que distigüe os genótipos I, II, III e u-1 de <i>T.gondii</i>	62
Figura 21 - Perfil de restrição enzimática de produto do gene C29-2 digerido com as enzimas <i>HpyCH4IV</i> e <i>RsaI</i> que distigüe os genótipos I, II, III e u-1 de <i>T.gondii</i>	62
Figura 22 - Perfil de restrição enzimática de produto do gene L358 digerido com as enzimas <i>HaeIII</i> e <i>NlaIII</i> que distigüe os genótipos I, II, e III de <i>T.gondii</i>	63

Figura 23 - Perfil de restrição enzimática de produto do gene L358 digerido com as enzimas *AvaI* e *RsaI* que distigüe os genótipos I, II, III, u-1 e u-2 de *T.gondii*.....63

Figura 24 - Perfil de restrição enzimática de produto do gene L358 digerido com as enzimas *AfIII* e *DdeI* que distigüe os genótipos I, II e III de *T.gondii*.....64

Figura 25 - Amostra representativa de produto de PCR do gene B1 de *T. gondii* quando submetido a eletroforese em gel de agarose a 2%.....65

ÍNDICE

1.Introdução	17
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i>	17
1.1.1. Ciclo de Vida.....	20
1.1.2. Transmissão.....	21
1.2. Infecção em humanos.....	23
1.3. Caracterização Biológica de <i>T.gondii</i>	26
1.4. Características moleculares do <i>Toxoplasma gondii</i>	27
1.5. Métodos de tipagem.....	32
2. Objetivos	39
2.1. Objetivo geral.....	39
2.2. Objetivos específicos.....	39
3. Material e Métodos	40
3.1. Amostras clínicas.....	40
3.2. Diagnóstico da toxoplasmose (Clínico, sorológico e molecular).....	40
3.3. Coleta de amostras clínicas.....	41
3.4. Considerações éticas.....	41
3.5. Cepas de <i>T. gondii</i>	42
3.5.1.Obtenção das cepas RH, ME-49 e VEG.....	42
3.6. Diagnóstico Sorológico.....	43
3.6.1. Obtenção de antígenos para o diagnóstico sorológico.....	43
3.6.2.Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI) - IgM/ IgG.....	43

3.7. Diagnóstico molecular.....	44
3.7.1. Extração de DNA.....	44
3.7.1.1. Em amostras de sangue.....	44
3.7.1.2. Em LA.....	45
3.7.1.3. Em LCR.....	46
3.7.1.4. Em <i>T.gondii</i>	46
3.7.2. cnPCR.....	46
3.7.2.1. Eletroforese em gel de agarose.....	47
3.7.3. qrtPCR.....	48
3.8. Genotipagem - PCR-RFLP	49
3.8.1. Escolha dos marcadores moleculares.....	49
3.8.2. Validação da PCR-RFLP.....	54
3.8.2.1. 1º PCR (Multiplex).....	54
3.8.2.2. 2ºPCR ou Nested-PCR.....	54
3.8.2.3. RFLP.....	55
3.8.3. Isolados de <i>T. gondii</i> dos pacientes.....	57
3.8.4. Análise dos dados.....	57
4. Resultados.....	58
4.1. Validação das reações de genotipagem.....	58
4.2. Caracterização genotípica das amostras clínicas.....	65
5. Discussão.....	71
6. Conclusões.....	75
7. Referências Bibliográficas.....	76
8. Anexos.....	94

8.1. Anexo 1 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.....	94
8.2. Anexo 2 - Ferreira IM, Vidal JE, de Mattos C de C, de Mattos LC, Qu D, Su C, Pereira-Chiocola VL. <i>Toxoplasma gondii</i> isolates: Multilocus RFLP-PCR genotyping from human patients in Sao Paulo State, Brazil identified distinct genotypes. Exp Parasitol. 2011; 129:190-5.....	95

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii foi descrito por Alfonso Splendore no Brasil em 1908, parasitando coelhos no laboratório da Faculdade de Medicina de São Paulo. Simultaneamente por Nicolle e Manceaux no Instituto Pasteur da Tunísia, em células mononucleares de fígado e baço de roedores africanos (*Ctenodactylus gundi*) (apud Neves, 1994; apud Dubey, 2008).

Janku um oftalmologista descreveu o primeiro caso reconhecido em humanos em 1923 na cidade de Praga, onde evidenciou a presença de parasitas na retina de uma criança com 11 meses de idade com hidrocefalia e coriorretinite. Wolf e Cowan em 1937 relataram casos de toxoplasmose em lactentes jovens, confirmando a ocorrência da passagem transplacentária por meio da inoculação de fragmentos da placenta em camundongos de laboratório e obtendo o isolamento do parasita (apud Dubey, 2008).

Sabin e Feldman em 1948 criaram o “*dye test*,” permitindo o estudo de aspectos clínicos e epidemiológicos da doença. Demonstraram que *T. gondii* é a causa de uma infecção em seres humanos altamente disseminada (apud Remington et al., 2005).

Quanto à taxonomia o parasito pertence ao Reino Protista, Subreino Protozoa, Filo Apicomplexa, Classe Sporozoa, Subclasse Coccidia, Ordem Eucoccidia, Subordem Eimeriina, Família Sarcocystidae, Subfamília Toxoplasmatinae (Levine 1977; Levine 1980), Gênero *Toxoplasma* e Espécie *Toxoplasma gondii* (Nicolle e Manceaux, 1909).

Toxoplasma gondii é caracterizado pela presença do complexo apical composto de organelas secretórias especializadas como: roptrias, micronemas e grânulos densos; e de elementos do citoesqueleto, dentre eles o conóide, anéis polares e microtúbulos subpeliculares (Soldati e Meissner, 2004). Outra estrutura típica do parasito é uma organela denominada apicoplasto envolta por quatro

membranas e localizada na região anterior ao núcleo (Figura 1). Embora esta organela tenha sido identificada morfológicamente desde a década de 1960, apenas recentemente descobriu-se tratar-se de um plastídeo (Köhler et al., 1997; De Rocher et al., 2000).

As três formas infectantes do parasita são: taquizoítos (trofozoítos), cistos contendo bradizoítos e oocistos contendo esporozoítos (Dubey, 1998).

Os taquizoítos (Figura 2A) são formas de replicação rápida encontradas na fase aguda de infecção, são disseminados na corrente sanguínea infectando vários tecidos como: olhos, músculos, coração, placenta e o sistema nervoso central (SNC). Possuem a forma oval ou crescente, medem cerca de 2 x 4 µm de largura e 4 x 8 µm de comprimento (Dubey, 1991; Dubey, 1998; Montoya e Liesenfeld, 2004; Hill et al., 2005).

Os cistos (Figura 2B) variam no tamanho de 5 a 100 µm. São resistentes às condições ambientais podendo durar por toda a vida do hospedeiro infectado. Contêm centenas ou milhares de bradizoítos que são formas de replicação mais lenta encontrados na fase crônica de infecção. Morfológicamente são idênticos aos taquizoítos, sendo mais delgados e menos susceptíveis a ação de enzimas proteolíticas. O núcleo dos bradizoítos situa-se na extremidade posterior, enquanto que nos taquizoítos está na posição central (Dubey, 1998; Montoya e Liesenfeld, 2004; Hill et al., 2005).

Os oocistos (Figura 2C) medem cerca de 10x12 µm. São as formas infectantes provenientes do ciclo sexuado em felídeos. São liberados para o meio ambiente pelas fezes durante a infecção aguda por cerca de 7 a 10 dias, podendo esporular em até 21 dias. Cada oocisto forma no seu interior dois esporocistos. Cada um com quatro esporozoítos (Dubey, 1998; Hill e Dubey, 2002; Montoya e Liensefield, 2004).

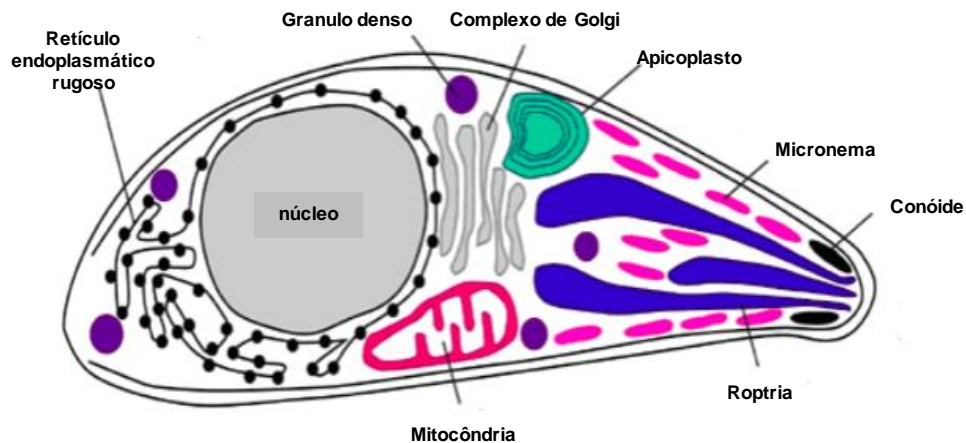


Figura 1: Ilustração das estruturas e organelas de *T. gondii*. Adaptado de Ajioka et al (2001).

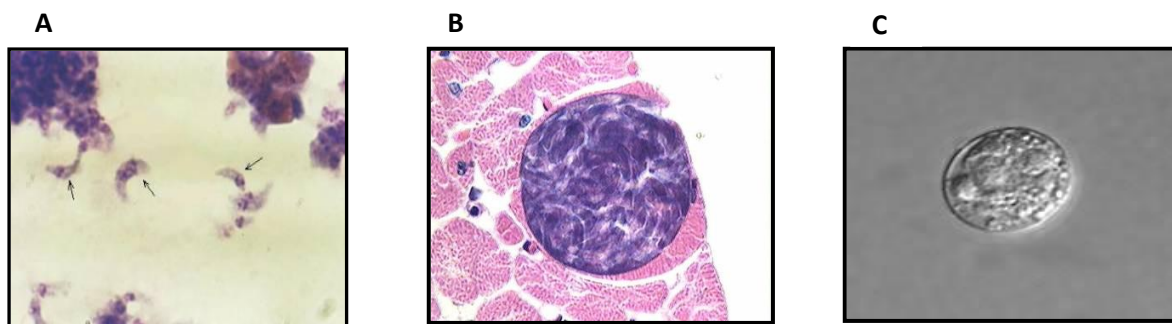


Figura 2: (A) Taquizoítos (setas) em líquido peritoneal de camundongo, coloração de Giemsa 1000x <http://www.ufras.br/para-ite/siteantiao/Imagensatlas/Protozoa/Imagens/bradi3.jpg>. (B) Cisto contendo bradizoítos encistados em músculo, coloração Giemsa 1000x <http://www.ufras.br/para-ite/siteantiao/Imagensatlas/Protozoa/Imagens/bradi3.jpg>. (C) Oocisto esporulado em contraste diferencial de interferência 100x [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/5d/T._gondii_unsporulated_oocyst,_differential_interference_contrast_\(DIC\),_100x..jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/5d/T._gondii_unsporulated_oocyst,_differential_interference_contrast_(DIC),_100x..jpg).

1.1.1. Ciclo de Vida

O ciclo heteroxênico de *T. gondii* (Figura 3) foi descrito em 1970. Os felídeos, incluindo o gato doméstico, foram definidos como hospedeiros definitivos, outros mamíferos e aves como hospedeiros intermediários (Frenkel et al, 1970).

Nos hospedeiros intermediários ocorre apenas a reprodução assexuada do parasita, enquanto nos hospedeiros definitivos ocorrem as reproduções sexuada e assexuada. Os hospedeiros definitivos são considerados a principal fonte de contaminação da doença, uma vez que a formação de oocistos ocorre com grande facilidade. São eliminados milhares de oocistos após a ingestão de apenas um cisto ou bradizoíto. A transmissão é assegurada pela enorme quantidade de oocistos eliminados nas fezes de felídeos para o meio ambiente apesar do período curto, em torno uma a duas semanas (Hill e Dubey, 2002).

Os hospedeiros intermediários se infectam quer seja pela ingestão de oocistos esporulados, ou pelo carnivorismo ingerindo cistos com bradizoítos (Dubey, 1996; Hill e Dubey, 2002; Montoya e Liesenfield, 2004). Quando ingerem os oocistos ocorre a liberação de esporozoítos que invadem as células epiteliais. Diferenciam-se em taquizoítos que se disseminam pela corrente sanguínea, invadindo células nucleadas. Caracteriza-se, então, a fase aguda da infecção, na qual ocorrem as manifestações clínicas da doença. Os taquizoítos, então, se diferenciam em bradizoítos envolvidos por parede rica em carboidratos dentro de um vacúolo parasitário. Dividem-se mais lentamente formando os cistos em diversas células, principalmente no cérebro, coração e músculos podendo permanecer no local indefinidamente (Dubey e Frenkel, 1972; Kim e Weiss, 2008). Em casos de comprometimento do sistema imunológico, principalmente em pacientes com HIV, os cistos latentes podem reativar transformando-se em taquizoítos provocando a reativação da doença (Dubey, 1996; Dubey, 1998; Suzuki, 2002; Kim e Weiss, 2008).

Nos hospedeiros definitivos (felídeos), após a ingestão dos oocistos, estes são desintegrados no estômago e intestino delgado por enzimas proteolíticas. Então, os bradizoítos são liberados e penetram no epitélio intestinal.

Assim inicia-se o desenvolvimento de múltiplas gerações de ciclos sexuais e assexuais de *T.gondii* (Dubey e Frenkel, 1972). Os parasitas se multiplicam 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 sexuado (Hill et al., 2005).

Os oocistos imaturos são liberados pelos felídeos para o meio ambiente. Estes por sua vez esporulam no meio ambiente entre 1 e 21 dias, formando no seu interior dois esporocistos cada um com quatro esporozoítas. Sobrevivem por meses ou até anos desde que não sejam expostos a luz solar direta e umidade relativa do ar muito baixa (Hill e Dubey, 2002; Montoya e Liensefield, 2004).

1.1.2. Transmissão

A transmissão do parasita ocorre pela ingestão de água e alimentos contaminados com oocistos, ou pela ingestão de carne crua ou pouco cozidas contendo cistos (Hill e Dubey, 2002; Hill et al, 2005, Kim e Weiss, 2008). A transmissão pode ocorrer também por via transplacentária, quando mulheres se infectam durante a gravidez; pela amamentação durante a fase aguda da infecção; por transplante de órgãos e por transfusão sanguínea e de seus derivados (Figura 3) (Hill et al, 2005).

A água é considerada uma importante via de disseminação da toxoplasmose. Vários surtos foram relatados tendo estadia de transmissão. No norte do estado do Rio de Janeiro, águas de poços, lagos e riachos consumidas pela população foram incriminadas como fonte de infecção (Bahia-Oliveira, 2003). Na cidade de São Carlos, estado de São Paulo, 113 indivíduos apresentaram sintomas da doença com possível transmissão pela água, visto que 200 gatos habitavam o local no qual ocorreu a infecção humana (Gattás et al., 2000). Em Santa Isabel do Ivaí, estado do Paraná, de um total de 2884 foram detectados

anticorpos IgG anti-*T. gondii* em 1255 e anticorpos IgM e IgG em mais 426 indivíduos. Este surto foi relacionado à ingestão de água de um dos reservatórios da cidade (De Moura et al., 2006).

Surtos relacionados à ingestão de carne mal cozida também foram relatados no país (Coutinho et al., 1982). A região de Erechim no Rio Grande do Sul, o manuseio de carne crua para confecção de linguiça e similares foi 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 toxoplasmose nesse local (Araújo et al., 2000).

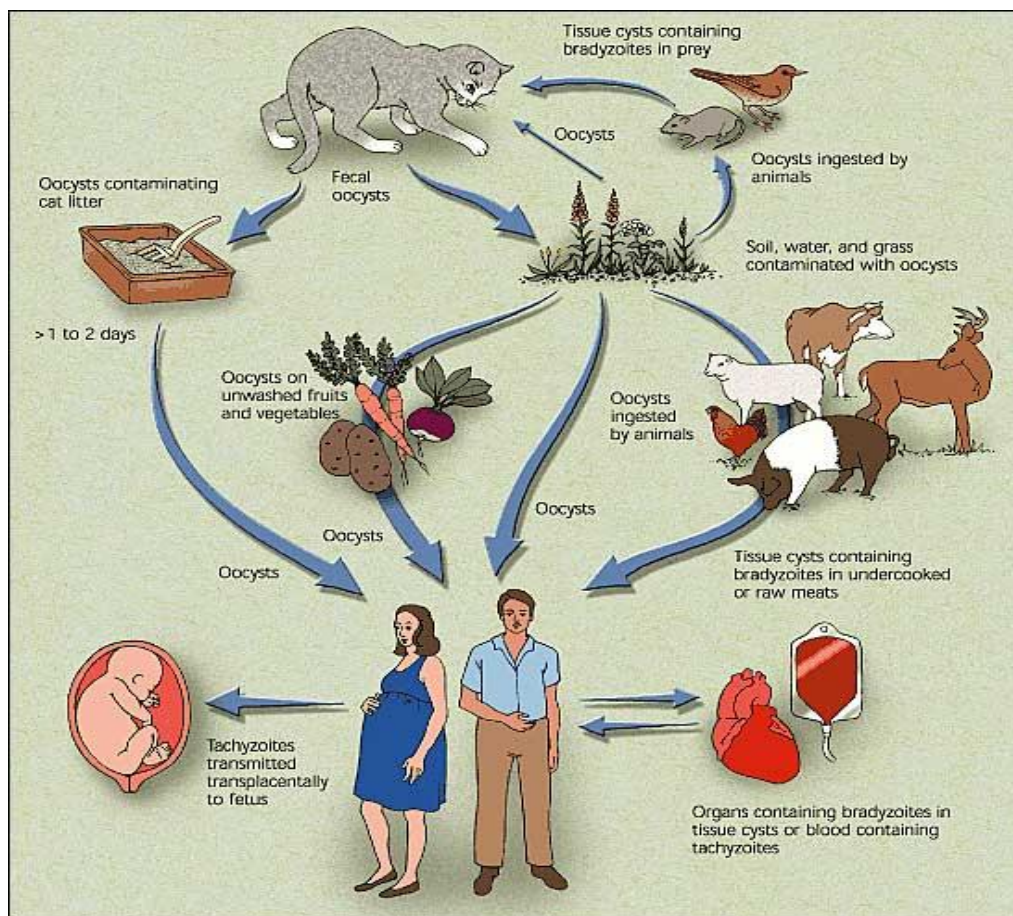


Figura 3: Vias de transmissão de *T. gondii*

Fonte: <http://2.bp.blogspot.com/>

1.2. Infecção em humanos

A toxoplasmose é uma zoonose com ampla distribuição mundial. Apresenta taxas de prevalência que variam em diversas regiões do mundo em função de fatores geográficos, sociais, hábitos da população e clima (Dubey e Beattie, 1988; Remington et al., 1995; Remington et al., 2001; Remington et al., 2005).

