

Inara Bastos da Silva

**Perfil genotípico de isolados de *Toxoplasma gondii*
provenientes de pacientes com toxoplasmose
disseminada**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração:
Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientadora:

Profa. Dra. Vera Lucia Pereira-Chioccola

SÃO PAULO

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

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

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Silva, Inara Bastos da.

Perfil genotípico de isolados de *Toxoplasma gondii* provenientes de pacientes com toxoplasmose disseminada / Inara Bastos da Silva. – 2016.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2016.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientação: Profa. Dra. Vera Lúcia Pereira-Chiocola.

1. Toxoplasma. 2. Toxoplasmose. 3. Genótipo. 4. HIV 5. Epidemiologia Molecular.

SES/CCD/CD-328/2016

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer e pedir perdão a Deus que mesmo eu sendo tão ingrata nunca se esquece de mim, obrigada meu Deus por todos os seus planos em minha vida, eu sei que o Senhor traçou um destino maravilhoso para mim. Agradeço também a minha Mãe a quem sempre me dá todo apoio principalmente quando me sinto desanimada a continuar e seguir em frente tento ser melhor a cada dia para orgulhar você e a meu Pai, me desculpe se ainda não consegui, gostaria que vocês fossem eternos, sei que ainda vou conseguir retribuir tudo que vocês já me deram e todas as oportunidades que proporcionaram a mim e a meu irmão, e agradeço também a Matheus que sempre com seu jeito “ogro” demonstra seu amor e tenta me proteger.

Agradeço a Dra Vera que me deu a oportunidade de desenvolver esse projeto, e sempre age como uma mãe para todos nós. Gostaria de agradecer a todos meus amigos que a vida me deu e que sempre me proporcionam momentos gostosos e descontraídos ou também de muito estresse (rs): Duda, Carol, Ana Luíza, Robson, Gabrielle, Rebeca, Mel, Lika, Moisa, Gui, Bruno, Amanda, Família Adolfo Lutz: Cidinha, Luiz Fernando, Marta, Lilian, Cris, Tatiana (companheira de FUNDAP), Kate, Ju Tonini, Gabi Motoie, Thaís, Antônio, Bete, Sansão, Dr Pedro, Jé Pretinho, Ricardão, Ricardinho, Lásaro, Daise, Valeria e todos que contribuíram para a realização desse trabalho e também com meu desenvolvimento profissional e pessoal, sinto saudades de nossas idas a Paulista, ragazzo e nossos cafés da tarde, vocês estão para sempre em meu coração. Na reta final Deus me presenteou com um amor, Obrigada Ley, você faz meus dias mais felizes e repletos de luz.

E por último, mas não menos importante gostaria de agradecer à Dra Fátima e a todos da pós-graduação, e também ao apoio financeiro da CAPES.

RESUMO

A toxoplasmose é uma infecção cosmopolita com cerca de 10-20% dos indivíduos infectados desenvolvendo a forma clínica. O estudo de populações de *Toxoplasma gondii* é de importância médica e epidemiológica. Estudos anteriores correlacionam a progressão e a severidade das formas sintomáticas da toxoplasmose com os genótipos de *T. gondii*.

Este estudo analisou amostras de necropsias de uma coorte de 15 pacientes que foram a óbito por desenvolverem a toxoplasmose disseminada. Foi um estudo retrospectivo, na qual os dados clínico-laboratoriais eram conhecidos. A hipótese era que estes pacientes poderiam albergar parasitas altamente virulentos pela condição em que eles foram a óbito. As moléculas de DNA isoladas das necropsias foram utilizadas para determinar as características genotípicas de *T. gondii*.

O objetivo foi genotipar isolados de *T. gondii*, por PCR-RFLP em "Multilocus", diretamente de amostras DNA de amostras clínicas de pacientes que foram a óbito por toxoplasmose disseminada.

Amostras de 15 pacientes com AIDS, com diagnóstico positivo para toxoplasmose disseminada foram utilizadas para a extração de DNA e PCR. Um total de 30 amostras foi analisado. As genotipagens de *T. gondii* foram realizadas pela PCR-RFLP em multilocus utilizando-se 12 marcadores moleculares (SAG1, 5' e 3'SAG2, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1 e APICO). Os genótipos sugestivos encontrados foram comparados com os existentes no site <http://toxodb.org/>. Todos os 15 pacientes tinham tido toxoplasmose cerebral prévia. As 30 amostras clínicas foram genotipadas com sucesso em 8 ou mais loci gênicos, mas não foram observadas cepas diferentes em um mesmo paciente. Destas, 6 genótipos sugestivos foram identificados. De acordo com as análises realizadas no Toxo DB, um deles é o genótipo sugestivo Toxo DB 11 (Paciente 11). Este genótipo foi identificado previamente em diferentes animais em outros estudos. Estudos anteriores demonstraram que é um genótipo virulento em animais experimentais. Os outros 5 genótipos sugestivos identificados ainda não foram descritos. O genótipo TgHuDis1 foi o mais frequente sendo detectado em 8 pacientes. Os genótipos

TgHuDis3 e TgHuDis5 foram presentes em dois pacientes cada. Os demais (TgHuDis2 e TgHuDis4) foram identificados em um paciente cada.

Este estudo demonstrou que foi possível realizar genotipagem de *T. gondii* a partir de amostras clínicas provenientes de tecidos parafinados e estocados por muito tempo. O isolamento das cepas em animais experimentais não foi possível. Assim, o uso de animais experimentais não foi necessário, atendendo as boas práticas da pesquisa e ética animal, onde animais de laboratório devem ser utilizados apenas quando são necessários.

ABSTRACT

Toxoplasmosis is a cosmopolitan infection. Around 10-20% of infected individuals develop the clinical form. The study of *Toxoplasma gondii* populations is medical and epidemiological importance. Previous studies correlated the progression and severity of the symptomatic forms in toxoplasmosis with *T. gondii* genotypes.

This study analyzed necropsy samples from a cohort of 15 patients who died due to develop disseminated toxoplasmosis. In this retrospective study the clinical and laboratory data from patients were known. The hypothesis was that these patients were infected with highly virulent parasites by the condition in which they died. DNA molecules isolated from patient necropsies were used to determine *T. gondii* genotypes.

The present study was aimed to genotype *T. gondii* isolates by PCR-RFLP -Multilocus, directly in DNA extracted from clinical samples from patients who died by disseminated toxoplasmosis.

Samples from 15 AIDS patients with diagnosis for disseminated toxoplasmosis were used for DNA extraction and PCR.