A infecção afeta ao redor de dois bilhões de pessoas no mundo (Tenter et al., 2000; Montoya e Liesenfeld, 2004). É assintomática em 80 a 90% dos indivíduos imunocompetentes apresentando evolução benigna. A linfadenopatia é a manifestação mais comum em 10 a 20% destes indivíduos podendo ser acompanhada de febre, astenia e mialgia. (Montoya e Liesenfeld, 2004; Remington, 2004).

Em pacientes imunocomprometidos tais como aqueles com deficiência da imunidade celular como portadores do vírus HIV, transplantados ou portadores de doenças linfoproliferativas, a toxoplasmose pode ser grave ou até mesmo fatal. A reativação dos cistos latentes presentes na fase crônica ocorre em 95% dos casos. Normalmente afeta o sistema nervoso central (SNC) causando a encefalite toxoplásmica, que é a mais importante manifestação da doença (Luft e Remington, 1992; Ferreira, 2000; Liesenfeld et al, 1999; Pereira-Chioccola et al, 2009). 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). Estes sintomas podem ser confundidos com 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 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; presença de anticorpos IgG anti-*T. gondii* e 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 et al, 2003).

A toxoplasmose cerebral é a segunda infecção oportunista mais comum relacionada à AIDS seguida apenas da pneumocistose, causada por fungos da espécie *Pneumocystis jirovecii*, e a primeira causa mais comum de doença no SNC nestes pacientes (Luft e Remington, 1992; Vidal et al, 2005).

Outro grupo gravemente atingido são de mulheres grávidas infectadas pela primeira vez durante a gestação. A toxoplasmose congênita pode causar lesões irreversíveis ao feto, ocorrendo quando a mulher adquire a infecção primária durante a gravidez (Hohlfeld et al., 1994; Remington, 1995; Remington et al., 2005). A frequência e a gravidade da doença dependem da idade gestacional. Infecção materna no primeiro trimestre de gestação pode causar toxoplasmose congênita grave resultando em morte do feto no útero ou aborto espontâneo. Os casos mais graves podem ocasionar a Tétrade de Sabin, em que o feto apresenta coriorretinite em 90% dos casos; calcificações cerebrais em 69%; perturbações neurológicas com retardamento psicomotor em 60% e alterações no volume craniano (macro e microcefalia) em 50% (Kawazoe, 1995; Remington et al., 2001). Em contraste, infecção materna tardia (terceiro trimestre) usualmente resulta em recém-nascidos aparentemente normais, ou podendo apresentar alguns sintomas como hepatoesplenomegalia, icterícia, danos oculares e neurológicos. A frequência absoluta de infecções subclínicas em recém nascidos com toxoplasmose congênita é de 85%. As infecções que passam despercebidas ou, se não tratadas, causam doença ocular grave (coriorretinite) ou atraso no desenvolvimento mental na segunda ou terceira década de vida da criança (Hohlfeld et al., 1994; Remington et al., 2001; Gilbert, 2004). Em países desenvolvidos, a doença afeta de 1 a 10 entre 10.000 recém-nascidos (Gilbert e Peckham, 2001). No Brasil, a ocorrência de toxoplasmose congênita varia de 0,2 a 2% (Neto et al., 2000).

Em gestantes, pacientes que iniciam o pré-natal com presença de anticorpos IgG anti - *T. gondii* e ausência de anticorpos IgM anti - *T. gondii* são consideradas imunes e sem riscos de toxoplasmose congênita. A exceção é para as pacientes HIV positivas ou com outra imunossupressão que podem ter reativação da doença (Remington et al., 2001; Gilbert, 2004). Em pacientes que apresentem sorologia positiva, isto é, presença de anticorpos IgG e IgM anti - *T. gondii*, é realizado o teste de avidéz que foi desenvolvido para determinar se a infecção foi adquirida no passado distante ou recentemente. Os resultados são baseados na medida da avidéz ou afinidade funcional dos anticorpos da classe IgG específicos para o *T. gondii*. Anticorpos de baixa avidéz (30% ou menos) são produzidos em estágio precoce da infecção, enquanto que anticorpos de alta avidéz (60% ou mais) refletem infecção crônica e excluem infecções primárias com menos de 4 meses de duração. Valores entre 30% e 60% não permitem a caracterização da fase da doença. Baixa avidéz de anticorpos IgG muitas vezes não significa que a gestante tenha adquirido a infecção recentemente, pois resultados com baixa avidéz podem persistir por até um ano. Assim, nestes casos, o teste da avidéz não deve ser utilizado isoladamente como um teste de diagnóstico definitivo, sendo recomendado o seu uso em associação com outros testes laboratoriais, como a técnica da PCR em líquido amniótico e sangue permitindo a identificação dos fetos infectados, possibilitando que a terapia antiparasitária inicie precocemente, ainda na gestação (Jenun et al., 1998; Bou et al., 1999; Liesenfield et al., 2001; Remington et al., 2004).

O diagnóstico da toxoplasmose congênita no recém-nascido é feito pela demonstração da presença de anticorpos IgM ou IgA contra o *T. gondii*. O diagnóstico não pode ser feito apenas pela demonstração de anticorpos IgG, já que estes são transferidos passivamente da mãe para o feto. Entretanto, deve-se ter cautela na interpretação dos resultados de IgM e IgA no recém-nascido, pois a transmissão de IgM e/ou IgA materna pode ocorrer durante o nascimento. Devido a meia vida curta destes anticorpos (IgM e IgA), os testes positivos devem ser confirmados e repetidos do segundo ao quarto dia de vida (IgM) e no décimo dia de vida (IgA) (Remington et al., 2004). A ultrassonografia tem importância

fundamental no acompanhamento e na avaliação do prognóstico dos fetos portadores de toxoplasmose, pois permite identificar aqueles sem sinais de infecção congênita (Couto e Leite., 2004).

A infecção ocular, como mencionado anteriormente, pode fazer parte do quadro de uma infecção congênita ou ocorrer em infecção adquirida pós-natal tanto em casos de infecção aguda ou de reativação da doença (Boothroyd e Grigg, 2002). A manifestação ocular mais comum é a retinocoroidite granulomatosa necrotizante, sendo a lesão de coloração branco-amarelada e com margens mal definidas. Podem ser encontradas lesões satélites a outras cicatrizes antigas de aspecto hiperpigmentado e atróficas característicos da toxoplasmose ocular (Glasner et al., 1992; Montoya e Remington,1996). Os sintomas incluem diminuição da visão, inflamação, necrose retiniana e opacidades no campo visual, hiperemia conjutival e ciliar, dor e fotofobia. Recidivas da doença ocorrem em função da ruptura dos cistos e liberação dos bradizoítos (Amato Neto et al., 1995). Em pacientes imunocompetentes, a infecção ocular é responsável por 30% a 50% (Villard et al., 2003).

1.3. Caracterização Biológica de *T.gondii*

As cepas de *T. gondii* foram definidas, baseando-se na virulência em camundongos infectados da linhagem “Swiss”, em três tipos (Dubey e Frenkel, 1976; Dubey et al, 1998; Literák et al., 1998; Grigg et al, 2001a; Sibley, 2003).

Cepas do tipo I são altamente patogênicas, com elevado nível de parasitemia provocando a morte em camundongos com formação de ascite contendo taquizoítos em um tempo médio de 5 a 10 dias (Sibley e Boothroyd,1992; Ajioka et al., 2001). A cepa tipo I mais conhecida é a RH que foi isolada em 1939, sob a forma de cisto do cérebro de um recém-nascido com toxoplasmose congênita que apresentava lesões cerebrais. Esta cepa até então foi considerada pouco patogênica. Após sucessivas passagens em culturas de células, os parasitas perderam a capacidade de formar cistos. Em camundongos verificou-se a transformação em uma cepa altamente patogênica ocasionando a

morte dos animais com a presença de inúmeros taquizoítos na cavidade abdominal. Desde então, passou a ser utilizada como cepa referência do tipo I (Sibley e Boothroyd,1992; Grigg et al, 2001b; Grigg et al, 2001c; Ajioka et al., 2001; Ajzenberg et al, 2005).

Cepas do tipo II são menos patogênicas e induzem infecção crônica produzindo cistos teciduais nos animais (Sibley e Boothroyd,1992; Ajioka et al., 2001).

Cepas do tipo III possuem patogenicidade intermediária. Induzem discreta ascite em camundongos com pouquíssimos taquizoítos e poucos cistos no cérebro (Sibley e Boothroyd,1992; Ajioka et al., 2001).

A cepa RH e aquelas cepas que são geneticamente similares a ela exibem uma dose letal de 100% (LD100) de um único parasita viável. Cepas pouco virulentas exibem uma dose letal (LD50) maior ou igual a 1000 parasitas e facilmente estabelecem infecções crônicas em camundongos (Howe et al., 1996). As cepas com virulência intermediária podem ser cepas em transição entre os fenótipos virulentos e não virulentos (Literák et al, 1998).

A correspondência entre a virulência e o padrão molecular da amostra não é necessariamente observada em todos os hospedeiros (Grigg e Suzuki, 2003).

1.4. Características moleculares de *Toxoplasma gondii*

T. gondii apresenta um genoma nuclear estável possuindo aproximadamente 87 Mb. É complementado por um DNA circular extracromossomal de 35Kb no interior de uma organela denominada apicoplasto (plastídeo) e um genoma mitocondrial de 6Kb (Ajioka et al., 2001).

O genoma do plastídeo de *T. gondii* foi sequenciado em 1997 (GenBank accession U87145), demonstrou ser similar tanto em organização quanto em conteúdo gênico ao encontrado em *P. falciparum* e em outras espécies do filo Apicomplexa (Feagin e Parsons, 2007). No entanto, a localização subcelular desse genoma ainda permanecia desconhecida, até que estudos de hibridização *in situ* usando sondas em *T. gondii* mostraram que o genoma de 35kb

residia em uma organela localizada na região apical ao núcleo, denominada apicoplasto (McFadden et al, 1996; Köhler et al., 1997).

O genoma nuclear é haplóide contendo 8×10^7 pares de base, para a maioria dos estágios do ciclo de vida do parasita, exceto durante a divisão sexual que ocorre no intestino dos felídeos (Pfefferkorn e Pfefferkorn, 1980, Montoya e Liesenfeld, 2004).

Sibley e Boothroyd (1992) construíram um mapa genômico constituído de 11 cromossomos, através de recombinações entre as cepas tipo II (ME-49) e cepas do tipo III (CEP) (Figura 4).

Posteriormente, Khan et al. (2005a) através de recombinações de cepas dos tipos II e III e cepas dos tipos I e III, 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 1,8 Mb a > 10 Mb (Figura 5).

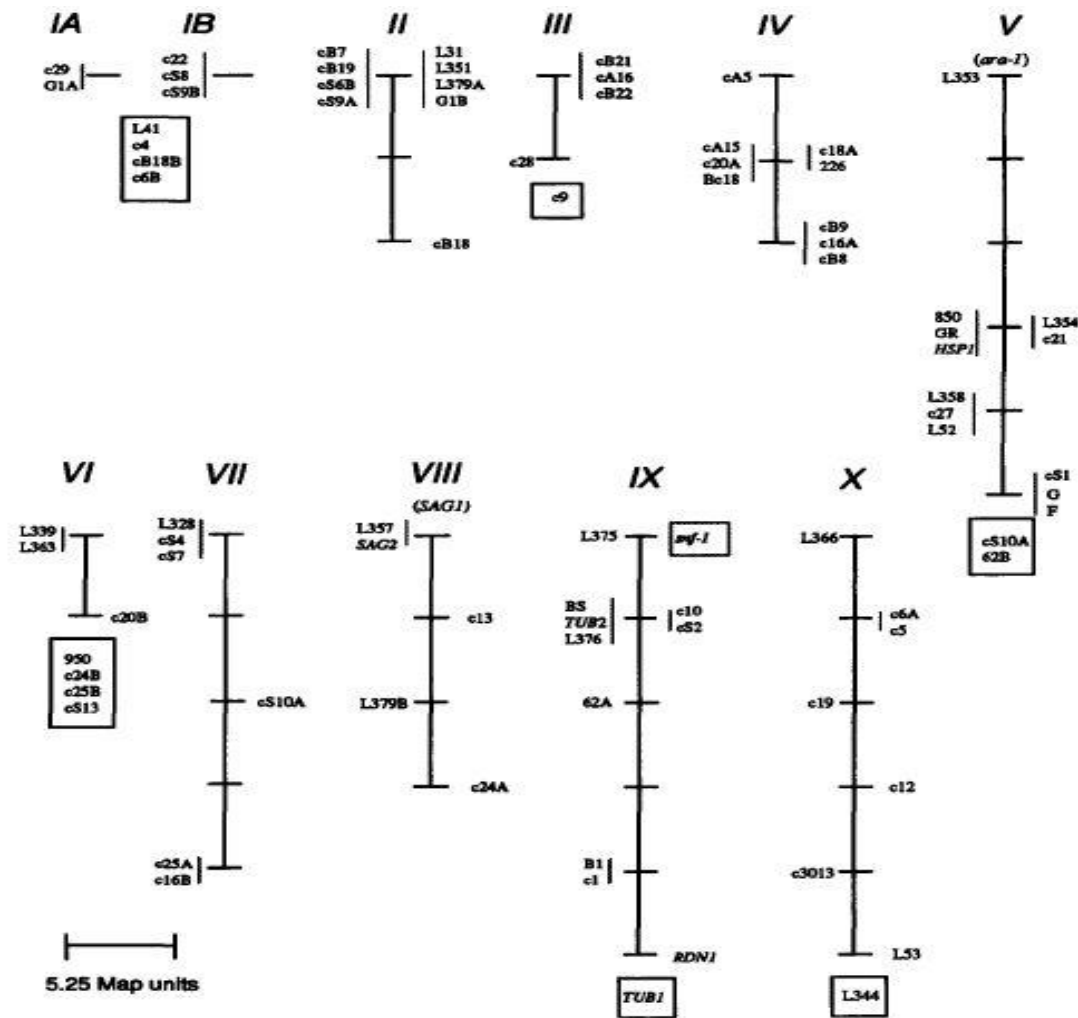


Figura 4: Mapa genômico de *T. gondii* constituído de 11 cromossomos (Sibley et al., 1992).

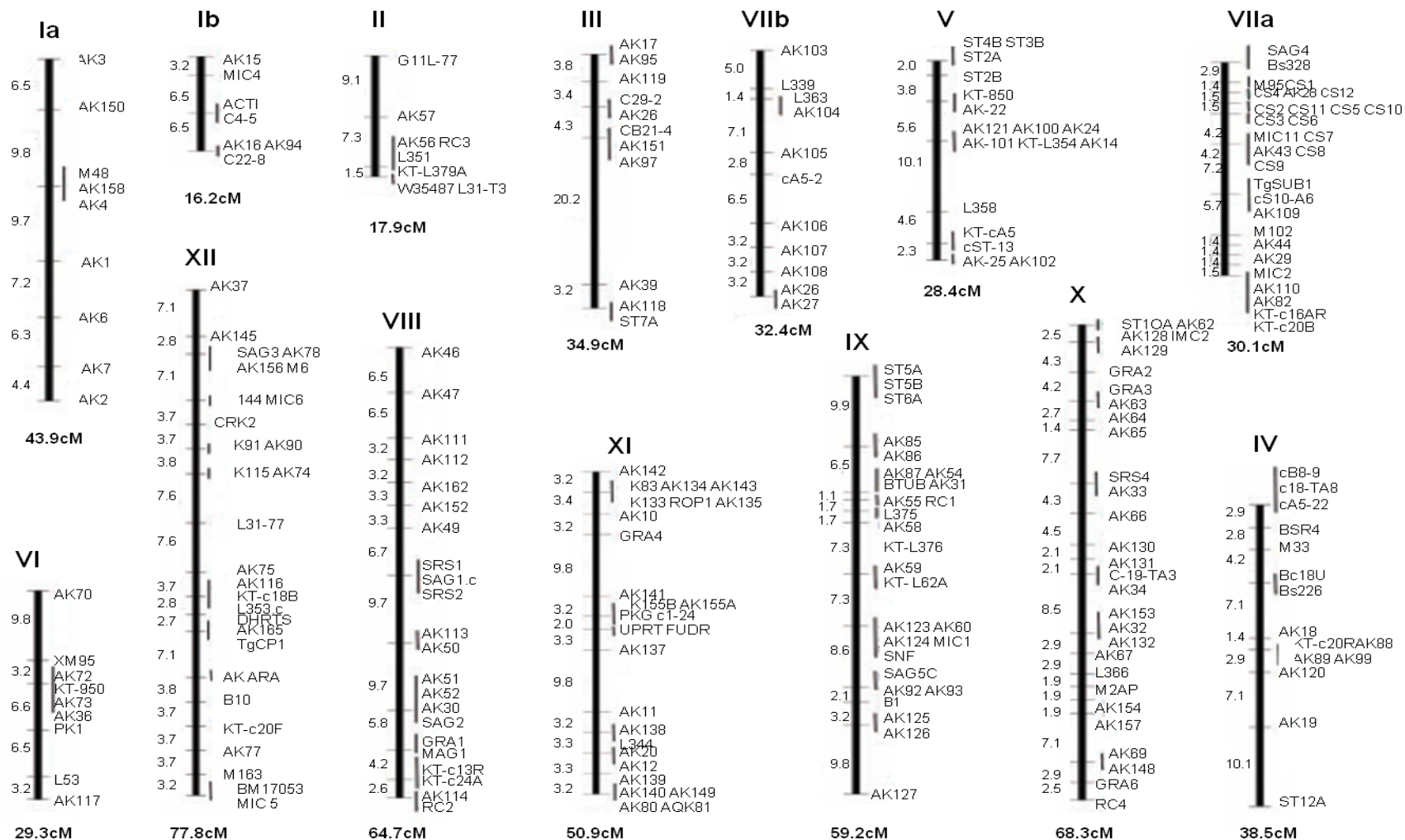


Figura 5: Mapa genômico de *T. gondii* constituído de 14 cromossomos. Adaptado de Khan et al. (2005a).

Os genótipos *T.gondii* baseados nos estudos de polimorfismo genético são formados pela combinação de duas classes de alélicas designadas “A” e “E”. Um 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 foram 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). Os três tipos genéticos surgiram de uma origem comum, passando por troca genética limitada sendo altamente similares com diferenças inferiores a 1% em suas sequências de DNA (Grigg et al., 2001a; Su et al., 2003).

A estrutura clonal das cepas de *T. gondii* pode ser explicada pela capacidade de transmissão do parasita entre hospedeiros intermediários de hábitos carnívoros e saprofágicos, sem passar pelo hospedeiro definitivo e sofrer meiose e recombinação sexual (Su et al., 2003). Pode ocorrer também por macrogametas do parasita que permanecem infertilizados, porém são capazes de formar oocistos por partenogênese no intestino dos felídeos (Ferguson, 2002). Outra possibilidade é a raridade de infecção simultânea no gato com diferentes cepas. A recombinação ocorreria se felídeos fossem infectados simultaneamente com diferentes amostras de *T. gondii*. Contudo é 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. Este evento teria que ocorrer em um intervalo de tempo bem curto. O fato de *T.gondii* ser haplóide contribui para a estrutura clonal, pois o hospedeiro definitivo infectado com apenas um tipo de cepa, produz oocistos contendo progênies geneticamente idênticas à amostra infectante original (Ajzenberg et al., 2004).

A diversidade genética das cepas de *T. gondii* tem sido um importante objeto de estudo. Durante as últimas décadas os métodos moleculares têm facilitado a detecção, diagnóstico e genotipagem deste importante patógeno (Dubey, 2008). Os estudos iniciais mostraram que *T.gondii* apresentava as três linhagens clonais I, II e III (Howe e Sibley, 1995; Sibley e Boothroyd, 1992; Owen e

Trees, 1999; Ajzenberg et al., 2002; Dubey et al., 2002; Dubey et al., 2003a; Dubey et al., 2003b; Dubey et al., 2004a; Dubey et al., 2004b; Vallochi et al., 2005; Lindstron et al., 2006; Peyron et al; 2006; Zakimi et al., 2006; Dubey et al., 2006). Na América do Sul com uma predominância de cepas dos tipos I e III (Dardé, 2004; Khan et al., 2006; Lehmann et al., 2006), enquanto que na Europa e América do Norte a predominância cepas do tipo II (Howe e Sibley, 1995; Dardé, 1996; Owen e Trees, 1999; Ajzenberg et al., 2002; Ajzenberg et al., 2004; Lindstron et al., 2006; Peyron et al; 2006; Zakimi et al., 2006).

Posteriormente outros estudos evidenciaram linhagens divergentes dos tipos arquétipos, assim como linhagens recombinantes ou atípicas (Grigg et al., 2001b; Khan et al., 2005b; Khan et al., 2006; Ferreira et al., 2006; Su et al., 2006; Belfort-Neto et al., 2007; Dubey et al., 2007, Ferreira et al., 2008).

1.5. Métodos de tipagem

Os primeiros relatos da existência de linhagens bem definidas dentre os isolados de *T.gondii* foram demonstradas inicialmente pelos perfis eletroforéticos de isoenzimas (Dardé et al., 1987; Dardé et al., 1992; Dardé et al., 1998).

Atualmente métodos de tipagem utilizando multilocus RFLP-PCR, microsátélites e sorotipagem são utilizados para estudar a diversidade genotípica entre amostras de *T. gondii* (Dardé, 2004; Ajzenberg et al., 2004; Lehmann et al., 2004; Khan et al., 2007; Su et al., 2010; Sousa et al., 2010; Vaudaux et al., 2010).

Com os métodos moleculares é possível estudar a variação de virulência das diferentes linhagens do parasita, para revelar o potencial de correlação entre o genótipo do parasita e os padrões de doença em pacientes infectados e para o estudo da epidemiologia, bem como a biologia populacional de *T. gondii* (Dubey et al., 2008; Pereira- Chioccola et al., 2009).

O estudo da diversidade genética de um parasito visa uma melhor compreensão de sua evolução, fornecendo subsídios para avaliação de características biológicas tais como a virulência, atividade imunológica e resistência às drogas, podendo também esclarecer as diferentes manifestações da

doença na população humana para que ocorram melhorias no diagnóstico e tratamento (Tibayrenc, 1995; Tibayrenc, 1996).

A PCR-RFLP é um método de tipificação baseado no polimorfismo de comprimento de fragmentos de DNA gerados por enzimas de restrição sobre produtos amplificados pela PCR. As enzimas de restrição reconhecem uma sequência específica de quatro a oito bases e são classificadas de acordo com a estrutura, atividades e sítios de reconhecimento e clivagem de DNA. O método consiste em clivar o DNA em pontos específicos resultando fragmentos de massas moleculares diferentes, sendo assim possível diferenciar os tipos de cepas (Howe e Sibley, 1995; Howe et al., 1997; Khan et al., 2005a).

As investigações das características genóticas em animais também são de extrema importância para um melhor entendimento da epidemiologia, identificando as fontes de infecção ou vias de transmissão, visto o potencial zoonótico da toxoplasmose (Owen e Tree, 1999).

Historicamente, na América do Norte, Ásia e África, a maioria dos isolados pertencem aos tipos clonais I, II e III, com predominância de cepas do tipo II. As análises foram feitas em pacientes com infecções congênitas, com toxoplasmose/AIDS e animais domésticos (Howe e Sibley, 1995; Dardé, 1987; Dardé, 1996; Sibley e Boothroyd, 1992; Owen e Trees, 1999; Ajzenberg et al., 2002; Lehmann et al., 2004; Lindstron et al., 2006; Peyron et al; 2006; Zakimi et al., 2006). Na América do Sul, os estudos mostraram uma predominância de cepas I e III. Em pacientes com toxoplasmose/AIDS e toxoplasmose ocular havia predominância de cepas do tipo I (Howe e Sibley, 1995; Howe et al., 1997; Ajzenberg et al., 2002; Boothroyd e Grigg, 2002; Vallochi et al., 2005; Khan et al, 2006; Gallego et al., 2006; Nowakowska et al., 2006; Ferreira et al; 2008).

Os primeiros estudos eram limitados na identificação de isolados distintos, uma vez que poucos marcadores eram utilizados (Khan et al., 2007; Pereira-Chiocola et al., 2009). Os estudos por PCR-RFLP eram realizados analisando-se apenas um *locus*, o gene SAG2 localizado no cromossomo VIII. Este gene codifica a proteína p22 que é expressa tanto por taquizoítos quanto por bradizoítos (Howe

et al., 1997; Owen e Tree, 1999; Lekutis et al., 2000; Dubey et al., 2002; Dubey et al., 2003a; Dubey et al., 2003b; Khan et al., 2005a; Dubey et al., 2006).

Dubey et al. (2002) genotipou pela primeira vez no Brasil isolados de galinhas caipiras infectadas naturalmente, procedentes de São Paulo. Amostras de galinhas caipiras procedentes do Rio de Janeiro, Paraná e Rondônia também foram genotipadas com a utilização somente do marcador SAG2 (Dubey et al., 2003a, Dubey et al., 2003b, Dubey et al., 2006).

Gatos, cães e porcos também tiveram suas amostras genotipadas utilizando o marcador SAG2 (Dubey et al., 2004a; Da Silva et al., 2005; de A dos Santos et al., 2005; Pena et al., 2006).

No Brasil estes trabalhos pioneiros de genotipagem por PCR-RFLP utilizando um único marcador mostraram a predominância de cepas do tipo I e tipo III. Os ensaios eram realizados em amostras isoladas de galinhas, gatos, cães e porcos provenientes de diferentes regiões do Brasil (Dubey et al., 2002; Dubey et al., 2003a, Dubey et al., 2003b, Dubey et al., 2004a; Da Silva et al., 2005; de A dos Santos et al., 2005; Dubey et al., 2006; Pena et al., 2006). Em contrapartida estudos realizados em isolados de animais e humanos nos Estados Unidos, Europa, Ásia e África mostraram a predominância cepas do tipo II (Dubey et al., 2003c; Sreekumar et al, 2003; Dubey et al., 2004b; Lindstron et al., 2006; Peyron et al; 2006; Zakimi et al., 2006).

Posteriormente os estudos foram feitos utilizando um número maior de marcadores moleculares. Contudo, os trabalhos de genotipagem com poucos marcadores genéticos, em isolados de pacientes com infecções congênitas (Ajzenberg et al., 2002; Nowakowska et al., 2006), toxoplasmose cerebral/AIDS (Fuentes et al., 2001; Galego et al., 2006; Ferreira et al., 2008) e ocular (Vallochi et al., 2005) forneceram informações preliminares para estudos mais recentes.

Com o emprego de mais marcadores moleculares verificou-se que a população de *T.gondii* possuindo somente os tipos clonais I, II e III não tinha sustentação científica, mostrando uma estrutura populacional bastante diversificada com genótipos recombinantes ou atípicos entre os três arquétipos (tipos I, II e III) (Grigg et al., 2001b; Khan et al., 2005b; Khan et al., 2006; Ferreira

et al., 2006; Su et al., 2006; Belfort-Neto et al., 2007; Dubey et al., 2007). Estes marcadores foram desenvolvidos com base na sequência de polimorfismo de DNA das linhagens clonais I, II e III, gerando informação valiosa para revelar a diversidade do parasito, sendo de fácil utilização e alta resolução na identificação de isolados de *T. gondii* (Su et al., 2006; Su et al., 2010).

Dubey et al. (2007) utilizando 11 marcadores moleculares (SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, alt - SAG2 e Apico) observaram grande diversidade genética nas populações de *T. gondii* isolados de galinhas caipiras do Pará e Rio Grande do Sul. As análises mostraram que os isolados de *T. gondii* eram geneticamente distintos entre as duas regiões estudadas e com 3500 km de distância.

Posteriormente, um estudo feito com 125 isolados de *T.gondii* provenientes de galinhas, cães e gatos do estado de São Paulo revelou 48 genótipos e mais quatro com linhagens típicas do Brasil denominadas BrI, BrII, BrIII, BrIV. De acordo com a taxa de mortalidade em camundongos infectados, determinou-se que o tipo BrI foi como virulento, o tipo BrII como avirulento e os tipos BrIII e BrIV como de virulencia intermediária (Pena et al., 2008).

Estudos de genotipagem de cepas de *T. gondii* isolados de animais selvagens e pacientes de diferentes regiões geográficas, revelaram uma alta frequência de genótipos não-arquétipos sugerindo uma alta diversidade da população de *T. gondii* (Su et al., 2006)

Cepas não - clonais, recombinantes ou atípicas foram determinadas em isolados de cães, gatos, gatos selvagens, gambás, ratos, esquilos, tucanos, capivaras e ursos de diversas partes do mundo (Brasil, Costa Rica, México, Egito, Alasca, Índia). Em todos os estudos foram utilizados os 11 de marcadores moleculares (SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, alt - SAG2 e Apico) (Dubey et al., 2009a, Dubey et al., 2009b; Dubey et al., 2009c; Yai et al., 2009; Al-Kappany et al., 2010; Dubey et al., 2010a; Frazão-Teixeira et al., 2011).

Genótipos não - arquétipos, isto é, mistos ou recombinantes também foram verificados em humanos de diversas regiões geográficas (Grigg et al.,

2001a; Khan et al., 2006; Ferreira et al., 2006; Su et al., 2006; Ferreira et al., 2008).

Recentemente um estudo realizado em Fernando de Noronha indicou que isolados de *T. gondii* provenientes de galinhas caipiras apresentaram os genótipos originais, isto é, clonais que são dominantes na Europa e América do Norte. Foram encontrados 6 genótipos incluindo o tipo II, tipo III e 4 novos genótipos ainda não encontrados no Brasil. Este resultado foi inesperado, já que isolados do Brasil são fenotipicamente e geneticamente diferentes dos isolados de outros países (Dubey et al.; 2010b).

Todos estes estudos anteriores demonstraram que a estrutura populacional de *T. gondii* é altamente clonal na América do Norte e Europa, enquanto que na América do Sul as cepas são geneticamente distintas e mais diversificadas. No entanto, a composição na América do Norte tem sido questionada pelas descrições recentes de cepas geneticamente diferentes, isto é, cepas não - clonais. Utilizando análises filogenéticas a fim de reavaliar a estrutura populacional do *T. gondii* na América do Norte foram mostrados dois grupos distintos. Em um, estes novos isolados representam variantes de uma linhagem existente, dos quais diferem somente pela deriva de mutações menores, em outro, surgiu uma linhagem completamente nova, comum na América do Norte (Khan et al., 2011).

Os marcadores microssatélites, também denominados de repetições de sequências simples, compreendem uma classe de moléculas de DNA repetitivas compostas de dois a seis pares de base dispersos no genoma dos organismos. São altamente polimórficos devido à variabilidade no número de repetições, e conseqüentemente, à existência de múltiplos alelos que os tornam muito informativos para a análise de variação genética, bem como diferenciação e caracterização de espécies. A alta taxa de mutação dos *loci* de microssatélite comparado com outras regiões do DNA gera uma grande variação genética (Ajzenberg et al., 2002; Ajzenberg et al., 2004; Fondon e Garner; 2004).

Ajzenberg et al. (2009) utilizaram seis marcadores microssatélites e mostraram que cepas do tipo II foram predominantes entre os pacientes que

adquiriram a infecção toxoplásmica na Europa, o tipo III foi o segundo genótipo mais comum, enquanto o tipo I foi raro nesta população. Em pacientes que adquiriram a toxoplasmose fora da Europa, foram encontrados outros treze genótipos diferentes.

Outro trabalho realizado na França caracterizou geneticamente isolados de *T. gondii* de 20 pacientes com toxoplasmose ocular utilizando marcadores microsátélites. Houve predominância de cepas do tipo II, possivelmente pela alta taxa de exposição deste genótipo na infecção humana na Europa (Fekkar et al., 2011).

Outro método, a sorotipagem foi descrita como um método promissor para caracterização de cepas de *T.gondii* em qualquer estágio da doença e em diferentes fases de infecção. Utiliza-se soros imunes contra peptídeos recombinantes de regiões polimórficas (SAG2, GRA3, GRA6 e GRA7) do parasito (Kong et al., 2003).

Peyron et al. (2006) sorotiparam amostras de mulheres grávidas infectadas cronicamente. Encontraram predominância de cepas do tipo II em amostras da Europa e cepas dos tipos I e III na Colombia (América do Sul).

Outro trabalho utilizando peptídeos polimórficos derivados de antígenos dos grânulos densos (GRA5 e GRA6), comparou os padrões sorotípicos observados em pacientes assintomáticos e pacientes sintomáticos com toxoplasmose ocular e HIV entre os doentes da Europa e América do Sul, sendo encontrados o tipo II na Europa e os tipos I e III na América do Sul (Morisset et al., 2008).

Em Santa Isabel do Ivaí (Brasil), utilizando o método de sorotipagem na população humana, foi identificada uma cepa atípica de *T.gondii* (Brl) como a causa de um surto de toxoplasmose por via hídrica, isto provavelmente reflete a diversidade genética do *T. gondii* circulante em regiões altamente endêmicas do Brasil (Vaudaux et al., 2010).