A total of 30 samples was analysed. *T. gondii* genotyping was performed by PCR-RFLP multilocus using 12 molecular markers (SAG1, 5' and 3'SAG2, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, and PK1 APICO). The suggestive genotypes were compared with existing in site <http://toxodb.org/>. The 15 patients had had previous cerebral toxoplasmosis at least 6 months before the disseminated toxoplasmosis episode. The 30 clinical samples were genotyped successfully in 8 or more gene loci, but were not observed different strains in the same patient.

Six suggestive genotypes were identified. According to ToxoDB analysis, one of them was Toxo DB genotype #11 (Patient 11). This suggestive genotype was previously identified in different domestic animals in other studies. Previous studies had shown that genotype #11 was virulent in experimental animals. The other five suggestive genotypes identified in 14 patients were not described. TgHuDis1 was the most frequent and was determined in 8 patients. TgHuDis3 and TgHuDis5 were identified in two

patients each. TgHuDis2 and TgHuDis4 have been identified in one patient each.

This study demonstrated that it was possible to perform *T.gondii* genotyping in DNA extracted from brain and lung samples in paraffin embedded and stored for long time. The *T. gondii* strain isolation in experimental animals has not been possible. Thus, the use of experimental animals was not necessary in view of the good practices of research and animal ethics, where laboratory animals should only be used when they are needed.

ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS - Síndrome da imunodeficiência adquirida

CD4 - Grupamento de diferenciação 4 ou “Cluster of Differentiation”

CDC - “Centers for Disease Control”

D.O. - Densidade ótica

dATP - 2'- desoxiadenosina - 5'- trifosfato

dCTP - 2'- desoxicitosina - 5'- trifosfato

dGTP - 2'- desoxiguanosina - 5'- trifosfato

DNA - Ácido desoxirribonucléico

dTTP - 2'- desoxitimidina - 5'- trifosfato

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra - acético

ELISA – “Enzyme-linked Immunosorbent Assay” – ensaio imunoenzimático

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

RIFI - Imunofluorescência indireta

IgA – imunoglobulina da classe A

IgE – imunoglobulina da classe E

IgG - Imunoglobulina da classe G

IgM - Imunoglobulina da classe M

Kb - Kilobase

LCR - Líquido cefalorraquidiano

M - Molar

mg – miligrama(s)

mL – mililitro(s)

mM - milimolar

pb - Pares de base

PCR- Reação em cadeia da polimerase

pH - concentração de hidrogênio iônico

qPCR - 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

TgHuDis “*T. gondiiHumanDisseminated*” – *Toxoplasma gondii* –
humano - disseminada

μL – Microlitro

μm - micrometros

μM - Micromolar

UV – Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Esquema da ultraestrutura de taquizoíta de <i>T.gondii</i>	2
Figura 2 – Taquizoítos (A); Cisto contendo bradizoítos (B) e Oocisto esporulado (C)	2
Figura 3 - Ciclo biológico de <i>T.gondii</i>	3
Figura 4 – Ciclo de Transmissão de <i>T.gondii</i>	5
Figura 5 - Tomografia computarizada na toxoplasmose e AIDS.....	10
Figura 6 – Mapa de genômico de <i>T. gondii</i>	18
Figura 7 – Esquema das sequencias da PCR-RFLP por marcador genético ..	35
Tabela 1 - Marcadores moleculares e seus respectivos genes e localização utilizados na genotipagem de isolados de <i>T.gondii</i>	36
Tabela 2 - Iniciadores utilizados no primeiro e segundo PCRs, e as enzimas de restrição.....	37
Figura 8 - Produtos de PCR amplificados das amostras de DNA extraídas de blocos de parafina.....	41
Figura 9: Perfil de PCR-RFLP de produtos dos gene SAG1 e SAG2.....	42
Figura 10 - Perfil de PCR-RFLP de produtos dos gene SAG2 (5'-SAG2 e 3'-SAG2 e SAG3.....	43
Figura 11 - Perfil de PCR-RFLP de produtos dos gene GRA6 e BTUB.....	44

Figura 12 - Perfil de PCR-RFLP de produtos dos gene C22-8 e C29-2.....	45
Figura 13 - Perfil de PCR-RFLP de produtos dos gene L358, PK1 e Apico.....	46
Figura 14 Amostra representativa de produto de PCR do gene B1 de <i>T. gondii</i> quando submetido à eletroforese em gel de agarose a 2%.....	47
Tabela 3 - Genótipos de <i>T. gondii</i> determinados em 30 amostras clínicas humanas parafinadas.....	49
Tabela 4: Resultado clínico e laboratorial dos 15 pacientes com os isolados genotipados.....	50

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i>	1
1.1.1. Ciclo biológico.....	3
1.1.2. Transmissão.....	5
1.2. Toxoplasmose.....	6
1.2.1. Toxoplasmose ocular.....	7
1.2.2. Toxoplasmose congênita.....	8
1.2.3. Toxoplasmose cerebral.....	9
1.2.4. Toxoplasmose disseminada.....	10
1.3. Diagnóstico laboratorial.....	12
1.4. A contribuição de estudos em tecidos formolizados e conservados em blocos de parafina.....	15
1.5. Caracterização biológica de <i>T.gondii</i>	16
1.6. Caracterização molecular de <i>T.gondii</i>	17
1.6.1. Métodos de tipagem.....	21
1.7. Justificativa.....	25
2. OBJETIVOS	28
2.1. Objetivo geral.....	28
2.2. Objetivos específicos.....	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1. Considerações éticas.....	29
3.2. Amostras clínicas.....	29
3.2.1. Coleta de amostras clínicas.....	29
3.2.1.1. Fragmentos de necropsias de pacientes.....	29
3.3. Cepas de <i>T.gondii</i>	30
3.3.1. Obtenção das cepas RH, ME-49 e VEG.....	30
3.4. Diagnóstico clínico e histopatológico.....	31
3.5. Diagnóstico molecular.....	31
3.5.1. Extração de DNA.....	31
3.5.1.1. Em tecidos incluídos em bloco de parafina.....	31
3.5.1.2. <i>T. gondii</i> – taquizoítos provenientes de cultura.....	32
3.5.2. PCR.....	33
3.5.2.1. Eletroforese em gel de agarose.....	34
3.6. Genotipagem por PCR-RFLP.....	34
3.6.1. 1º PCR (Multiplex).....	35
3.6.2. 2º PCR (ou nested PCR).....	39
3.6.3. RFLP.....	39

3.7.2. Isolados de <i>T.gondii</i> dos pacientes.....	39
3.8. Análise de dados.....	40
4. RESULTADOS.....	41
4.1. Validação da extração de DNA de blocos de parafina.....	41
4.2. Validação das reações de genotipagem.....	42
4.3. Diagnóstico das amostras clínicas.....	42
4.4. Caracterização genotípica das amostras clínicas.....	43
5. DISCUSSÃO.....	46
6. CONCLUSÕES.....	49
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
8. ANEXOS.....	58
8.1. Parecer do Comitê de Ética Humana do Instituto Adolfo Lutz (CEPIAL).....	68
8.2. Artigo.....	70

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii é um protozoário intracelular obrigatório com distribuição mundial, podendo atingir mais de 60% da população em determinados países, e capacidade de infectar a maioria dos animais de sangue quente, incluindo aves e animais silvestres, domésticos e o homem (Neves, 2005).