Sousa et al. (2010) sorotiparam amostras de suínos, ovelhas e galinhas e observaram que o sorotipo III apareceu com maior frequência entre as ovelhas. Porém muitos isolados de suínos e galinhas não foram obtidos. Concluíram que o

método precisa ser refinado para se tornar uma ferramenta mais valiosa para caracterizar isolados de *T. gondii* em animais.

De uma maneira geral a PCR-RFLP ainda é a técnica mais utilizada mundialmente na genotipagem de cepas de *T.gondii*. Sua utilização contribuiu positivamente na caracterização genotípica de isolados de *T.gondii* de animais e humanos em todo o mundo (Howe e Sibley, 1995; Su et al., 2010). No Brasil, a maioria dos isolados genotipados foi coletada de animais. Poucos trabalhos genotiparam isolados humanos pela complexidade da coleta das amostras (Vallochi et al., 2005; Ferreira et al., 2008). Como estes estudos utilizaram poucos marcadores genéticos, os resultados geraram o encontro de muitas cepas polimórficas, mistas, atípicas ou não genotipadas; concluindo-se que estes marcadores apresentavam pouca sensibilidade nas amostras da América do Sul. Assim, novas e diferentes regiões do genoma de *T. gondii* foram analisadas para genotipar as amostras brasileiras (Su et al., 2006). Diferentes marcadores foram descritos e com excelentes resultados quando utilizados para analisar isodados de animais brasileiros (Pena et al., 2006; Pena et al., 2008). O presente estudo mostra a aplicabilidade destes marcadores em genotipar DNA de *T. gondii* provenientes de amostras clínicas de pacientes humanos com toxoplasmose ativa.

2.OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Genotipar as amostras de DNA isoladas de amostras clínicas de pacientes com toxoplasmose utilizando-se diferentes marcadores genéticos.

2.2. Objetivos específicos

1. Validar a PCR-RFLP para genotipar isolados de *T. gondii* diretamente de amostras clínicas de pacientes com toxoplasmose ativa.
2. Avaliar marcadores moleculares de diferentes regiões do genoma de *T. gondii* para genotipar os isolados brasileiros.
3. Determinar os genótipos de *T. gondii* prevalentes na população estudada.

4. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostras clínicas

As genotipagens de *T. gondii* foram realizadas em DNA extraído de amostras clínicas coletadas no período de janeiro de 2007 a 2010 de 62 pacientes, destes 25 com toxoplasmose cerebral, 2 com toxoplasmose aguda, 12 com toxoplasmose ocular, 6 recém-nascidos com toxoplasmose congênita e 17 mulheres gestantes com toxoplasmose aguda.

As amostras clínicas foram encaminhadas por hospitais da rede Pública do estado de São Paulo (Hospital de Base de São José do Rio Preto e Instituto de Infectologia Emílio Ribas) ao Serviço de Parasitologia do Instituto Adolfo Lutz para a realização do diagnóstico molecular e imunológico da toxoplasmose.

3.2. Diagnóstico da toxoplasmose (Clínico, sorológico e molecular)

O diagnóstico da toxoplasmose foi determinado por médicos da rede Pública e foi baseado em características clínicas, radiológicas e laboratoriais. As metodologias laboratoriais incluíram: (i) exames sorológicos de anticorpos IgG e/ou IgM anti - *T. gondii* detectados por imunofluorescência (IFI) (Colombo et al, 2005.), (ii) PCR positivo convencional e PCR em tempo real (rtPCR) utilizando marcadores moleculares, que amplificam seqüência de duas regiões diferentes do gene B1 (Burg et al. , 1989; Colombo et al, 2005;. Mesquita et al, 2010a).

Para pacientes com alguma imunodepressão, contagem de células T CD4+ e sorologia para o HIV também foram investigadas.

O diagnóstico clínico para pacientes com toxoplasmose cerebral foi definido 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: 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 e resposta ao tratamento específico anti-*T. gondii*.

O diagnóstico pré-natal da toxoplasmose congênita foi baseado em exames de ultrassonografia e testes sorológicos (Hohlfeld et al., 1994).

Na toxoplasmose ocular, o diagnóstico presuntivo foi realizado pela fundoscopia ocular e contudo, a doença foi confirmada por meio de testes sorológicos e de biologia molecular (Amato e Marchi, 2002).

3.3. Coleta de amostras clínicas

Foram coletados 5 ml de sangue em tubo contendo EDTA para o diagnóstico molecular e 5 ml em tubo seco para o diagnóstico sorológico de cada paciente. Também foram coletados quando possível, 5 ml de líquido amniótico para o diagnóstico molecular. Alternativamente, 2 ml de líquido cefalorraquidiano para o diagnóstico molecular de pacientes com suspeita de toxoplasmose cerebral. A definição da coleta de sangue, líquido amniótico ou líquido cefalorraquidiano para cada paciente foi determinada pelo médico. As coletas foram realizadas antes ou até o terceiro dia de terapia específica para toxoplasmose quando esta foi iniciada.

3.4. Considerações éticas

Este projeto foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (Anexo 1).

As amostras de DNA de *T. gondii* foram genotipadas diretamente do material genético de indivíduos suspeitos de estarem com toxoplasmose. Estas amostras pertencem a um banco de DNA do Laboratório de Biologia Molecular de Parasitos do Instituto Adolfo Lutz ou foram encaminhadas ao Laboratório para realizar o diagnóstico molecular da toxoplasmose. As amostras positivas foram determinadas pelo diagnóstico laboratorial, que incluem os testes sorológicos (ELISA e IFI) e moleculares (PCR convencional e PCR em tempo real). São

provenientes de pacientes com toxoplasmose aguda, toxoplasmose cerebral e AIDS, toxoplasmose ocular, gestantes com infecção aguda e recém-nascidos com toxoplasmose congênita, e incluem amostras de sangue, LCR e LA.

3.5. Cepas de *T. gondii*

As cepas GTI, RH (Genótipo I), PTG, ME-49 (Genótipo II), CTG, VEG (Genótipo III) e COUGAR (TgCgCal), MAS, TgCatBr5 (Genótipos mistos), foram utilizadas para a validação das reações de genotipagem e como controle positivo nas reações (Su et al., 2006).

As amostras de DNA das cepas GTI, PTG, CTG, COUGAR (TgCgCal), MAS, TgCatBr5 foram gentilmente doadas pelo Dr Chunlei Su do “Department of Microbiology”, The University of Tennessee, Knoxville, USA.

3.5.1. Obtenção das cepas RH, ME-49 e VEG

As cepas RH, ME-49 e VEG foram mantidas em camundongos machos da linhagem Swiss com idade entre 25 e 30 dias.

A cepa RH foi mantida semanalmente, por inóculos intraperitoniais com 1×10^5 taquizoítos/animal. Após quatro dias de infecção os animais foram sacrificados e feitas lavagens intraperitoniais com 5 ml de solução salina (NaCl 0,85%) estéril. A seguir as soluções foram centrifugadas por 15min a 1800g, os parasitas quantificados em câmara de Neubauer para cálculo e obtenção da concentração desejada. Os taquizoítos foram utilizados para a manutenção da cepa através de passagem para um novo grupo de animais, para extração de DNA (controle positivo na PCR e genotipagem) e para obtenção dos antígenos utilizados no diagnóstico sorológico.

As cepas cistogênicas ME-49 e VEG foram mantidas por passagens seriadas, com intervalos de 30 a 45 dias. Os inóculos foram orais contendo 10 cistos/animal em uma suspensão contendo o macerado de células cerebrais em solução salina tamponada com fosfato (PBS) 0,01M pH 7.2 (ou NaCl 0,85%). Os

cistos foram quantificados por microscopia óptica (400X) entre lâmina e lamínula (10 µl da suspensão cerebral) e utilizados para extração de DNA para o uso como controle positivo na genotipagem (Costa - Silva et al., 2008).

3.6. Diagnóstico Sorológico

3.6.1. Obtenção de antígenos para o diagnóstico sorológico

Os taquizoítos da cepa RH foram obtidos como descrito no item 3.5.1. Após o descarte do sobrenadante, os parasitos foram lavados por três vezes com 40 ml de PBS 0,01M pH 7.2 por 15 min a 1800 g. Após foi adicionado 1ml de PBS ao sedimento contendo os parasitos. Em seguida, adicionou-se formol 2% em PBS pH 7.2 na proporção de 1:1 e incubou-se por 30 min a 37 °C. O sobrenadante foi desprezado após uma centrifugação por 15 min a 2800 g. O sedimento foi dissolvido em NaCl 0,85% estéril, até que se obtivesse 20 a 30 taquizoítos por campo em microscopia com aumento de 400 vezes. O antígeno foi distribuído em lâminas de imunofluorescência (20µl/orifício) e, deixadas secar naturalmente em temperatura ambiente. As lâminas secas foram embaladas em papel vegetal, acondicionadas em papel alumínio e posteriormente conservadas em freezer a -20 °C até o momento do uso (Colombo et al., 2005).

3.6.2. Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI) - IgM/ IgG

As reações foram realizadas no Setor de Toxoplasmose do Instituto Adolfo Lutz como descrito anteriormente (Colombo et al., 2005). Os soros foram diluídos, posteriormente acrescentados em um volume de 20 µl em lâminas de imunofluorescência. A seguir, as lâminas foram incubadas por 30 min em câmara úmida a 37 °C e, posteriormente lavadas com PBS pH 7.2 por dois períodos de 10min. As lâminas foram secas suavemente com papel filtro, e sobre os orifícios foram acrescentados 20 µl de uma globulina anti-IgM ou anti-IgG humana marcada com fluoresceína (Biolab-Merieux) diluído 1:200 em Azul de Evans

0,05% PBS pH 7.2. Após nova incubação em câmara úmida por 30 min a 37 °C, as lâminas foram novamente lavadas por 2 vezes com PBS pH 7.2. A seguir, foram secas e receberam uma fina camada de glicerina tamponada com PBS pH 7.2 e foram recobertas com lamínula. As leituras foram feitas em microscópio de fluorescência (Nikon) em aumento de 400x e o ponto de corte considerado na diluição de 1:16 para o soro e 1:4 para o LCR.

3.7. Diagnóstico molecular

3.7.1. Extração de DNA

3.7.1.1. Em amostras de sangue

As amostras coletadas foram transferidas para um tubo cônico de 15 ml e centrifugadas por 10 minutos a 2800 g, para retirada de plasma. A seguir adicionaram-se aos sedimentos cerca de 5 ml de PBS estéril para se remover qualquer inibidor presente entre as células. Centrifugou-se por 10 minutos a 2800 g, e todos os sobrenadantes foram desprezados. A fim de realizar-se a lise de hemácias foram adicionados ao sedimento 3 vezes o volume de tampão ACK (150 mM cloreto de amônio; 1 mM bicarbonato de potássio; 0,1 mM EDTA pH 7.3) e os tubos foram incubados a temperatura ambiente sob agitação suave por 10 minutos. Após uma nova centrifugação por 10 minutos a 2800 g, os sobrenadantes contendo restos de hemácias foram desprezados e os sedimentos foram transferidos para tubos cônicos de 1,5 ml.

A seguir iniciou-se a extração/purificação por um kit *PureLink® Genomic DNA (Invitrogen®)*, conforme instruções do fabricante, e na qual baseia-se da propriedade de ligação seletiva do DNA na presença de sais caótopicos em uma membrana de sílica. Primeiramente, foram adicionados aos sedimentos, 20 µl de tampão de lise com *proteinase K* e 20 µl de tampão *RNase A* (ambos fornecidos pelo kit), para lisar tanto células humanas quanto do parasita, e, de digerir qualquer resquício de RNA presente. Procedeu-se a agitação vigorosa (em vortex) e incubação por 2 minutos em temperatura ambiente. Adicionaram-se 200 µl de

tampão *PureLink*[®] *Genomic Lysis/Binding*, agitação em vortex e incubação por 10 minutos em Banho-maria à 56°C. Finalmente, adicionaram-se 200 µl de Etanol (96-100%) seguido novamente de agitação em vortex.

Após a etapa de extração do DNA iniciou-se a purificação onde, o material composto dos sedimentos e com os tampões de lise com *proteinase K*, de *RNase A*, *PureLink*[®] *Genomic Lysis/Binding* e etanol foi transferido para um tubo cônico especial (provido pelo kit) com membrana de sílica já pronta para uso. Centrifugou-se por 1 minuto à 10000 *g*, descartando-se o material centrifugado (mantendo-se apenas a membrana, pois o DNA liga-se à mesma). Iniciou-se, então, o processo de remoção de componentes celulares ainda presentes na membrana através de uma seqüência de duas “lavagens” com tampões providos no kit. Na primeira utilizaram-se 500 µl do tampão 1 e centrifugou-se por 1 minuto à 10000 *g*, e na segunda, 500 µl do tampão 2 por 3 minutos à 10000 *g*. Após restar apenas o DNA ligado com a membrana, adicionou-se um tampão de baixa concentração de sal, o que levou ao desprendimento do DNA da mesma. Para isto, adicionaram-se 50 µl de tampão *PureLink*[®] *Genomic Elution Buffer*, incubou-se por 1 minuto em temperatura ambiente, centrifugou-se por 1 minuto à 14000 *g*, e o DNA foi recolhido em um tubo cônico estéril de 1,5 ml. Em seguida procedeu-se a PCR ou o armazenamento do DNA a -20°C (Mesquita et al., 2010a).

3.7.1.2. Em LA

As amostras de líquido amniótico foram transferidas para um tubo cônico de 15 ml e centrifugadas por 10 minutos a 2800 *g* e descartados os sobrenadantes.

A seguir iniciou-se a extração/purificação através do kit *PureLink*[®] *Genomic DNA (Invitrogen*[®]), conforme descrito no item 3.7.1.1. (Mesquita et al., 2010a).

3.7.1.3. Em LCR

As amostras de LCR foram transferidas para tubos cônicos estéreis de 1,5 ml e centrifugadas por 5 minutos a 2.000 g. Descartaram-se os sobrenadantes, e os sedimentos contendo células foram lavadas com 500 µl PBS estéril por centrifugação por 5 minutos a 2.000 g. Após o descarte dos sobrenadantes, foram adicionados aos sedimentos, 40 µl de água *Milli-Q* autoclavada e incubados a 95°C por 5 a 10 minutos. Não foi necessária a purificação da amostra, pois em LCR, encontram-se poucas substâncias inibidoras da PCR. Em seguida procedeu-se a PCR ou o armazenamento do DNA a -20°C (Vidal et al., 2004).

3.7.1. 4. Em *T.gondii*

O DNA dos taquizoítos ou cistos provenientes de camundongos foi extraído através do kit *PureLink® Genomic DNA (Invitrogen®)* descrito previamente no item 3.7.1.1. O grau de pureza das extrações e a quantidade de DNA das amostras foram determinados por absorbâncias em *Nanodrop* no comprimento de onda 260 e 280 nm (luz ultravioleta). O grau de pureza das extrações foi determinado pela razão entre as leituras em DO (densidade ótica) 260/DO 280 nm que deveria apresentar valores entre 1,8 e 2,0. As leituras realizadas a 260 nm determinaram as concentrações de DNA. Segundo Sambrook et al. (1989) absorvância igual a 1 equivale a concentração de 50 µg/ml de DNA de fita dupla (Mesquita et al., 2010a).

3.7.2. cnPCR

As amplificações foram realizadas conforme descrito previamente (Colombo et al., 2005; Mesquita et al., 2010b) utilizando um kit comercial (*GoTaq®Green Master Mix - Promega*) contendo 2 corantes (azul e amarelo) que permitem monitorar o progresso das amostras durante a eletroforese. Cada 12,5 µl do “*mix*” continha 1 unidade de Taq DNA polimerase em 10mM Tris-HCl, pH 8.5;

50mM KCl; 1.5 mM MgCl₂ e 200 mM de cada um dos desoxinucleosídeos trifosfatados (dATP, dGTP, dCTP, dTTP). Cada reação foi realizada adicionando-se 5 µl do DNA alvo (com intervalo de concentração em torno de 500 ng/µl) e 50 pmol de cada iniciador num volume final de 25 µl. As amplificações foram realizadas utilizando um termociclador (*LongGene*). Para cada reação foram adicionados um controle positivo, a partir de DNA extraído de taquizoítos (concentração de 1x10⁷ taquizoítos/ml) e dois controles negativos. Em um adicionou-se DNA proveniente de um indivíduo sem toxoplasmose e em outro, água ultrapura que substituiu o DNA. Os marcadores utilizados foram B22 (5'AACGGGCGAGTAGCACCTGAGGAGA3') e B23 (5'TGGGTCTACGTCGATGGCATGACAAC3') que amplificam uma seqüência de 115 pares de bases de uma região repetitiva do gene B1 de *T. gondii*. (Burg et al, 1989; Colombo et al., 2005). 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, pareamento 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. Para o controle das extrações foram utilizados os marcadores β1 (5'-ACCACCAACTTCATCCACGTTCCACC-3') e β2 (5'-CTTCTGACACAACACTGTGTTCACTAGC-3') que amplificam uma seqüência de 140pb do gene β-globulina humana, realizadas simultaneamente, e com o mesmo protocolo de temperatura.

3.7.2.1. Eletroforese em gel de agarose

Os produtos amplificados pela cnPCR foram 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) corados com brometo de etídio, juntamente com o marcador de massa molecular com fragmentos múltiplos de 100 pb em uma velocidade de 6V/cm. As amostras foram visualizadas e fotografadas em um transluminador GeneGenius (Programa Gel Capture, Mini Bis Pro, versão 4.5.3) de ultravioleta a um comprimento de onda de 302 nm (Sambrook et al., 1989).

3.7.3. qrtPCR

As reações foram realizadas conforme descrita previamente (Mesquita et al., 2010a) em um *ABI 7300 Real-time PCR System (Applied Biosystems®)*. Cada *mix* de reação continha 10 µl *TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)*, 1 µl do marcador com sua respectiva sonda (18 µM de cada *primer*, 5 µM da sonda *TaqMan FAM dye-labeled* e 5 µM de *quencher NFQ*), 3 µl do DNA extraído/purificado (com intervalo de concentração em torno de 300 ng/µl), e 6 µl de H₂O milli-Q autoclavada para completar volume final de 20 µl. Os marcadores B1Tg-F (5'-CAAGCAGCGTATTGTCGAGTAGAT-3') e B1Tg-R (5'-GCGTCTCTTTCATTCCCACATTTT-3') amplificam uma seqüência de 83 pb (Mesquita et al., 2010a). Para cada reação foram adicionados um controle positivo, a partir de DNA extraído de taquizoítos (concentração de 1x10⁷ taquizoítos/ml) e dois controles negativos. Em um adicionou-se DNA proveniente de um indivíduo sem toxoplasmose e em outro, água ultrapura que substituiu o DNA.

Primeiramente, incubou-se a reação a uma temperatura de 50°C por 2 minutos (a fim de otimizar a atividade da enzima *AmpErase® Uracil N-glycosylase* (UNG), que permitiu a remoção de qualquer produto anteriormente amplificado, minimizando a contaminação cruzada), seguido por 95°C por 10 minutos. Em seguida realizou-se 40 ciclos compostos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

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

As reações de qrtPCR foram previamente padronizadas utilizando DNA de *T. gondii* extraído de amostras de sangue sabidamente negativas para este parasita e misturadas com um número determinado de taquizoítos. Estas amostras diluídas permitiram estabelecer o real valor representativo da carga parasitária em cada amostra clínica (Mesquita et al., 2010b) .

3.8. Genotipagem - PCR-RFLP

3.8.1. Escolha dos marcadores moleculares

Antes de validar as reações foram escolhidos 11 marcadores genéticos: SAG1, SAG2 (5'- SAG2 e 3'- SAG2), SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, alt - SAG2 e Apico (Su et al., 2006; Su et al., 2010)

Os marcadores, genes e localização nos cromossomos estão descritos na Tabela 1. O marcador Apico amplifica uma região do gene Apico que encontra - se localizado no DNA circular extracromossomal, no interior do apicoplasto (Ajioka et al., 2001; Dubey et al; 2006).

Tabela 1: Marcadores moleculares com seus respectivos genes e localização utilizados na genotipagem de isolados de *T. gondii* de amostras clínicas humanas.

Marcadores	Genes	Localização	Referências
SAG1	SAG1	cromossomo VIII (Fig 6)	Grigg et al., 2001b ; Khan et al., 2005a
5'+3' - SAG2	SAG2	cromossomo VIII (Fig 6)	Howe et al., 1997; Khan et al., 2005a.
alt - SAG2	SAG2	cromossomo VIII (Fig 6)	Lehmann et al., 2000, Khan et al., 2005a
SAG3	SAG3	cromossomo XII (Fig 7)	Grigg et al., 2001b; Khan et al., 2005a
GRA6	GRA6	cromossomo X (Fig 8)	Khan et al., 2005a, Khan et al., 2005b
BTUB	BTUB	cromossomo IX (Fig 9)	Khan et al., 2005a, Khan et al., 2005b
C22-8	C22-8	cromossomo Ib (Fig 10)	Khan et al., 2005a, Khan et al., 2005b
C29-2	C29-2	cromossomo III (Fig 11)	Khan et al., 2005a, Khan et al., 2005b
L358	L358	cromossomo V (Fig 12)	Khan et al., 2005a, Khan et al., 2005b
PK1	PK1	cromossomo VI (Fig 13)	Khan et al., 2005a, Khan et al., 2005b
Apico	Apico	Apicoplasto	Dubey et al., 2006

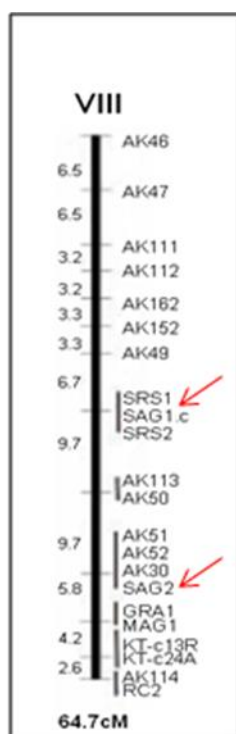


Figura 6: Localização dos genes SAG1 e SAG2 no cromossomo VIII de *T.gondii* (Khan et al., 2005a).

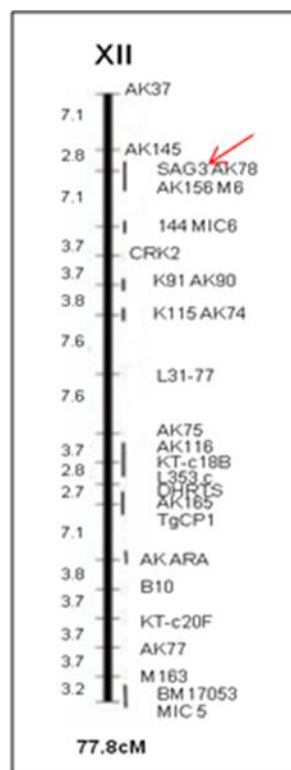


Figura 7: Localização do gene SAG3 no cromossomo XII de *T.gondii* (Khan et al., 2005a).

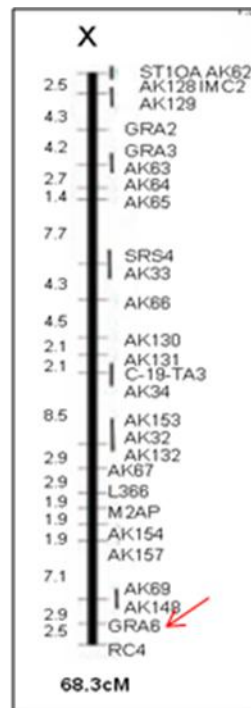


Figura 8: Localização do gene GRA6 no cromossomo X de *T. gondii* (Khan et al., 2005a).

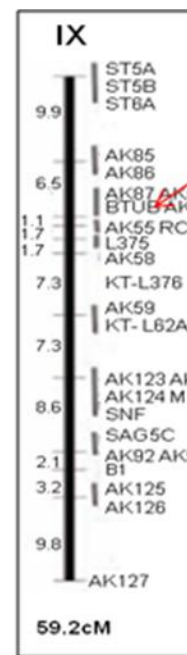


Figura 9: Localização do gene BTUB no cromossomo IX de *T. gondii* (Khan et al., 2005a).

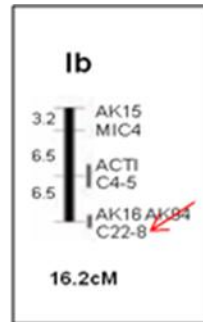


Figura 10: Localização do gene C22-9 no cromossomo Ib de *T.gondii* (Khan et al., 2005a).

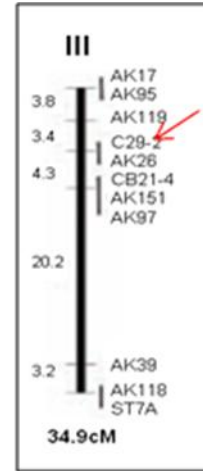


Figura 11: Localização do gene C29-2 no cromossomo III de *T.gondii* (Khan et al., 2005a).

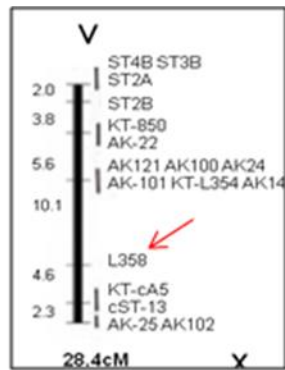


Figura 12: Localização do gene L358 no cromossomo V de *T.gondii* (Khan et al., 2005a).

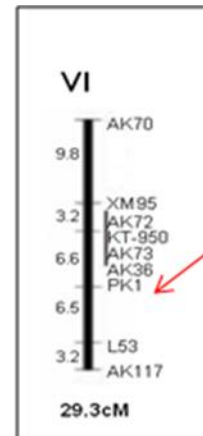


Figura 13: Localização do gene PK1 no cromossomo VI de *T.gondii* (Khan et al., 2005a).

3.8.2. Validação da PCR- RFLP

Para a validação das reações foram utilizadas as cepas de *T. gondii* citadas no item 3.5 genotipadas pela combinação das metodologias de Multiplex-PCR (Multilocus), Nested - PCR e análise do polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) dos genes SAG1, SAG2 (5'-SAG2 e 3'-SAG2), SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, novo SAG2 e Apico conforme descrito por Su et al., 2006.

3.8.2.1. 1º PCR (Multiplex)

Para as reações em multiplex foram adicionados os oligonucleotídeos iniciadores externos dos marcadores SAG1, SAG2 (5'-SAG2 e 3'-SAG2), SAG3, GRA6, BTUB, c22-8, c29-2, L358, PK1, novo SAG2 e Apico (Tabela 2). Cada reação foi realizada adicionando-se 0,25 ul do mix de Primer Forward (25 uM), 0,25 ul do mix de Primer Reverse (25 uM), 2,5 ul de tampão de PCR 10X sem magnésio (50mM KCl, 10mM Tris-HCl), 2 ul do mix de desoxinucleotídeos (2.5mM cada dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 ul 50mM de cloreto de magnésio (MgCl₂), 0,2 ul de DNA *Taq* polimerase (5U/ul), 3 µl de DNA de cepas de *T.gondii*, em um volume final de 25 ul completado com água ultrapura. As amplificações consistiram de um ciclo inicial de desnaturação de 4 minutos a 95°C, uma segunda etapa com 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, pareamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos, finalizando por um ciclo de extensão por 3 minutos a 72°C. Os produtos da PCR foram diluídos adicionando - se 25 µl de água ultrapura e armazenados a -20°C utilizados posteriormente no 2ºPCR.

3.8.2.2. 2ºPCR ou Nested-PCR

Para cada marcador realizou-se uma reação, onde foram adicionados oligonucleotídeos iniciadores externos (Tabela 2). As concentrações de todos os componentes foram às mesmas descritas na reação de multilocus - PCR, com

exceção das concentrações dos oligonucleotídeos, onde cada região do DNA foi amplificada separadamente com 0,5 ul (50 uM). As amplificações consistiram de um ciclo inicial de desnaturação de 4 minutos a 95°C, uma segunda etapa com 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, pareamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos, finalizando por um ciclo de extensão por 3 minutos a 72° C.

3.8.2.3. RFLP

O polimorfismo de cada locus foi analisado por RFLP. Os fragmentos amplificados da Nested-PCR foram digeridos com as enzimas de restrição apropriadas para os diferentes marcadores na temperatura adequada para cada enzima e de acordo com as instruções do fabricante (Tabela 2). Para cada reação cepas RH, ME - 49, VEG, GTI, PTG, CTG, COUGAR (TgCgCal), MAS, TgCatBr5 foram utilizadas como controles positivos, e como controles negativos DNA proveniente de um indivíduo sem toxoplasmose e em outro, água ultrapura que substituiu o DNA.

Tabela 2: Iniciadores utilizados no 1ºPCR (Multiplex) e 2ºPCR (Nested) e enzimas de restrição

Marcadores	Iniciadores externos 5'→3'	Iniciadores internos 5'→3'	(RFLP) ^a	Referências
SAG1	GTTCTAACCACGCACCCTGAG AAGAGTGGGAGGCTCTGTGA	CAATGTGCACCTGTAGGAAGC GTGGTTCTCCGTCGGTGTGAG	Sau96I+HaeII (digestão dupla)	Grigg et al., 2001b
5'-SAG2	GCTACCTCGAACAGGAACAC GCATCAACAGTCTTCGTTGC	GAAATGTTTTAGGTTGCTGC GCAAGAGCGAACTTGAACAC	Sau3 AI	Howe et al., 1997
3'-SAG2	TCTGTTCTCCGAAGTGACTCC TCAAAGCGTGCATTATCGC	ATTCTCATGCCTCCGCTTC AACGTTTCACGAAGGCACAC	HhaI	Howe et al., 1997
SAG3	CAACTCTCACCATTCCACCC GCGCGTTGTTAGACAAGACA	CACAAGGAGACCGAGAAGGA TCTTGTCGGGTGTTCACTCA	NciI	Grigg et al., 2001b
GRA6	ATTTGTGTTTCCGAGCAGGT GCACCTTCGCTTGTGGTT	TTCCGAGCAGGTGACCT TCGCCGAAGAGTTGACATAG	MseI	Khan et al. , 2005b
BTUB	TCCAAAATGAGAGAAATCGT AAATTGAAATGACGGAAGAA	GAGGTCATCCTCGGACGAACA TTGTAGGAACACCCGGACGC	BsiEI+TaqI (digestão dupla)	Khan et al. , 2005b
c22-8	TGATGCATCCATGCGTTTAT CCTCCACTTCTTCGGTCTCA	TCTCTCTACGTGGACGCC AGGTGCTTGATATTTCGC	BsmA I, Mbo II	Khan et al. , 2005b
c29-2	ACCCACTGAGCGAAAAGAAA AGGGTCTCTTGCGCATACAT	AGTTCTGCAGAGTGTTCGC TGTCTAGGAAAGAGGCGC	HpyCH4IV, Rsa I	Khan et al. , 2005b
L358	TCTCTCGACTTCGCCTCTTC GCAATTTCTCGAAGACAGG	AGGAGGCGTAGCGCAAGT CCCTCTGGCTGCAGTGCT	Hae III, Nla III	Khan et al. , 2005b
PK1	GAAAGCTGTCCACCCTGAAA AGAAAGCTCCGTGCAGTGAT	CGCAAAGGGAGACAATCAGT TCATCGCTGAATCTCATTGC	Ava I, Rsa I	Khan et al. , 2005b
alt-SAG2	GGAACGCGAACAATGAGTTT GCACTGTTGTCCAGGGTTTT	ACCCATCTGCGAAGAAAACG ATTTGACCAGCGGGAGCAC	Hinf I, Taq I	Lehmann et al.,2000
Apico	TGGTTTTAACCTAGATTGTGG AAACGGAATTAATGAGATTTGAA	TGCAAATTTGAATTCTCAGTT GGGATTTCGAACCTTGATA	Afl II, Dde I	Dubey et al., 2006

3.8.3. Isolados de *T. gondii* dos pacientes

Os genótipos dos isolados de *T. gondii* dos pacientes foram determinados por PCR-RFLP utilizando os 11 marcadores como descritos no item **3.8.1**.

Todas as reações como 1ºPCR (Multiplex), 2º PCR e RFLP foram realizadas exatamente como descritas nos itens **3.8.2.1**, **3.8.2.2** e **3.8.2.3**., sendo que as quantidades de DNA foram modificadas. Na reação de 1º PCR foram adicionados em cada reação 5 µl de cada amostra de DNA de sangue e/ou 10 µl de DNA de LCR ou 10 µl de DNA de líquido amniótico. No 2ºPCR foram adicionadas as mesmas quantidades, sendo que diluídas conforme descrito no item **3.8.2.1**.

Os produtos amplificados para genotipagem, bem como os produtos digeridos com as enzimas de restrição foram visualizados conforme o item **3.7.2.1**.

3.8.4. Análise dos dados

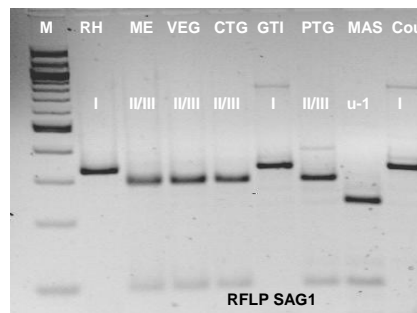
Os dados clínicos e laboratoriais foram utilizados para estabelecer o diagnóstico de cada paciente. Os genótipos foram identificados e comparados com os existentes no <http://toxodb.org/toxo/>. O ToxoDB é um banco de dados disponível publicamente contendo todas informações sobre o *T. gondii*. Nele encontra-se disponível dados do genoma, como as sequências genômicas das cepas do parasito, sendo encontrados mais de 70 milhões de pares de base de sequência de nucleotídeos, além de proteínas conhecidas (Kissinger et al., 2003).

Resultados

4.1. Validação das reações de genotipagem

Antes de genotipar as amostras clínicas foi necessário validar cada passo da reação de PCR-RFLP utilizando os 11 marcadores genéticos escolhidos baseado no trabalho de Su et al. (2006): SAG1, SAG2 (5'-SAG2 e 3'-SAG2), SAG3, GRA6, BTUB, c22-8, c29-2, L358, PK1, novo SAG2 e Apico. As reações foram validadas utilizando-se cepas padrões GTI, RH, PTG, ME49, CTG, VEG, COUGAR (TgCgCal), MAS, TgCatBr5.