Os primeiros relatos do parasita ocorreram em 1908, quando os pesquisadores Nicolle e Manceaux descobriram o parasita nas células mononucleares do fígado e baço de um pequeno roedor africano (*Ctenodactylus gundi*) em Túnis, no norte da África. Na mesma época no Brasil, Afonso Splendore encontrou *T. gondii* parasitando coelhos em um laboratório na Faculdade de Medicina de São Paulo. (Neves, 2005; Dubey, 2008a).

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), Gênero *Toxoplasma* e Espécie *Toxoplasma gondii* (Nicolle e Manceaux, 1909).

T. gondii é caracterizado pela presença do complexo apical composto por organelas secretórias especializadas como: roptrias, micronemas e grânulos densos; e também de elementos do citoesqueleto, que são 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. Embora esta organela tenha sido identificada morfológicamente desde a década de 1960, apenas recentemente descobriu-se tratar-se de um plasmídeo (Köhler et al., 1997; De Rocher et al., 2000) (Figura 1).

T. gondii pode ser encontrado em vários tecidos e células e apresenta uma morfologia múltipla, dependendo do hábitat e do estágio evolutivo (Neves, 2005).

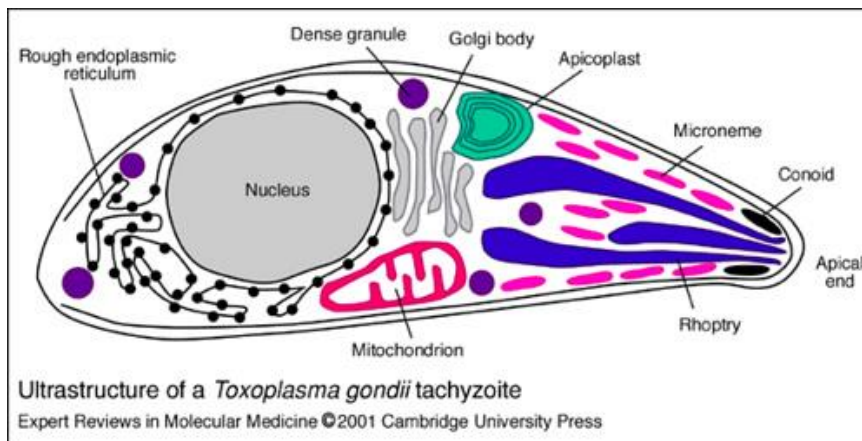


Figura 1. Esquema da ultraestrutura de taquizoíto de *T.gondii*
Fonte: <https://www.flickr.com/photos/50548145@N08/4635259539/>

As formas infectantes do parasita durante o ciclo são: taquizoítos (trofozoítos) (Figura 2A), cistos contendo bradizoítos (Figura 2B) e oocistos contendo esporozoítos (Figura 2C) (Dubey, 1998).

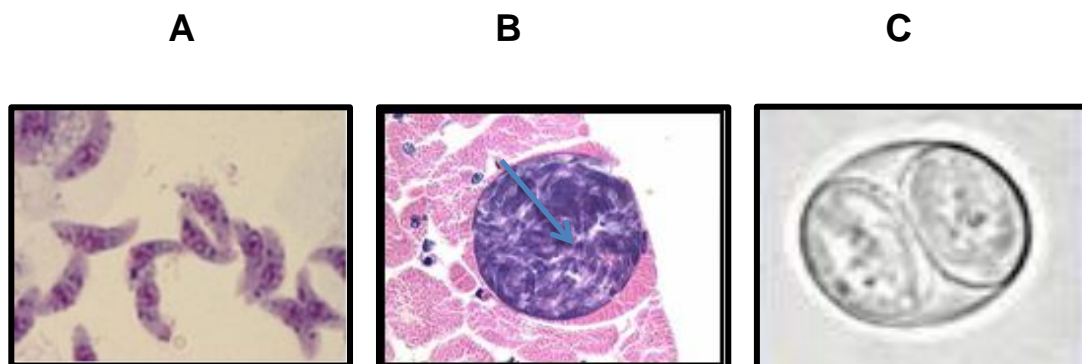


Figura 2. (A) Taquizoítos em líquido peritoneal de camundongo, coloração de Giemsa 1000x. Fonte: <http://www.maternofetal.net/6toxoplasmosis.html>. (B) Cisto contendo bradizoítos encistados em músculo, coloração Giemsa 1000x. Fonte: <http://pt.slideshare.net/FeehOliiveeiira/toxoplasnose-24635275>. (C) Oocisto esporulado em contraste diferencial de interferência 100x. Fonte: <http://pt.slideshare.net/FeehOliiveeiira/toxoplasnose-24635275>

Os taquizoítos são encontrados durante a fase aguda da infecção, sendo também denominados de forma proliferativa ou trofozoíto. Foi a primeira forma descrita e sua morfologia em forma de arco deu o nome ao gênero. Apresenta forma grosseira de banana ou meia lua, com uma de suas pontas mais afilada, medindo cerca de 2 x 6 μm , com o núcleo podendo ser mais ou menos central. É a forma móvel de multiplicação rápida e quando corado por

Giemsa seu citoplasma apresenta-se azulado e seu núcleo vermelho (Figura 2A).

Os bradizoítos são encontrados nos tecidos (cérebro, coração, pulmão, retina). Na maioria das vezes ocorre na fase crônica da infecção podendo também ser denominado de cistozoíto, porque forma cistos teciduais. Essa forma morfológica se multiplica lentamente dentro do cisto por endodiogenia. A parede dos cistos é resistente e elástica para isolar os bradizoítos da ação do sistema imunológico do hospedeiro. O tamanho dos cistos pode atingir 200 µm e permanecer viáveis nos tecidos por vários anos (Figura 2B). São mais resistentes que a forma de multiplicação rápida (taquizoítos) (Neves, 2005).

Os oocistos (Figura 2C) são formas de resistência produzidas nas células intestinais dos felídeos e eliminadas junto com as fezes. São formas esféricas, apresentando parede dupla resistente e medindo em torno de 11,0 a 12,5 µm. No meio ambiente, após esporulação, apresentam dois esporocistos, cada um com quatro esporozoítos (Neves, 2005).

1.1.1. Ciclo biológico

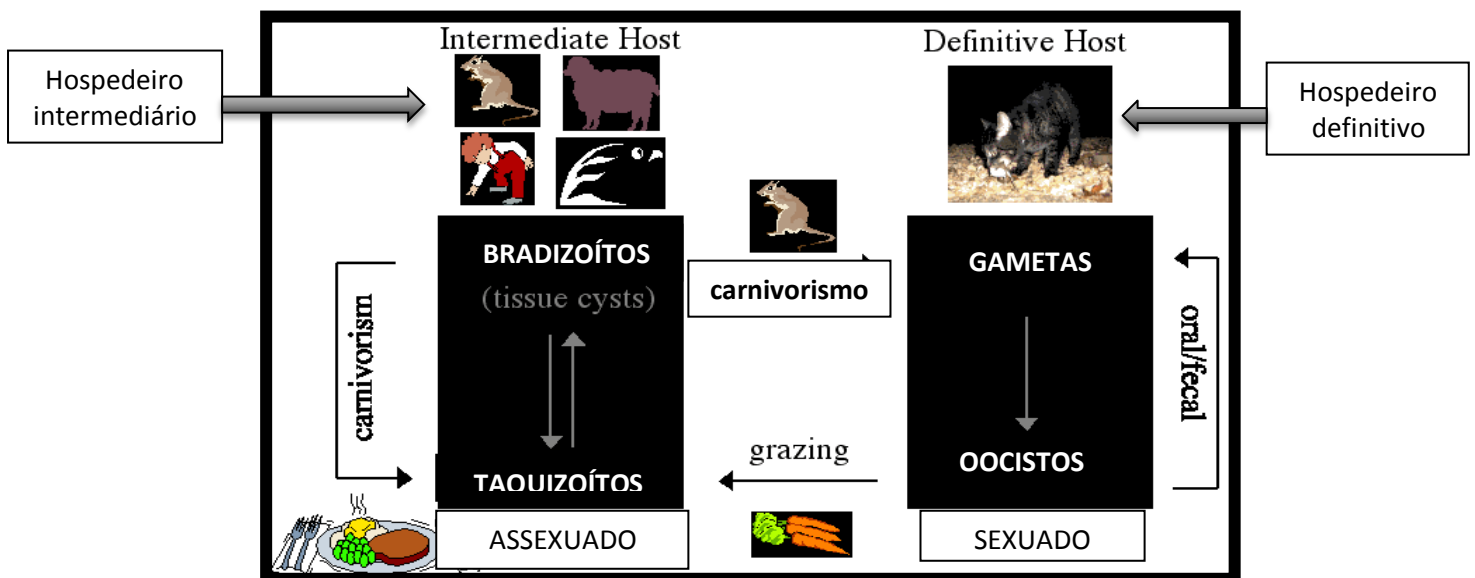


Figura 3. Ciclo biológico de *T. gondii*, hospedeiro intermediário e definitivo.

Fonte: <https://vetleme.files.wordpress.com/2008/05/toxoplasmosse.pdf>

O ciclo biológico de *T. gondii* apresenta duas fases distintas (Figura 3). A assexuada, que ocorre nos tecidos e nos linfonodos de diversos hospedeiros, inclusive os felídeos; e a sexuada ou coccidiana, presente nas células epiteliais do intestino de felídeos jovens, inclusive os gatos (não imunes). Sendo assim, os felídeos são considerados os hospedeiros definitivos ou completos, pois possuem um ciclo coccidiano, apresentando uma fase sexuada dentro das células do epitélio intestinal e outra fase assexuada que ocorre em outros tecidos.

Na fase assexuada, um hospedeiro suscetível podendo ser o homem, ingere através de água ou alimentos contaminados oocistos contendo esporozoítos. Os parasitas penetram no intestino do hospedeiro e iniciam um processo de multiplicação assexuada dentro do vacúolo parasitóforo. Ocorre, então, a endodiogenia, processo pelo qual cada núcleo divide-se formando duas células-filhas e o resto da célula mãe se degenera. Estes se multiplicam rapidamente até a ruptura da célula hospedeira liberando os taquizoítos para invadir outras células. Com o desenvolvimento da resposta imune efetiva, ocorre a lise de taquizoítos extracelulares, por uma combinação de anticorpos e complemento (Beaman et al., 1995), porém alguns parasitas intracelulares podem persistir por algum tempo na medula espinhal ou no cérebro (Dubey, 1993).

Em casos de comprometimento do sistema imunológico, principalmente em pacientes soropositivos para HIV ou em outros pacientes imunossuprimidos, os cistos latentes, contendo bradizoítos são reativados e os taquizoítos são liberados na circulação sanguínea provocando a reativação da doença (Suzuki, 2002; Kim e Weiss, 2008).

A fase sexuada (ou coccidiana) ocorre apenas nas células epiteliais do intestino delgado de felídeos jovens. No decorrer desse ciclo ocorre uma fase assexuada (merogonia) e outra sexuada (gamagonia). Por esse motivo, os felídeos são considerados hospedeiros definitivos. Os esporozoítos, bradizoítos ou taquizoítos ao penetrarem nas células do epitélio intestinal do felídeo jovem sofrem um processo de multiplicação denominado esquizogônica, que origina vários merozoítos. O conjunto desses merozoítos formados dentro do vacúolo parasitóforo da célula é denominado esquizonte maduro ou meronte. A célula parasitada se rompe e libera os merozoítos que penetram em outras células

epiteliais e se transformam em formas sexuadas femininas ou masculinas, que após um processo de maturação formarão os microgametas e macrogametas, ocorre a fecundação formando o ovo ou zigoto, que evolui dentro do epitélio dando origem ao oocisto. A célula epitelial se rompe liberando o oocisto imaturo que alcançará o meio externo através das fezes. A sua maturação ocorre no meio externo após cerca de quatro dias por um processo denominado esporogonia que resulta em dois esporocistos contendo quatro esporozoítos cada. Os oocistos, em condições favoráveis são capazes de manterem-se infectantes de 12 a 18 meses. (Neves, 2005).

1.1.2. Transmissão

A transmissão do parasita frequentemente ocorre pela ingestão de água e alimentos contaminados com oocistos, ou pela ingestão de carne crua ou pouco cozida contendo cistos (Figura 4). Constitui uma das zoonoses mais difundidas no mundo (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 (Hill et al, 2005).

A água é considerada uma importante via de disseminação da toxoplasmose. Vários surtos foram relatados tendo essa via de transmissão. No norte do estado do Rio de Janeiro, águas de poços, de lagos e de riachos foram consumidas pela população e incriminadas como fonte de infecção (Bahia-Oliveira et al., 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 indivíduos foi detectado anticorpos IgG anti-*T. gondii* e em 1255, anticorpos IgM e IgG. Este surto foi relacionado à ingestão de água de um dos reservatórios da cidade (De Moura et al., 2006).