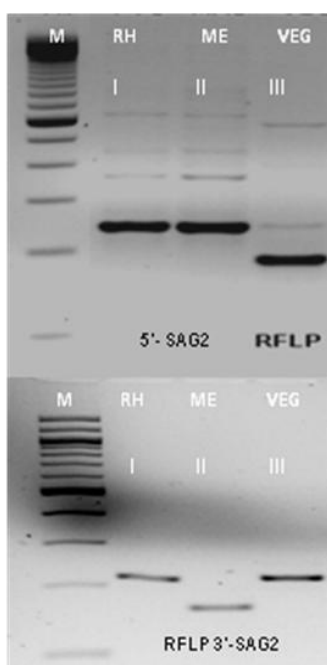
Marcador SAG1, amplifica uma região do gene SAG1 (Grigg et al., 2001b). Os produtos do 2ºPCR foram digeridos com as enzimas de restrição *Sau96I* e *HaeIII* (dupla digestão) e analisados em gel de agarose por eletroforese (Figura 14). Os fragmentos digeridos distinguiram os genótipos I, II/III e u-1.



Sau96I+*HaeIII* (dupla digestão) 37°C gel de agarose a 2,5%

Figura 14: Perfil de restrição enzimática de produto do gene SAG1 digerido com as enzimas *Sau96I* e *HaeIII* que distigie os genótipos I, II/III e u-1 de *T.gondii*.

O marcador 5'- SAG2, amplifica uma sequência próxima a extremidade 5' do gene SAG2. Por outro lado o 3'- SAG2 amplifica uma sequência próxima a extremidade 3' do gene (Howe et al., 1997). Os produtos do 2ºPCR foram digeridos com as enzimas de restrição *Sau3AI* e *HhaI* respectivamente e analisados em gel de agarose por eletroforese (Figura 15). Os fragmentos digeridos no marcador 5'- SAG2 distinguiram o genótipo III dos genótipos I e II e os fragmentos digeridos no marcador 3'- SAG2 distinguiram o genótipo II dos genótipos I e III.

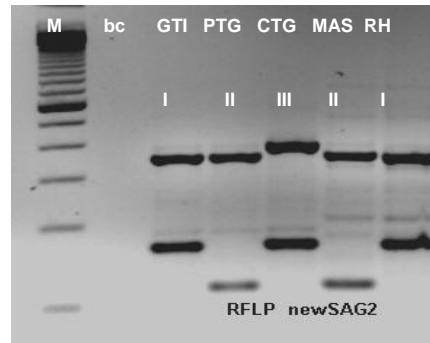


Mbol 37°C gel de agarose a 2,5%

HhaI 37°C gel de agarose a 2,5%

Figura 15: Perfil de restrição enzimática de produto do gene SAG2 (5'-SAG2 e 3'- SAG2 digerido com as enzimas *Mbol* e *HhaI* que distigues os genótipos I, II e III de *T.gondii*.

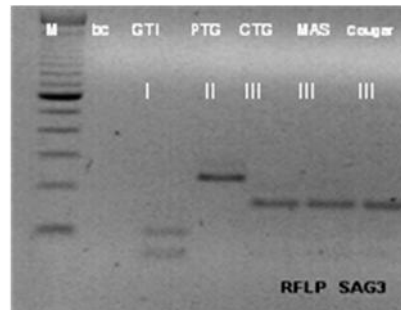
O marcador alt - SAG2, amplifica uma região do gene SAG2 (Lehmann et al., 2000). Os produtos do 2ºPCR foram digeridos com as enzimas de restrição *Hinfl* e *TaqI* (dupla digestão) e analisados em gel de agarose por eletroforese (Figura 16). Os fragmentos digeridos distinguiram os genótipos I, II e III.



Hinfl+*TaqI* (dupla digestão)
37°C/65°gel de agarose a 2,5%

Figura 16: Perfil de restrição enzimática de produto do gene SAG2 digerido com as enzimas *Hinfl*+*TaqI* que distigie os genótipos I, II e III de *T.gondii*.

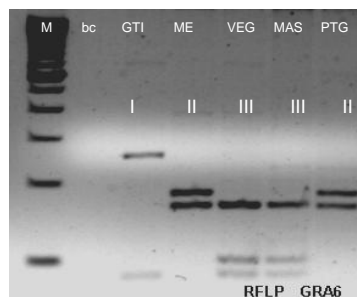
O marcador SAG3, amplifica uma região do gene SAG3 (Grigg et al., 2001b). Os produtos do 2ºPCR foram digeridos com a enzimas de restrição *NciI* e analisados em gel de agarose por eletroforese (Figura 17). Os fragmentos digeridos distinguiram os genótipos I, II e III.



NciI 37°C gel de agarose a 2,5%

Figura 17: Perfil de restrição enzimática de produto do gene SAG3 digerido com a enzima *NciI* que distigie os genótipos I, II e III de *T.gondii*.

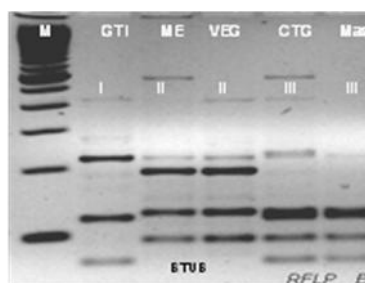
O marcador GRA6, amplifica uma região do gene GRA6 (Khan et al., 2005b). Os produtos do 2ºPCR foram digeridos com a enzima de restrição *MseI* e analisados em gel de agarose por eletroforese (Figura 18). Os fragmentos digeridos distinguiram os genótipos I, II e III.



MseI 37°C gel de agarose a 2,5%

Figura 18: Perfil de restrição enzimática de produto do gene GRA6 digerido com a enzima *MseI* que distigüe os genótipos I, II e III de *T.gondii*.

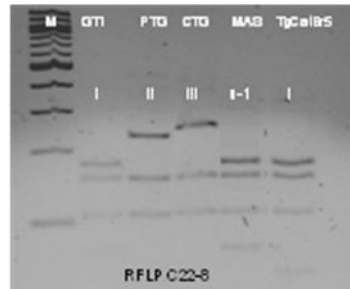
O marcador BTUB, amplifica uma região do gene BTUB (Khan et al., 2005b). Os produtos do 2ºPCR foram digeridos com as enzimas de restrição *BsiEI* e *TaqI* (dupla digestão) e analisados em gel de agarose por eletroforese (Figura 19). Os fragmentos digeridos distinguiram os genótipos I, II e III.



BsiEI+TaqI (dupla digestão)
37°C gel de agarose a 2,5%

Figura 19: Perfil de restrição enzimática de produto do gene BTUB digerido com as enzimas *BsiEI* e *TaqI* que distigüe os genótipos I, II e III de *T.gondii*.

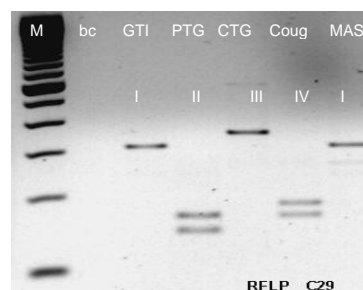
O marcador C22-8, amplifica uma região do gene C22-8 (Khan et al., 2005b). Os produtos do 2ºPCR foram digeridos com as enzimas de restrição *BsmAI* e *MbolI* (dupla digestão) e analisados em gel de agarose por eletroforese (Figura 20). Os fragmentos digeridos distinguiram os genótipos I, II, III e u-1(IV).



BsmAI+ *MbolI* (dupla digestão) 37°C/55°C
gel de agarose a 2,5%

Figura 20: Perfil de restrição enzimática de produto do gene C22-8 digerido com as enzimas *BsmAI*+ *MbolI* que distigie os genótipos I, II, III e u-1 de *T.gondii*.

O marcador C29-2, amplifica uma região do gene C29-2 (Khan et al., 2005b). Os produtos do 2ºPCR foram digeridos com as enzimas de restrição *HpyCH4IV* e *RsaI* (dupla digestão) e analisados em gel de agarose por eletroforese (Figura 21). Os fragmentos digeridos distinguiram os genótipos I, II, III e u-1(IV).



HpyCH4IV+ *RsaI* (dupla digestão)
37°C gel de agarose a 2,0%

Figura 21: Perfil de restrição enzimática de produto do gene C29-2 digerido com as enzimas *HpyCH4IV* e *RsaI* que distigie os genótipos I, II, III e u-1 de *T.gondii*.

O marcador L358, amplifica uma região do gene L358 (Khan et al., 2005b). Os produtos do 2ºPCR foram digeridos com as enzimas de restrição *HaeIII* e *NlaIII* (dupla digestão) e analisados em gel de agarose por eletroforese (Figura 22). Os fragmentos digeridos distinguiram os genótipos I, II e III.

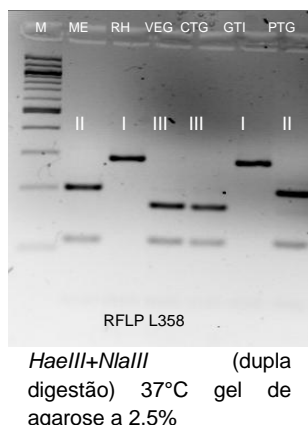


Figura 22: Perfil de restrição enzimática de produto do gene L358 digerido com as enzimas *HaeIII* e *NlaIII* que distingue os genótipos I, II, e III de *T.gondii*.

O marcador PK1, amplifica uma região do gene PK1 (Khan et al., 2005b). Os produtos de PCR foram digeridos com as enzimas de restrição *AvaI* e *RsaI* (dupla digestão) e analisados em gel de agarose por eletroforese (Figura 23). Os fragmentos digeridos distinguiram os genótipos I, II, III, u-1 (IV) e u-2 (V).

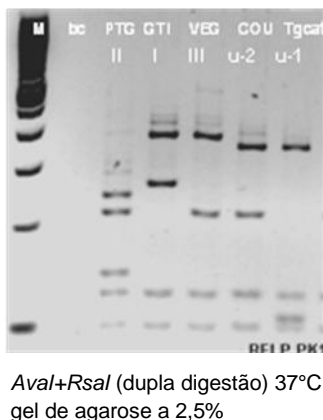


Figura 23: Perfil de restrição enzimática de produto do gene L358 digerido com as enzimas *AvaI* e *RsaI* que distingue os genótipos I, II, III, u-1 e u-2 de *T.gondii*.

O marcador Apico, amplifica uma região do gene Apico (Dubey et al; 2006,). Os produtos de PCR foram digeridos com as enzimas de restrição *AfIII* e *DdeI* (dupla digestão) e analisados em gel de agarose por eletroforese (Figura 24). Os fragmentos digeridos distinguiram os genótipos I, II e III.

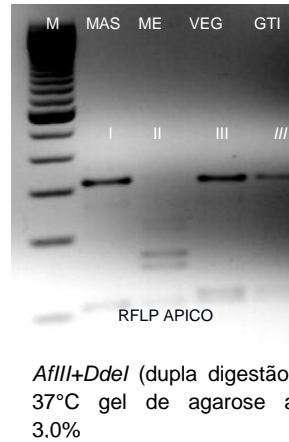


Figura 24: Perfil de restrição enzimática de produto do gene L358 digerido com as enzimas *AfIII* e *DdeI* que distigüe os genótipos I, II e III de *T.gondii*.

4.2. Caracterização genotípica das amostras clínicas

Todas as 62 amostras de DNA utilizadas neste trabalho e analisadas por PCR-RFLP foram extraídas de amostras clínicas de pacientes com toxoplasmose. Todos apresentaram PCR positiva em um dos métodos (cnPCR ou qrtPCR). Na cnPCR os marcadores B22 e B23 amplificaram uma seqüência de 115 pares de bases de uma região repetitiva do gene B1 de *T. gondii*. (Figura 25).

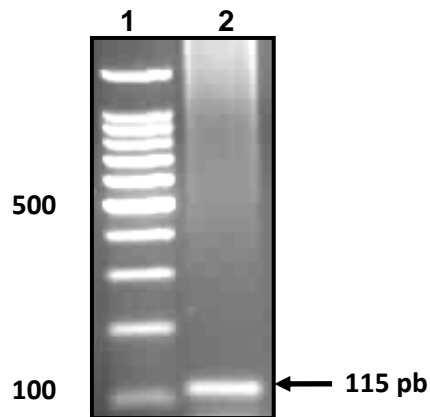


Figura 25: Amostra representativa de produto de PCR do gene B1 de *T. gondii* quando submetido a eletroforese em gel de agarose a 2%. (1) Massa molecular de 100 pb; (2) Amostra clínica.

Na qrtPCR valores de Ct (*threshold cycle*) abaixo de 40 foram considerados positivos, sendo que em três amostras (At176-Af*, Ct262–BI e Ct244–BI) não foram determinadas por falta do material genético (Tabela 3). Anticorpos IgM ou IgG foram detectados por IFI. Pacientes que apresentaram título igual ou superior a 1:16 e 1:4 no soro e LCR, respectivamente, foram considerados positivos para toxoplasmose, com exceção do paciente Ct262 que apresentou sorologia negativa (IgM e IgG) (Tabela 3).

Amostras de DNA foram isoladas do sangue, líquido e líquido amniótico de 25 pacientes com toxoplasmose cerebral e AIDS, 2 pacientes com toxoplasmose aguda, 12 pacientes com toxoplasmose ocular, 6 recém-nascidos com toxoplasmose congênita e 17 gestantes com toxoplasmose aguda.

Das 62 amostras clínicas, 20 (32%) foram genotipadas com sucesso em 8 ou mais loci gênicos e somente estas comparadas com exames clínicos e laboratoriais (Tabela 4). As outras 42 (68%) obtiveram resultado em até 7 loci gênicos e estão listadas na Tabela 5.

Das 20 amostras, três genótipos foram identificados e comparados aos listados no ToxoDB. Dezoito (90%) pertencem ao genótipo ToxoDB # 65 e as outras duas amostras, Ct180 e Ct534 pertencem aos genótipos # 71(5%) e # 6 (5%), respectivamente. O Genótipo # 65 foi previamente identificado em galinhas e gatos no Brasil (isolados IDs: TgCkBr89 e TgCatBr82, ambas as cepas virulentas para camundongos) (Dubey et al., 2008; Pena et al., 2008). O genótipo # 71 também foi previamente identificado em galinhas no Brasil (isolados IDs: TgCkBr26 e TgCkBr69) (Dubey et al., 2008). O genótipo # 6 foi identificado em diferentes animais sendo o genótipo mais encontrado no Brasil (tipo BRI). Cepas pertencentes a este genótipo geralmente são virulentas para camundongos (Pena et al., 2008).

Os dados clínicos e laboratoriais dos 20 pacientes cujos os isolados de *T. gondii* foram genotipados estão apresentados na Tabela 3. Entre os 18 pacientes infectados com o genótipo # 65 ,a toxoplasmose aguda foi demonstrada em três pacientes imunocompetentes (At704, At358 e At176), dentre eles uma mulher que desenvolveu a infecção aguda durante a gravidez, porém sem sintomatologia

(At176). Um paciente (CT262), não portador do vírus HIV e sem anticorpos IgG e IgM para *T. gondii*, teve infecção aguda com toxoplasmose cerebral focal, apresentou PCR e histopatológico positivos para *T. gondii*.

A toxoplasmose cerebral focal foi observada em outros 6 pacientes (Ct331, Ct384, Ct441, Ct527, Ct581, Ct244), sendo caracterizada por múltiplas lesões cerebrais expansivas. Estes foram tratados com a terapia convencional antitoxoplasmose (sulfadiazina, pirimetamina e ácido folínico), cinco deles receberam alta e o paciente (Ct581) com toxoplasmose cerebral focal e encefalite por citomegalovírus foi a óbito.

A toxoplasmose ocular foi encontrada em um paciente com AIDS (Ot539) e em 6 pacientes imunocompetentes (Ot692, Ot571, Ot607, Ot616, Ot622, Ot508). A toxoplasmose congênita foi demonstrada em um bebê com 6 meses (Cot477). Os Genótipos # 71 e # 6 foram isolados a partir de 2 pacientes com toxoplasmose cerebral difusa (Ct180) e (Ct534), respectivamente. Ambos os pacientes tiveram toxoplasmose cerebral atípica, caracterizada por encefalite difusa, sem lesões cerebrais expansivas visíveis nas imagens. Ambos os casos tiveram PCR positiva para *T. gondii* no LCR, e o paciente Ct180 (genótipo # 71) teve o diagnóstico histopatológico compatível com toxoplasmose. Estes dois pacientes foram a óbito apesar da terapêutica específica anti-toxoplasmose.

Os 20 pacientes foram diagnosticados e tratados no Estado de São Paulo em diferentes períodos, sendo incerto o local da infecção (Tabela 4). Assim, esses dados demonstram que não houve indicação de nenhum surto entre esses pacientes.