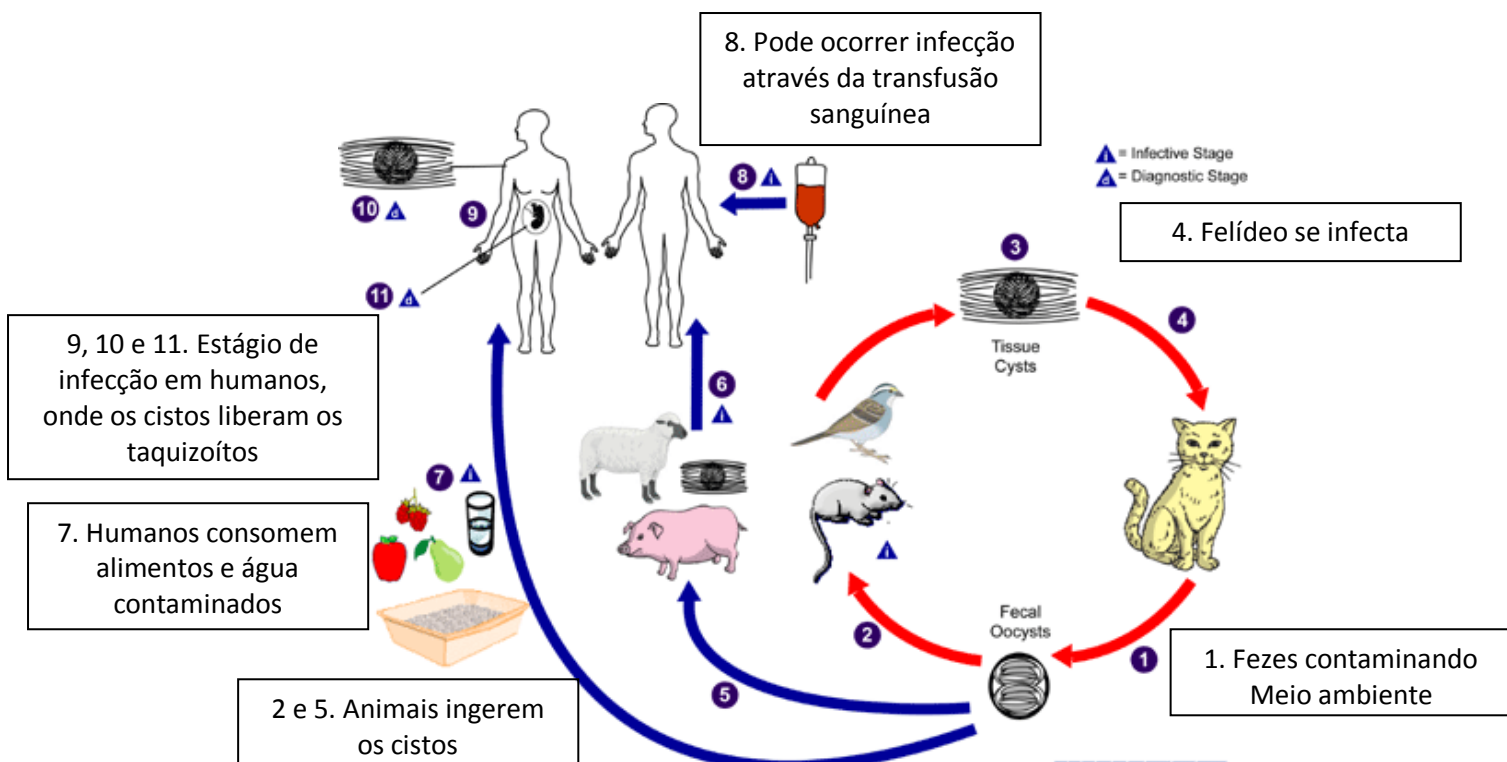


Figura 4. Ciclo de transmissão de *T. gondii*. Fonte: <http://www.cdc.com>

Surto relacionado à ingestão de carne mal cozida também foram relatados no país (Coutinho e Vergara, 2005). Na 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 retinocoroidite (Glasner et al., 1992). A presença de gatos e roedores em cerca de 90% das propriedades de criação de suínos em Erechim foi um fator importante para se correlacionar com os elevados índices da toxoplasmose nesse local (Araújo et al., 2000).

1.2. Toxoplasmose

A toxoplasmose ocorre em milhões de pessoas no mundo inteiro, sendo que a prevalência da infecção humana, na maioria dos países, está entre 40% e 50%. No Brasil essa taxa aumenta até 80%, dependendo da área estudada (Leão, 1997; Dubey, 2004). Tradicionalmente a toxoplasmose adquirida é considerada uma doença autolimitada em indivíduos saudáveis e imunocompetentes, sendo o tratamento considerado desnecessário, uma vez

que muitos pacientes não desenvolvem complicações mais severas. Porém, recentes trabalhos mostram que indivíduos com toxoplasmose adquirida, apresentam o risco de desenvolver tardiamente lesões oculares que comprometem de forma irreversível a visão (Silva, 2008).

Em indivíduos imunossuprimidos, principalmente em pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) a toxoplasmose costuma ser a infecção oportunista mais comum do sistema nervoso central (SNC) (Del Rio-Chiribog et al, 1997) e as lesões neurológicas são evidenciadas em até 90% dos casos de AIDS submetidos à necropsia, sendo a toxoplasmose cerebral a causa de óbito com muita frequência (Camara et al, 2003).

A reativação da infecção latente se observa em pessoas com deficiência imunológica, o que acontece em pacientes soropositivo para HIV, que foram parasitados previamente com *T. gondii*. Isso ocorre quando a imunodepressão celular é intensa, cuja contagem de linfócitos T CD4 é inferior a $100/\text{mm}^3$, podendo ocorrer a toxoplasmose cerebral como primeira manifestação da AIDS (Hernández- González et al, 2002).

1.2.1. Toxoplasmose ocular

Reações inflamatórias intraoculares incomuns pode ser a única manifestação de uma toxoplasmose ocular adquirida. Já não se pode afirmar que a toxoplasmose ocular cause sempre uma coriorretinite necrótica focal, porque na infecção adquirida outras partes do olho podem ser afetadas, sem desenvolvimento de retinite. Alguns pacientes desenvolvem somente vasculite, outros somente vitreíte ou somente irridociclite, que são chamadas de formas atípicas (Silva, 2008).

A toxoplasmose ocular é a causa mais comum de inflamação retiniana em pacientes imunocompetentes e uma das mais importantes infecções oculares secundárias em pacientes com AIDS (Meirelles, 2001). Em pacientes imunocompetentes é responsável por 30 a 50% dos casos (Villard et al., 2003; Copeland e Phillipotts, 2006).

Os sintomas primordiais da toxoplasmose ocular incluem diminuição da visão pelo edema, inflamação ou necrose retiniana e opacidades (nuvens) no campo visual, hiperemia conjuntival e ciliar, dor e fotofobia. As recidivas frequentes decorrem da ruptura do cisto e liberação dos parasitas (Amato Neto et al., 1995; Remington et al., 1995).

1.2.2. Toxoplasmose congênita

A toxoplasmose congênita ocorre quando a mãe se infecta durante a gestação e o feto entra em contato com os taquizoítos, que são as formas responsáveis pela infecção congênita, via placenta (Pezerico, 2004). O tempo entre a infecção aguda materna e a infecção fetal, depende de diversos fatores como virulência da cepa do *T. gondii* e estágio de desenvolvimento da gestação. Desta forma, a infecção intrauterina pode ser muito grave, culminando até em abortamento, natimortos, doença neonatal grave ou prematuridade, além de manifestações tardias, na dependência da virulência do agente (Silva, 2008). Fetos infectados no primeiro trimestre da gestação podem apresentar quadros clínicos graves no nascimento, como hidrocefalia ou microcefalia, coriorretinite, calcificações intracranianas e retardamento mental (Ueno, 2005). As crianças infectadas, assintomáticas ao nascimento, podem desenvolver coriorretinite durante a adolescência ou na fase adulta, quando lesões oculares e desordens de desenvolvimento neurológico e psicomotor podem acontecer (Ueno, 2005).

A toxoplasmose congênita é considerada importante causa mundial de mortalidade infantil. Nos Estados Unidos, a infecção por toxoplasmose congênita acomete cerca de 3.000 recém-nascidos por ano. No Brasil, a prevalência de bebês que nascem por ano com infecção congênita é alta. Estima-se que nasçam anualmente cerca de 60.000 crianças com a doença na região metropolitana de São Paulo ocorre, proporção de 1: 1000 recém-nascidos, estimando-se o nascimento de 230 a 300 crianças infectadas por ano (Meirelles, 2001; Silva, 2008a; Brasil, 2012).

1.2.3. Toxoplasmose cerebral

A toxoplasmose cerebral é uma das principais causas de encefalite focal em pacientes com AIDS. A doença resulta, na maioria dos casos, de reativação de infecção latente, com prevalência de 3% a 50%, de acordo com a área geográfica, e apresenta elevada morbi-mortalidade, se não reconhecida e tratada precocemente. A (figura 5) que são resultados de tomografia e ressonância cerebral mostra as formas mais comuns da infecção (Bertolli et al, 1995; Frenkel et al, 1995; Pereira-Chiocola et al, 2009).

O diagnóstico precoce é de extrema importância, pois a doença se manifesta clinicamente de forma semelhante à outras complicações oportunistas que acometem o SNC como o linfoma primário do SNC, encefalites virais ou fúngicas, reativação da doença de Chagas e neurotuberculose e, não raro, ocorrem concomitantemente duas ou mais infecções oportunistas no mesmo sítio, dificultando a confirmação diagnóstica. Da mesma forma, os métodos de imagens podem revelar lesões focais no SNC, mas estas imagens possam compartilhar características semelhantes a abscessos, tumores, linfomas ou outras infecções oportunistas (Borges et al, 1997; Franzen et al., 1997; Ferreira, 2000; Pereira-Chiocola et al., 2009).

Outros indivíduos imunossuprimidos em decorrência ao uso de medicamentos e os submetidos a transplantes podem reativar a toxoplasmose, a partir de infecção prévia, uma vez que a permanência dos cistos nos tecidos é longa. Nesses pacientes, a reativação da doença, origina lesões focais, mais frequentemente no SNC e raramente na retina, no coração e pulmões (Black e Boothroyd, 2000). Desta forma, o diagnóstico não pode ser baseado somente em observações clínicas e radiológicas (Montoya e Liesenfield, 2004; Pereira-Chiocola et al., 2009; Mentzer et al., 2012).

Os sintomas mais frequentes são cefaleia, febre, anomalias focais manifestando hemiparesia (paralisia) até a perda da capacidade de coordenação motora, confusão mental, convulsões, letargia que pode progredir para o coma e muitas vezes levando o paciente à morte (Neves, 2005). Pacientes submetidos a transplantes de medula óssea podem reativar a

toxoplasmose e apresentar taxas de mortalidade maiores que 90% (Meirelles, 2001).

Em alguns países, particularmente na África, casos da doença são somente excedidos por casos de meningoencefalite criptocócica (Pereira-Chioccola et al., 2009). No estado de São Paulo, 25,4% de 71 pacientes soropositivos, morreram devido à toxoplasmose, durante os anos de 1998 a 2002 (Nogueira, 2005).

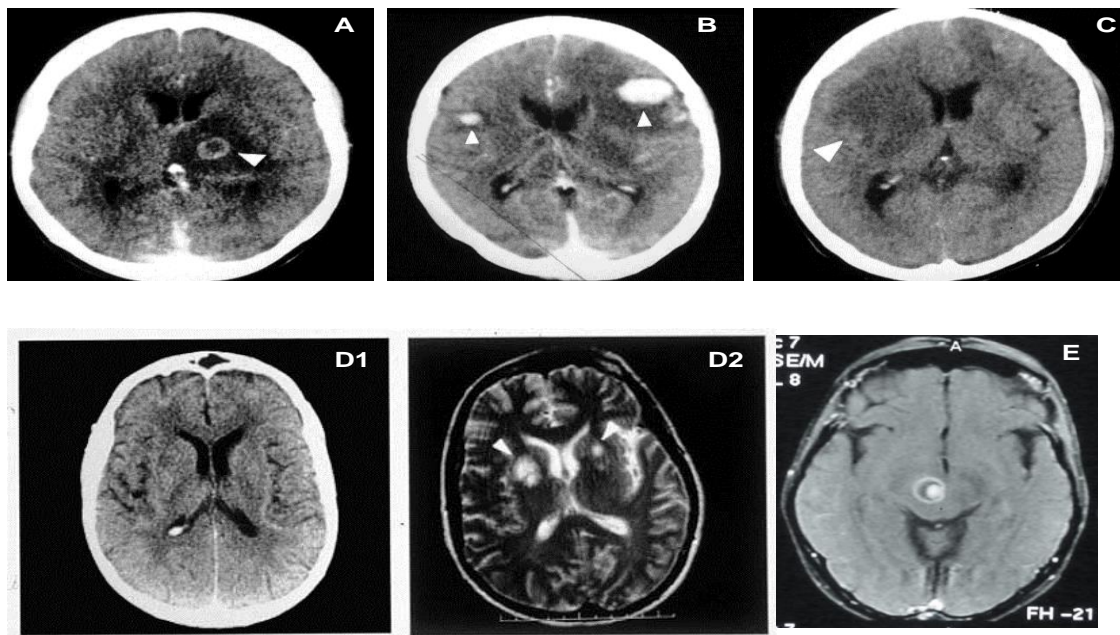


Figura 5. Tomografia computadorizada de um paciente com toxoplasmose cerebral (TC) com contraste/ressonância magnética (RM). -Lesões expansivas com realce anelar (A); com realce nodular (B); sem realce após injeção do contraste (C); múltiplas lesões focais nos gânglios basais com alta intensidade de sinais (TC e RM) (D1,D2) e lesão cerebral com realce anelar com um nódulo assimétrico ao longo da parede da lesão (E). Fonte: Pereira-Chioccola et al., 2009