Tabela 3: Resultado clínico e laboratorial dos 20 pacientes genotipados

Código das amostras clínicas /coleta das amostras ^a	Idade (anos)	Diagnóstico ^b (clínico, imagem e laboratorial)	cPCR	rtPCR ^c (CT)	IF-IgG ^d	IF-IgM ^d	CD4+ Nº de linfócitos ^e	HIV (sorologia)	Histo-patologia cerebral p/ <i>T. gondii</i>	Status do paciente	Tratamento toxoplasmose	Genótipo
At704-BI- 11/09	33	Toxoplasmose aguda	pos	22.7	1:256	1:16	nd	Neg	nd	Vivo	Sim	ToxoDB #65
At358-BI- 08/08	4	Toxoplasmose aguda	pos	31.9	1:1024	1:1024	nd	Neg	nd	Vivo	Sim	ToxoDB #65
At176-Af*-04/07	19	Toxoplasmose aguda (gestante assintomática)	pos	nd	1:16	neg	nd	Neg	nd	Vivo	Sim	ToxoDB #65
Ct262-BI-10/07	29	Toxoplasmose cerebral aguda e focal	pos	nd	neg	neg	498	Neg	pos (biópsia)	Vivo	Sim	ToxoDB #65
Ct384-BI-09/08	39	Toxoplasmose cerebral focal	pos	36.3	1:4000	neg	184	Pos	nd	Vivo	Sim	ToxoDB #65
Ct527-BI-05/09	36	Toxoplasmose cerebral focal	pos	32	1:4000	neg	89	Pos	nd	Vivo	Sim	ToxoDB #65
Ct581-BI-08/09	10	Toxoplasmose cerebral focal e encefalite por citomegalovirus	pos	22.6	1:4000	neg	2	Pos	nd	Óbito**	Sim	ToxoDB #65
Ct244-BI-08/07	39	Toxoplasmose cerebral focal	pos	nd	1:256	neg	56	Pos	nd	Vivo	Sim	ToxoDB #65
Ct331-BI-06/08	42	Toxoplasmose cerebral focal	pos	27.3	1:256	neg	9	Pos	nd	Vivo	Sim	ToxoDB #65
Ct441-BI-12/08	42	Toxoplasmose cerebral focal	pos	29.9	1:16	neg	17	Pos	nd	Vivo	Sim	ToxoDB #65
Ct180-CSF-05/07	40	Toxoplasmose cerebral difusa	pos	31.0	1:4000	neg	93	Pos	pos (necrópsia)	Óbito	Sim	ToxoDB #71
Ct534-BI/CSF-06/09	45	Toxoplasmose cerebral difusa	pos	32.9	1:4000	neg	8	Pos	nd	Óbito	Sim	ToxoDB #6
Ot692-BI-11/09	27	Toxoplasmose ocular	pos	32	1:16	neg	nd	Neg	nd	Vivo	Sim	ToxoDB #65
Ot571-BI-08/09	77	Toxoplasmose ocular	pos	36	1:16	neg	nd	Neg	nd	Vivo	Sim	ToxoDB #65
Ot622-BI-11/09	54	Toxoplasmose ocular	pos	28.1	1:16	neg	nd	Neg	nd	Vivo	Sim	ToxoDB #65
Ot508-BI-03/09	14	Toxoplasmose ocular	pos	35	1:4000	neg	299	Neg	nd	Vivo	Sim	ToxoDB #65
Ot539-BI-06/09	56	Toxoplasmose ocular	pos	28	1:16	neg	nd	Pos	nd	Vivo	Sim	ToxoDB #65
Ot607-BI-09/09	36	Toxoplasmose ocular	pos	36.4	1:1024	neg	nd	Neg	nd	Vivo	Sim	ToxoDB #65
Ot616-BI-09/09	60	Toxoplasmose ocular	pos	25	1:16	neg	nd	Neg	nd	Vivo	Sim	ToxoDB #65
Cot477-BI-01/09	0.6	Toxoplasmose congênita	pos	18	1:16	neg	nd	Neg	nd	Vivo	Sim	ToxoDB #65

^aAt (Toxoplasmose aguda); Ct (toxoplasmose cerebral); Cot (toxoplasmose congênita); Ot (toxoplasmose ocular); número do paciente e amostra clínica: BI, sangue; Af, líquido amniótico e CSF, líquido cefalorraquidiano ou líquido. Data (mês/ano) da coleta das amostras clínicas.

^b O diagnóstico foi definido pelo exame clínico, imagens e dados laboratoriais conforme descrito em materiais e métodos.

^c Os resultados do qrtPCR foram mostrados em CT (cycle threshold). Valores abaixo de 40 foram considerados positivos (Mesquita et al., 2010a,b).

^d Amostras de soro e CSF foram consideradas reagentes a partir de 1:16 e 1:4 respectivamente.

^e número de linfócitos CD4+ T /µl de sangue.

* IFI foram determinadas em amostra de soro.

**Encefalite por citomegalovírus foi concomitante ao diagnóstico da toxoplasmose cerebral. nd, não determinado; neg, negativo; pos, positivo.

Tabela 4: Genótipos de *T. gondii* determinados em 20 amostras clínicas humanas

Amostras clínicas código ^a	Marcadores											Genótipo
	SAG1	5'+3' SAG2	SAG2	SAG3	BTUB	GRA6	c22-8	c29-2	L358	PK1	Apico	
At704	I	I	II	III	III	III	u-1	I	I	nd	I	ToxoDB #65 ^b
At358	I	I	II	III	III	III	u-1	I	I	III	I	ToxoDB #65
At176	I	I	II	III	III	III	nd	nd	I	III	I	ToxoDB #65
Ct262	I	I	II	III	III	III	u-1	I	I	III	I	ToxoDB #65
Ct384	I	I	II	III	III	III	u-1	I	I	nd	I	ToxoDB #65
Ct527	I	I	II	III	III	III	u-1	I	I	III	I	ToxoDB #65
Ct581	I	I	II	III	III	III	u-1	I	I	III	I	ToxoDB #65
Ct244	I	I	II	III	III	III	u-1	I	I	nd	I	ToxoDB #65
Ct331	I	I	II	III	III	III	u-1	I	I	III	I	ToxoDB #65
Ct441	I	I	II	III	III	III	nd	I	I	nd	nd	ToxoDB #65
Ct180	I	III	III	III	III	III	II	I	III	III	I	ToxoDB #71 ^c
Ct534	I	I	I	III	I	II	u-1	I	I	I	I	ToxoDB #6 ^d
Ot692	I	I	II	III	III	III	u-1	I	I	III	I	ToxoDB #65
Ot571	I	I	II	III	III	III	u-1	I	I	III	I	ToxoDB #65
Ot622	I	I	II	III	III	III	u-1	I	I	III	I	ToxoDB #65
Ot508	I	I	II	III	III	III	u-1	nd	I	nd	nd	ToxoDB #65
Ot539	I	I	II	III	III	III	u-1	I	I	III	I	ToxoDB #65
Ot607	I	I	II	III	III	III	u-1	I	I	III	I	ToxoDB #65
Ot616	I	I	II	III	III	III	u-1	I	I	III	I	ToxoDB #65
Cot477	I	I	II	III	III	III	u-1	I	I	III	I	ToxoDB #65

nd : não determinado

^a At (Toxoplasmose aguda); Ct (Toxoplasmose cerebral); Cot (Toxoplasmose congênita); Ot (Toxoplasmose ocular) e número de código do paciente.

^b Os genótipos listados foram previamente identificados em isolados de galinhas (TgCkBr89) e gatos (TgCatBr82) (Dubey et al., 2008; Pena et al., 2008)

^c Os genótipos listados foram previamente identificados em isolados de galinhas (TgCkBr26 and TgCkBr69) (Dubey et al., 2008).

^d Os genótipos listados foram previamente de gatos (TgCatBr2) e galinhas (TgCkBr144). Este genótipo também é conhecido como tipo BrI (Pena et al., 2008). Todos do Brasil e publicados no ToxoDB (<http://toxodb.org/toxo/>).

Tabela 5: Genotipagem de isolados de *T. gondii* de 42 amostras clínicas humanas.

Amostra	5'+3'		SAG2	SAG3	BTUB	GRA6	c22-8	c29-2	L358	PK1	Apico	nº alelos	Material Clínico	Fase
	SAG1	SAG2												
22	I	I	II	II	III	III	I	I	I	nd	III	10	Líquido amniótico	Aguda gestante
28	I/II	I	Nd	nd	nd	nd	nd	II	II	nd	I	5	Líquido amniótico	Aguda gestante
29	I	I/III	Nd	III	III	nd	nd	nd	I	nd	I	6	Líquido amniótico	Aguda gestante
40	I/II	I/III	II	III	I	nd	nd	nd	I	nd	I	7	Sangue - RN	Toxoplasmose congênita
45	Nd	I	Nd	III	nd	nd	nd	II	nd	nd	nd	3	Líquido amniótico	Aguda gestante
46	Nd	I	Nd	III	nd	nd	nd	II	nd	nd	nd	3	Líquido amniótico	Aguda gestante
87	I	I	Nd	II	III	nd	I	II	Nd	nd	I	7	Líquido amniótico	Aguda gestante
101	I	I	Nd	III	I	III	I	II	I	nd	I	9	Líquido amniótico	Aguda gestante
105	Nd	I	Nd	III	nd	nd	nd	II	nd	nd	nd	3	Líquido amniótico	Aguda gestante
115	I	I	Nd	III	I	III	I	II	I	nd	I	9	Líquido amniótico	Aguda gestante
123	I	I	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	I	nd	nd	4	Sangue	Toxoplasmose cerebral
137	I	I/III	Nd	II	nd	III	nd	nd	I	nd	nd	6	Sangue	Toxoplasmose cerebral
147	I	I	Nd	III	nd	III	nd	II	II	nd	I	7	Líquido amniótico	Aguda gestante
148	Nd	I	II	III	nd	nd	nd	II	III	nd	I	6	Líquido amniótico	Aguda gestante
150	Nd	II	Nd	III	nd	nd	nd	II	nd	nd	nd	3	Sangue - RN	Toxoplasmose congênita
179	u-1	I	Nd	III	nd	nd	nd	II	II	nd	I	6	Líquido amniótico	Aguda gestante
265	I	I	II	III	nd	II	nd	II	I	nd	I	8	Líquido amniótico	Aguda gestante
280	I	II	Nd	III	nd	III	nd	II	I	nd	I	7	Líquido amniótico	Aguda gestante
352	I/II	II	Nd	III	nd	III	nd	II	nd	nd	nd	5	Sangue - RN	Toxoplasmose congênita
428	Nd	II	Nd	III	III	III	nd	nd	nd	nd	III	5	Sangue	Toxoplasmose cerebral
430	I	I	Nd	III	nd	I	nd	nd	nd	nd	nd	4	Sangue - RN	Toxoplasmose congênita
440	u-1	I/III	Nd	III	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3	Sangue	Toxoplasmose cerebral
442	I	I	Nd	III	III	nd	I	I	I	u-2	III	9	Sangue	Toxoplasmose cerebral
443	I	II	Nd	III	III	nd	nd	nd	I	nd	III	6	LCR	Toxoplasmose cerebral
451	Nd	I/III	Nd	nd	III	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2	LCR	Toxoplasmose cerebral
453	Nd	I	II	III	nd	nd	nd	nd	I	u-2	nd	5	LCR	Toxoplasmose cerebral
455	I	I	II	III	nd	nd	nd	nd	I	III	nd	6	LCR	Toxoplasmose cerebral
470	Nd	nd	Nd	III	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1	Sangue - RN	Toxoplasmose congênita
471	I	nd	Nd	III	nd	nd	I	nd	I	nd	nd	4	Sangue	Toxoplasmose cerebral
472	Nd	nd	Nd	III	nd	nd	nd	nd	nd	nd	III	2	Sangue	Toxoplasmose cerebral
480	Nd	II	Nd	III	nd	nd	nd	nd	I	nd	nd	3	LCR	Toxoplasmose cerebral
500	I	I	II	III	nd	III	nd	nd	nd	nd	nd	5	Sangue	Toxoplasmose cerebral
514	Nd	nd	Nd	III	nd	III	nd	nd	nd	nd	nd	2	Sangue	Toxoplasmose cerebral
518	Nd	nd	Nd	III	III	III	u-1	nd	I	nd	nd	5	Sangue	Aguda gestante
565	u-1	I/III	Nd	III	nd	III	nd	nd	nd	nd	I	5	Líquido amniótico	Aguda gestante
569	u-1	I/III	Nd	III	III	nd	nd	nd	nd	u-2	I	6	Sangue	Ocular
570	u-1	I/III	Nd	III	nd	nd	I	nd	I	I	I	7	Sangue	Ocular
605	I	I/II	Nd	II	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3	Sangue	Ocular
613	u-1	I	II	III	nd	III	nd	nd	nd	nd	nd	5	Sangue	Toxoplasmose cerebral
626	Nd	I	I	III	nd	I	nd	nd	nd	nd	nd	4	Sangue	Toxoplasmose cerebral
634	u-1	I	Nd	III	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3	Sangue	Ocular
635	u-1	I	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2	Sangue	Ocular

nd : não determinado RN: Recém - nascido

4. Discussão

Em estudo prévio utilizando a PCR-RFLP multiplex fez-se o uso de somente quatro marcadores moleculares, no qual 17% dos pacientes foram infectados com cepas que não foram genotipadas e 15% apresentaram cepas atípicas ou polimórficas (Ferreira et al., 2008). Contudo, estudos posteriores passaram a utilizar um maior número de marcadores revelando uma estrutura populacional bastante diversificada com um grande número de genótipos com linhagens típicas do Brasil (Dubey et al., 2007; Pena et al., 2008). Conclui-se que a tipificação genética baseada em um ou dois *loci* é limitada para detecção de cepas recombinantes. Assim sendo estudos baseados na genotipagem somente do *locus* SAG2 devem ser reconsiderados (Dardé, 2004; Su et al., 2006).

Neste trabalho, padronizou-se a PCR- RFLP com 11 marcadores moleculares isolando o DNA diretamente de amostras clínicas humanas, sendo o único no Brasil. Em outros trabalhos, as amostras clínicas foram inoculadas em camundongos para o isolamento do parasito (Dubey et al., 2007; Pena et al., 2008; Dubey et al., 2009a, Dubey et al., 2009b; Dubey et al., 2009c; Yai et al., 2009; Dubey et al., 2010a; Frazão-Teixeira et al., 2011).

A genotipagem de amostras de *T. gondii* de infecções clínicas é um desafio, devido à natureza crônica da infecção caracterizada por cistos teciduais latentes e ausência de parasitas circulantes. No entanto, quando a infecção esta ativa, pequenas quantidades de *T. gondii* podem estar presentes na corrente sanguínea e portanto, sendo possível a sua detecção. A PCR-RFLP multiplex tornou possível a genotipagem de múltiplos loci, usando pequenas quantidades de DNA extraídos de tecidos tais como líquido, líquido amniótico ou sangue, porém somente uma pequena porção de amostras clínicas puderam ser genotipadas. Nas genotipagens, a desvantagem em usar genes que se apresentam em cópia única, esta na baixa sensibilidade comparado com uma sequencia altamente repetitiva como a do gene B1 que encontra-se repetido em 35 cópias do genoma, utilizado nas cnPCR e qrtPCR (Burg et al., 1989; Su et al., 2010).

Entre as 62 amostras de DNA clínicas estudadas, 20 (32%) delas foram genotipadas com sucesso em 8 ou mais loci gênicos, as outras 42 (78%) obtiveram resultado em até 7 loci gênicos. O marcador SAG2 (5'- SAG2 e 3'- SAG2) que amplifica a região do gene SAG2, genotipou 91,9% das amostras clínicas, enquanto o marcador PK1 genotipou somente 32,2% das amostras mostrando ser o marcador menos sensível.

Dentre as 20 amostras, um paciente (Ct262) apresentou IgM e IgG negativas para toxoplasmose. Sabe-se que a maioria dos pacientes com toxoplasmose cerebral apresentam anticorpos IgG contra *T. gondii*, demonstrando ativação da infecção latente. Porém 5% a 10% destes pacientes apresentam sorologias negativas, dentre os quais se inclui o paciente Ct262 (Cohen, 1999; Vidal et al., 2004). Na amostra de sangue deste paciente, a PCR foi positiva, concordando com vários estudos que destacam a utilização da PCR em amostras de sangue para o diagnóstico da toxoplasmose cerebral e disseminada, e como importante contribuição diagnóstica (Dupoy-Camet et al., 1993; Priya et al., 2002; Colombo et al., 2005). Foi realizada também a demonstração de taquizoítos no tecido cerebral (biópsia) confirmando o diagnóstico da toxoplasmose.

Os três genótipos determinados nas 20 (32%) amostras clínicas foram previamente identificadas a partir de infecções em animais do Brasil, indicando a importância destes como reservatórios para infecção humana. O genótipo # 65 foi previamente identificado em galinhas (TgCkBr89) do Rio de Janeiro (Dubey et al., 2008) e em gatos (TgCatBr82) de São Paulo (Pena et al., 2008). Este genótipo difere em um único locus (SAG1) do principal genótipo BrIV do Brasil (Pena et al., 2008).

A alta frequência do genótipo # 65 é inesperada, dada a grande diversidade da população de *T. gondii* no Brasil. A dominância de um genótipo particular de *T. gondii* na toxoplasmose humana já foi relatado anteriormente. A análise de 88 isolados de *T. gondii* associados com a toxoplasmose em pacientes imunodeprimidos na França mostrou que a maioria destes casos foram causados pelo tipo clonal II (Ajzenberg et al., 2009). Isto reflete a alta prevalência de cepas do tipo II na Europa (Ajzenberg et al., 2002).

Recentes surtos de toxoplasmose humana também foram relatados na América do Sul (Demar et al, 2007;. Vaudaux et al, 2010). Em cada um destes casos, oocistos derivados de uma única cepa de *T. gondii* contaminando o meio ambiente são a provável origem da infecção. No entanto no estudo corrente, não existe nenhuma indicação de surto nos pacientes estudados, uma vez que estes tiveram toxoplasmose ativa diagnosticados no Estado de São Paulo em diferentes períodos.