1.2.4. Toxoplasmose disseminada

A toxoplasmose disseminada é definida quando a infecção acomete mais de dois sistemas ou órgãos (Medeiros et al., 2001; Saadatinia e Golkar, 2012). Como múltiplos sistemas são envolvidos, qualquer órgão pode ser acometido e podem ocorrer quadros semelhantes à sepse ou choque séptico

(Barbosa et al., 2007). Apesar de infrequente, está associada a um pior prognóstico (Schmidt, 2013). A disseminação pode ocorrer em grupos de pacientes com diferentes causas de imunossupressão (Botterel et al., 2002; Medeiros, 2001; Weiss e Dubey, 2009). Entretanto, os óbitos causados pela toxoplasmose disseminada têm sido principalmente atribuídos ao acometimento do SNC. Os quadros têm sido descritos particularmente em pacientes com AIDS, submetidos a transplantes de órgãos ou naqueles em tratamentos com uso de quimioterapia para doenças malignas (Bossi et al., 2000; Barbosa et al., 2007; Weiss e Dubey, 2009).

O cenário clínico pode incluir sintomas gripais, linfadenomegalias, febre, artralgia, mialgia, fadiga, hepatoesplenomegalia e rash maculopapular. O paciente apresenta inicialmente rash maculopapular e 15 dias depois tosse não produtiva, com estertores crepitantes bilaterais e sinais de insuficiência respiratória aguda. Pode haver ainda mialgia, aumento do lactato desidrogenase e plaquetopenia (Bossi et al., 2000).

Pacientes infectados com HIV que apresentem quadros sépticos com febre de origem indeterminada e com as características apresentadas devem ser investigados quanto à possibilidade de quadro de disseminação do *T. gondii*. Não existem dados disponíveis sobre a magnitude da toxoplasmose disseminada em pacientes infectados com HIV, nem dos doentes com toxoplasmose cerebral, que também apresentavam comprometimento de outros órgãos por *T. gondii* (Barbosa et al., 2007).

O diagnóstico depende de um conjunto de sintomas clínicos, radiológicos e laboratoriais. Todavia, requer um alto índice de suspeição devido à inespecificidade do quadro clínico, laboratorial e a possível confusão com outras doenças oportunistas. As formas fulminantes são descritas e com diagnóstico muitas vezes confirmado apenas na necropsia. Os órgãos mais acometidos incluem o cérebro, os pulmões, o coração e o sistema músculo esquelético (Medeiros et al., 2001).

Estudos de séries de necropsia demonstraram a relevância e gravidade da apresentação desta patologia nos pacientes com AIDS. Estudos mostram que grande parte destes pacientes que foram a óbito por toxoplasmose possuía também comprometimento pulmonar (Gadea et al., 1995). Estes dados sugerem que pacientes inicialmente diagnosticados como

toxoplasmose cerebral podem ter quadros disseminados da doença. Muitos desses casos de acometimento pulmonar não tinham sintomas clínicos respiratórios evidentes (Gadea et al, 1995). Após o envolvimento do SNC, os órgãos mais frequentemente danificados são os pulmões e o miocárdio. A doença disseminada pode, ainda, acometer fígado, estômago, cólon, pâncreas, rins e testículos (Rabaud et al, 1994).

A infecção por *T. gondii* pode causar choque séptico geralmente associado à síndrome da angústia respiratória do adulto, semelhante aos quadros de choque séptico de origem bacteriana e com presença de infiltrado broncoalveolar difuso na maioria dos casos. Os sinais clínicos são inespecíficos, porém os achados laboratoriais podem ser sugestivos. A resposta imune a *T. gondii* é individual, complexa e compartimentalizada. Além disso, *T. gondii* pode se espalhar em todos os tecidos e cada compartimento tecidual possui sua própria resposta imune específica (Weiss e Dubey, 2009).

1.3. Diagnóstico laboratorial

O primeiro teste disponível para detectar anticorpos específicos anti-*T. gondii* foi a reação de Sabin-Feldman (*dye test*) (Reiter- Owona et al, 1999). Cinquenta anos depois da sua descrição, ainda era considerado como teste de referência com taxas altas de sensibilidade e especificidade. Entretanto, a sua utilização saiu de uso pelo uso obrigatório de parasitas vivos, o que traz graves problemas de biossegurança.

O isolamento dos parasitas no sangue ou outros fluídos corporais é um indicativo de uma possível infecção aguda (Montoya e Liesenfeld, 2004). Pode ser feito com a inoculação em camundongos, o que é mais sensível, porém requer de três a seis semanas e manutenção de animais em biotérios (Lin et al., 2000; Kupferschmidt et al., 2001; Bastien, 2002). Os métodos tradicionais de detecção direta do parasita são pouco utilizados, pois demandam certo tempo e apresentam baixa sensibilidade (Rey, 2001; Bastien, 2002). Por ser um parasita intracelular obrigatório, a cultura *in vitro* é difícil de ser mantida, tem custo alto e necessita de período longo de tempo para

fornecer resultado, muitas vezes só mostrando resultado em menos de 50% dos casos.

Diante da dificuldade e da baixa sensibilidade dos exames que evidenciam os parasitas, os exames sorológicos são mais comumente utilizados no diagnóstico da toxoplasmose. Estes se baseiam principalmente, na detecção de anticorpos específicos das classes IgM, IgA, IgE e IgG (Contreras et al., 2000). No momento, as técnicas mais utilizadas no diagnóstico laboratorial da toxoplasmose são a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA), que são ditos padrão ouro.

Ambos os testes apresentam boa especificidade e sensibilidade nas fases aguda (pesquisa de anticorpos IgM) e crônica (pesquisa de anticorpos IgG) (Montoya e Lisenfeld, 2004; Shaapan et al., 2008).