Os demais genótipos identificados foram o genótipo # 71, previamente identificado em galinhas (TgCkBr26 e TgCkBr69) do Rio de Janeiro (Dubey et al., 2008) e o genótipo # 6 que é o principal tipo virulento BRI relatado anteriormente no Brasil (Pena et al., 2008). Foi também a causa do surto de toxoplasmose por via hídrica, em Santa Isabel do Brasil (Vaudaux et al., 2010). Os genótipos # 71 e # 6 foram isolados de pacientes com toxoplasmose cerebral difusa e severa. Embora raro, existem alguns relatos anteriores sobre a apresentação da toxoplasmose humana e genótipos do parasita, principalmente relacionadas com genótipos não-clonais da América do Norte (Grigg et al, 2001b), Europa (Bossi e Bricaire, 2004.; Delhaes et al. 2010) e Brasil (Khan et al., 2006). Além disso, um estudo recente mostrou que o *T.gondii* provoca doença ocular mais grave em crianças infectadas congenitamente no Brasil em comparação com a Europa, e sugerem que as diferenças podem ser devido à infecção com genótipos mais virulentos do parasita que predominam no Brasil, mas que raramente são encontrados na Europa (Gilbert et al., 2008).

Um estudo realizado em Fernando de Noronha indicou que isolados de *T. gondii* provenientes de galinhas caipiras apresentaram os genótipos clonais que são dominantes na Europa e América do Norte. Este resultado é inesperado, já que isolados do Brasil são fenotipicamente e geneticamente diferentes dos isolados de outros países (Dubey et al.; 2010b). Regiões geográficas e diferentes hospedeiros contribuem para variações genotípicas. Deste modo, novos estudos são necessários, pois a cada novo estudo que se realiza, novos perfis genotípicos são encontrados (Grigg et al., 2001a; Lehmann et al., 2006; Dubey e Su, 2009).

Este estudo mostrou que é possível genotipar cepas de *T. gondii* diretamente de amostras clínicas de pacientes humanos por multilocus PCR-RFLP. Os resultados deste estudo revelaram uma alta frequência do genótipo # 65. Isso pode ser explicado por duas possibilidades: i. O genótipo # 65 é responsável por grande parte das infecções humanas, em São Paulo, Brasil, ou ii. O genótipo # 65 é altamente virulento para o homem e pode levar a alta carga parasitária nos tecidos do que outros genótipos.

6. Conclusões

1. Este estudo mostrou que é possível genotipar cepas *T. gondii* diretamente de amostras clínicas humanas por multilocus PCR-RFLP.

2. O marcador SAG2 (5'- SAG2 e 3'- SAG2) foi o mais sensível genotipando 91,9% das amostras clínicas, enquanto o marcador PK1 foi o menos sensível genotipando somente 32,2% das amostras clínicas.

3. Predominância do genótipo # 65 em pacientes com toxoplasmose diagnosticados no estado de São Paulo.

7. Referências Bibliográficas

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: 684-9.

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: 1185-96.

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

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

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

Al-Kappany YM, Rajendran C, Abu-Elwafa SA, Hilali M, Su C, Dubey JP. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates in Egyptian feral cats reveals new genotypes. J Parasitol. 2010;96:1112-4.

Amato Neto V, Medeiros ESA, Levi GC, Duarte MIS. Toxoplasmose.4.ed. São Paulo : Sarvier; 1995.p.154.

Amato NV, Marchi CR. Toxoplasmose. In: Cimerman B & Cimerman S, editors. Parasitologia Humana e seus Fundamentos Gerais. 2 ed. São Paulo: Atheneu;160-77, 2002.

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; 28:61-9.

Bahia-Oliveira LMG, 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.

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.

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.

Bossi P., Bricaire F., 2004. Severe acute disseminated toxoplasmosis. Lancet. 364:579.

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: 3465-8.

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; 27:1787-92.

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: 729-30.

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: 5044-7.

Costa-Silva TA, Meira CS, Ferreira IM, Hiramoto RM, Pereira-Chiocola VL. Evaluation of immunization with tachyzoite excreted-secreted proteins in a novel susceptible mouse model (A/Sn) for *Toxoplasma gondii*. Exp Parasitol. 2008 ;120:227-34.

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

Couto JCF, Leite JM. Sinais Ultra-sonográficos em fetos portadores de toxoplasmose congênita. RBGO. 2004; 26: 377-82.

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

Dardé ML, Bouteille B, Pestre-Alexandre M. Differentiation iso-enzymatique de 7 souches de *Toxoplasma gondii* par iso-electrofocalisation en gel de polyacrylamide. Bull Soc Fr Parasitol 1987; 5: 33–9.

Dardé ML, Bouteille B, Pestre-Alexandre M. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. J Parasitol. 1992; 78: 731-4.

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

Dardé ML, Bouteille B, Pestre-Alexandre M. Isoenzyme characterization of seven strains *Toxoplasma gondii* by isoelectrofocusing polyacrylamide gels . J Parasitol. 1998; 39: 551-8.

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

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

Delhaes L, Ajzenberg D, Sicot B, Bourgeot P, Dardé ML, Dei-Cas E, Houfflin-Debarge V. Severe congenital toxoplasmosis due to a *Toxoplasma gondii* strain with an atypical genotype: case report and review. Prenat Diagn. 2010; 30:902-5.

De A dos Santos CB, de Carvalho AC, Ragozo AM, Soares RM, Amaku M, Yai LE, et al. First isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from finishing pigs from Sao Paulo State, Brazil. Vet Parasitol. 2005; 131: 207-11.

De Moura L, Bahia-Oliveira LMG, F, Wada MY, Jones JL, Tubol, SH, Carmo EH, et al. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. Emerg Infect Dis. 2006; 12: 326-9.

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

De Rocher A, Hagen CB, Froehlich GE, Feagin GE, Parsons M. Analysis of targeting sequences demonstrates that trafficking to the *Toxoplasma gondii* plastid branches off the secretory system. *J Cell Science*. 2000; 113, 3969-77.

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. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*. 1998; 7: 1019-24.

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

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. *Vet Parasitology*. 2003a; 117: 229-34.

Dubey JP, Graham DH, Silva DS, Lehmann T, Bahia - Oliveira LMG. *Toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens from Rio de Janeiro, Brazil: mouse mortality, genotype, and oocysts shedding by cats. J Parasitol. 2003b; 89:851-3.

Dubey JP, Graham DH, Dahl E, Sreekumar C, Lehmann T, Davis MF, Morishita TY. *Toxoplasma gondii* isolates from free-ranging chickens from the United States. J Parasitol. 2003c ; 89:1060-2.

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. 2004a; 90: 721-6.

Dubey JP, Salant H, Sreekumar C, Dahl E, Vianna MC, Shen SK, et al. High prevalence of *Toxoplasma gondii* in a commercial flock of chickens in Israel, and public health implications of free-range farming. Vet Parasitol. 2004b; 121:317-22.

Dubey JP, Gennari SM, Labruna MB, Camargo LM, Vianna MC, Marcet PL, Lehmann T. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free range-chickens from Amazon, Brazil. J Parasitol. 2006; 92:36-40.

Dubey JP, Sundar N, Gennari SM, Minervino AH, Farias NA, Ruas JL, et al. Biologic and genetic comparison of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from the northern Pará state and the southern state Rio Grande do Sul, Brazil revealed highly diverse and distinct parasite populations. Vet Parasitol. 2007; 143: 182-8.

Dubey JP. The history of *Toxoplasma gondii* – the first 100 years. J Eukaryot. 2008; 55 :46-475.

Dubey JP, Velmurugan GV, Chockalingan A, Pena HF, de Oliveira LN, Leifer CA, et al. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil. 2008; Vet Parasitol. 157: 299–305.

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

Dubey JP, Velmurugan GV, Morales JA, Arguedas R, Su C. Isolation of *Toxoplasma gondii* from the keel-billed toucan (*Ramphastos sulfuratus*) from Costa Rica. J Parasitol. 2009b; 95:467-8.

Dubey JP, Moura L, Majumdar D, Sundar N, Velmurugan GV, Kwok OC, et al. Isolation and characterization of viable *Toxoplasma gondii* isolates revealed possible high frequency of mixed infection in feral cats (*Felis domesticus*) from St Kitts, West Indies. Parasitology. 2009c;136:589-94.

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

Dubey JP, Rajendran C, Costa DG, Ferreira LR, Kwok OC, Qu D, et al. New *Toxoplasma gondii* genotypes isolated from free-range chickens from the Fernando de Noronha, Brazil: unexpected findings. Parasitol. 2010b; 96:709-12.

Dubey, JP, Su, C. Population biology of *Toxoplasma gondii*: what's out and where did they come from. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104:190-5.

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.

Fekkar A, Ajzenberg D, Bodaghi B, Touafek F, Le Hoang P, Delmas J, et al. Direct genotyping of *Toxoplasma gondii* in ocular fluid samples from 20 patients with ocular toxoplasmosis: predominance of type II in France. J Clin Microbiol. 2011; 49:1513-7.

Ferguson DJ. *Toxoplasma gondii* and sex: essential or optional extra? Trends of Parasitology. 2002; 18: 355-9.

Ferreira MS. Infections by protozoa in immunocompromised hosts. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000; 95 (suppl I): 159-62.

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

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

Fondon JW 3rd, Garner HR. Molecular origins of rapid and continuous morphological evolution. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101:18058-63.

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: 2639-41.

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

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

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: 1566-70.

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

Gattás VL, Nunes EM, Soares ALB, Pires MA, Pinto PLS, Andrade Jr, HF. Acute toxoplasmosis outbreak at Campus of the University of São Paulo related to food or water oocyst contamination. In, International Conference on Emerging Infectious Diseases. 2000; Atlanta, Georgia, USA, p.135.

Gilbert RE, Peckham CS. Prenatal screening for *Toxoplasma* infection. In: Joyson HM, Wreghitt TG (eds.), *Toxoplasmosis: A comprehensive clinical guide.* Cambridge: Cambridge University Press; 2001. p. 214-240.

Gilbert R. Screening option in the management of congenital toxoplasmosis. *Clin Lab Intern.* 2004; 28: 8-12.

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

Glasner PD, Silveira C, Kruszon-Moran D, Martins MC, Burnier Jr M, Silveira S, et al. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in Southern Brazil. *Am J Ophthalmol.* 1992; 114: 136-44.

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: 161-5.

Grigg ME, Ganatra J, Boothroyd JC, Margolis TP. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* 2001b; 184: 633-9.

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

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

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

Howe DK; Summers BC, Sibley LD. Acute virulence in mice is associated with markers on chromosome VIII in *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun.* 1996; 64: 5193-8.

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: 1411-14.

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

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

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: 695-9.

Holliman RE. Toxoplasmosis and the acquired immune deficiency syndrome. J Infect. 1988; 16: 121-8.

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: 680-6.

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

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: 2980-92.

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

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

Khan A., Fux B, Su C, Dubey JP, Darde ML, Ajioka JW, et al. Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. PNAS. 2007; 104: 14872–77.

Khan A, Dubey JP, Su C, Ajioka JW, Rosenthal BM, Sibley LD. Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. Int J Parasitol. 2011; 41:645-55.

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

Kissinger JC, Gajria B, Li L, Pausen IT, Roos DS. ToxoDB: accessing the *Toxoplasma gondii* genome. Nucl Acids Res. 2003; 31: 234-6.

Köhler S, Delwiche CF, Denny PW, Tilney LG, Webster P, Wilson RJ, et al. A plastid of probable green alga origin in Apicomplexa parasites. Science. 1997; 275:1485-9.

Kong JT, Grigg ME, Uyetake L, Parmley S, Boothroyd JC. Serotyping of *Toxoplasma gondii* infections in humans using synthetic peptides. J Infect Dis. 2003;187:1484-95.

Lehmann T, Blackston CR, Parmley SF, Remington JS, Dubey JP. Strain typing of *Toxoplasma gondii*: comparison of antigen-coding and housekeeping genes. J. Parasitol. 2000; 86:960-71.

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

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

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.

Levine ND. Taxonomy of *Toxoplasma*. J Protozol. 1977; 66: 830-34.

Levine ND, Corliss JO, Cox FEG, Deroux G, Grain J, Honigberg BM, et al. A newly revised classification of the Protozoa. J Protozol.1980; 27: 37-58.

Liesenfeld O, Wong SY, Remington JS. Toxoplasmosis in the setting of AIDS. In: Bartlett JG, Merigan TC, Bolognesi D, eds. Textbook of AIDS medicine, 2 ed. Baltimore: Williams e Wilkins; 1999.p. 225-59.

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: 1248-53.

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: 218-22.

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

Luft BJ, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis. Clin. Infect. Dis. 1992; 15: 211-22.

McFadden GI, Reith ME, Munholland J, Lang-Unnasch N. Plastid in human parasites. *Nature*. 1996; 381:482.

Mesquita RT., Vidal JE., Pereira-Chiocola VL. Molecular diagnosis of cerebral toxoplasmosis: comparing markers that determine *Toxoplasma gondii* by PCR in peripheral blood from HIV-infected patients. *Brazilian J Infect Dis*. 2010a; 14, 346-50.

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

Montoya JG, Remington JS. Toxoplasmic chorioretinitis in the setting of acute acquired toxoplasmosis. *Clin Infect Dis*. 1996; 23: 277-82.

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

Morisset S, Peyron F, Lobry JR, Garweg J, Ferrandiz J, Musset K, et al. Serotyping of *Toxoplasma gondii*: striking homogeneous pattern between symptomatic and asymptomatic infections within Europe and South America. *Microbes Infect*. 2008;10:742-7.

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: 941-7.

Neves JM, Nascimento LB, Ramos JGL, Martins-Costa SH. Toxoplasmose na gestação. *Rev Bras de Ginec e Obst*. 1994;16:197-202.

Nicolle C.; Manceaux L. Sur une infection a corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *C R Acad Sci (Paris)*. 1908; 147: 763-6.

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. J Clin Microbiol. 2006; 44: 1382-89.

Owen MR, Trees AJ. Genotyping of *Toxoplasma gondii* associated with abortion in sheep. J Parasitol. 1999; 85: 382-4.

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

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

Pereira-Chioccola VL, Vidal JE, Su C. *Toxoplasma gondii* infection and cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients. Future Microbiol. 2009; 4:1363-79.

Pfefferkorn LC, Pfefferkorn ER. *Toxoplasma gondii*: genetic recombination between drug resistant mutants. Exp Parasitol. 1980; 50:305-16.

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

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, Desmots 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: 941-5.

Remington JS, McLeod R, Thulliez P, Desmots G. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein JO. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant.* 6^o ed. Philadelphia: WB Saunders; 2005.p947-1091.

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

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

Sibley LD. *Toxoplasma gondii*: perfecting an intracellular life style. *Traffic.* 2003; 4:581- 6.

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

Sousa S, Canada N, Correia da Costa JM, Dardé ML. Serotyping of naturally *Toxoplasma gondii* infected meat-producing animals. *Vet Parasitol.* 2010; 169:24-8.

Sreekumar C, Graham DH, Dahl E, Lehmann T, Raman M, Bhalerao DP, et al. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from India. *Vet Parasitol.* 2003; 118: 187-94.

Su C, Evans D, Cole RH, Kissinger JC, Ajioka Jw Sibley LD. Recent expansion of *Toxoplasma* though enhanced oral transmission. *Science.* 2003; 299: 414-6.

Su C, Zhang X., Dubey JP. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. *Int J Parasitol.* 2006; 36, 841-8.

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

Suzuki Y. Immunopathogenesis of cerebral toxoplasmosis. *J Infect Dis.* 2002; 186: 234-40.

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

Tibayrenc M. Populations genetics of parasitic protozoa and others microorganisms. *Adv Parasitol.* 1995; 36: 47-115.

Tibayrenc M. Towards a unified evolutionary genetics of microorganisms. *Annual Review.* 1996; 50: 401-27.

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: 350-1.

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

Vidal JE, Colombo FA, de Oliveira AC, Focaccia R, Pereira-Chiocola VL. PCR assay using cerebrospinal fluid for diagnosis of cerebral toxoplasmosis in Brazilian AIDS patients. *J Clin Microbiol.* 2004; 42 :4765-8.

Vidal, JE, Hernandez AV, Penalva de Oliveira AC, Dauar R, Barboza SP, Focaccia R. Cerebral toxoplasmosis in HIV-Positive patients in Brazil: clinical features and predictors of treatment response in the HAART era. *AIDS Patient Care STDS.* 2005; 19: 840-8.

Villard O, Filisetti D, Roch-Deries 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: 3537-41.

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

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. *J Vet Med Sci.* 2006; 68: 1105-07.

8. Anexos

Anexo 1: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.



FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

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

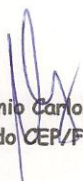
Parecer n.º 319/2008

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Protocolo n.º 4533/2008 sob a responsabilidade de Vera Lucia Pereira Chioccola com o título "Genotipagem de cepas polimórficas de *Toxoplasma gondii* provenientes de pacientes com Toxoplasmose" está de acordo com a resolução CNS 196/96 e foi aprovado por esse CEP.

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

São José do Rio Preto, 11 de agosto de 2008.


Prof. Dr. Antonio Carlos Pires
Coordenador do CEP/FAMERP

Anexo 2: Ferreira IM, Vidal JE, de Mattos C de C, de Mattos LC, Qu D, Su C, Pereira-Chiocola VL. *Toxoplasma gondii* isolates: Multilocus RFLP-PCR genotyping from human patients in Sao Paulo State, Brazil identified distinct genotypes. Exp Parasitol. 2011; 129:190-5.