A RIFI é rotineiramente utilizada entre os laboratórios. No entanto, na detecção de anticorpos IgM, há o inconveniente de possíveis resultados falsos-positivos, pela presença no soro de anticorpos IgM anti-IgG (fator reumatoide) ou falso-negativos, pela competição de anticorpos IgG com os IgM, pelos mesmos sítios antigênicos (Sanchez, 2001). Um teste negativo para anticorpos IgM exclui o diagnóstico de toxoplasmose aguda com menos de três semanas de duração (Coutinho e Vergara, 2005). Em adição, a subjetividade na interpretação da fluorescência torna o método de difícil comparação entre laboratórios (Shaapan et al., 2008; Macrì et al., 2009).

O teste de ELISA detecta quantidades extremamente pequenas de anticorpos, podendo ter elevada precisão, se os reagentes e os parâmetros do ensaio forem bem padronizados (Camargo, 2001; Sanchez, 2001). A demonstração de um aumento significativo no nível de anticorpos IgG e/ou a presença de anticorpos IgM poderia caracterizar o diagnóstico da toxoplasmose aguda. Entretanto, a elevada prevalência de anticorpos IgG entre indivíduos normais e a persistência de anticorpos IgM por longos períodos tem complicado a interpretação dos testes sorológicos quando há suspeita de toxoplasmose aguda (Nascimento et al., 2008; Kaye, 2011).

Com o intuito de determinar a fase da infecção principalmente em gestantes foram avaliadas a utilidade da detecção de anticorpos IgA e a idade de anticorpos IgG em soro (Bessières et al., 1992; Borges e Figueiredo, 2004a). Anticorpos IgA apresentam cinética parecida aos dos anticorpos IgM,

porém com sensibilidade maior (Hedman et al., 1989). Constitui um importante marcador sorológico de infecção em gestantes, fetos e recém-nascidos, pois desapareceriam de circulação mais rapidamente que os anticorpos da classe IgM (Pinon et al., 2001; Borges e Figueiredo, 2004). A desvantagem é que aproximadamente 5% dos adultos não produzem IgA ou, alguns indivíduos podem permanecer com a IgA específica por anos. Por esta razão é pouco utilizado para compor o diagnóstico de infecção recente (Montoya e Liesenfeld, 2004).

O teste ELISA-avidez de IgG baseia-se na força total que ocorre entre a interação antígeno-anticorpo (Hedman et al., 1989; Joynson et al., 1990; Cozon et al., 1998). Os resultados são baseados na medida da avidez ou afinidade funcional dos anticorpos da classe IgG específicos para *T. gondii*. Anticorpos de baixa avidez (30% ou menos) são produzidos em estágio precoce da infecção enquanto que anticorpos de alta avidez (60% ou mais) refletem infecção crônica. Valores entre 30% e 60% não permitem a caracterização da fase da doença, porém uma alta avidez de IgG exclui infecções primárias com menos de 4 meses de duração (Joynson et al., 1990; Gutiérrez e Maroto, 1996; Montoya e Liesenfeld, 2004). No entanto, uma baixa avidez de IgG muitas vezes não significa que a gestante tenha adquirido a infecção recentemente, pois resultados com baixa avidez podem persistir por até um ano. Assim, nestes casos, o teste de avidez não deve ser utilizado isoladamente como um teste de diagnóstico definitivo, sendo recomendado o seu uso em associação com outros testes laboratoriais, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostras de líquido amniótico e sangue, permitindo a identificação dos fetos infectados e possibilitando que a terapia antiparasitária inicie precocemente, ainda na gestação (Jenum et al., 1998; Bou et al., 1999; Liesenfeld et al., 2001; Remington et al., 2004).

Testes para detecção de anticorpos IgE devem ser somente usados em combinação com outros métodos sorológicos (Pinon et al., 1990; Wong et al., 1993). Sua demonstração não parece ser particularmente útil para diagnóstico de infecção por *T. gondii* no feto ou recém-nascido quando comparados com testes para anticorpos IgA (Montoya e Remington, 1995; Montoya e Liesenfeld, 2004). No entanto, alguns autores destacam que a detecção de anticorpos IgE correlaciona-se com a fase aguda ou reativada da

toxoplasmose (Pinon et al., 1990; Gross et al., 1997), porém, pacientes com IgE negativo não excluem a possibilidade de um estágio agudo ou reativado da infecção.

O diagnóstico molecular é normalmente realizado pela PCR que é um método utilizado para complementar o diagnóstico de toxoplasmose ativa pela sua alta sensibilidade e especificidade (Hohlfeld et al., 1994; Vidal et al., 2004; Colombo et al., 2005; Pereira-Chiocola et al., 2009). Revolucionou o diagnóstico pré-natal da toxoplasmose congênita, pois permitiu a realização de um diagnóstico precoce e menos invasivo para o feto (Montoya e Liesenfeld, 2004).

A detecção de *T. gondii* é utilizada com frequência em diferentes materiais biológicos como tecido cerebral, líquido cefalorraquidiano (LCR), lavado broncoalveolar, sangue, tecido hepático, líquido amniótico, líquido pleural, líquido ascítico, urina, líquido ocular (Dupouy-Camet et al., 1993; Hohlfeld et al., 1994; Franzen et al., 1997; Montoya e Liesenfeld, 2004; Colombo et al., 2005) e, um diferencial que estamos apresentando nesse trabalho é a extração de DNA a partir de blocos de parafina. Já foram descritos mais de 25 marcadores na detecção do DNA de *T. gondii*. As sequências mais utilizadas têm como alvo o gene B1, que possui uma região repetitiva de 35 cópias no genoma de *T. gondii* (Burg et al., 1989; Filisetti et al., 2003; Okay et al., 2009). Em paralelo, alguns estudos relatam que a sequência repetitiva do gene B1 apresenta sensibilidade variável quando utilizada em amostras extraídas de LCR (Franzen et al., 1997; Montoya e Liesenfeld, 2004; Mesquita et al., 2010). Vidal et al. (2004) demonstraram a alta capacidade de marcadores para o gene B1 em detectar amostras positivas em pacientes com AIDS e recém-natos.

1.4. A contribuição de estudos em tecidos formolizados e conservados em blocos de parafina

Diariamente são retiradas amostras de tecido do corpo humano para análise visando o diagnóstico de doenças. Os fragmentos desses materiais são

fixados em formol, incluídos em parafina e estocados nos serviços de patologia. Esses espécimes representam importantes fontes de material biológico para a pesquisa de estudos retrospectivos empregando diferentes técnicas. Nos últimos anos, as metodologias moleculares tornaram-se possíveis, principalmente depois dos kits de extração de DNA a partir de tecido parafinado. Trouxeram grande contribuição para obtenção de dados epidemiológicos para diversas doenças. Assim, com este tipo de abordagem, espécimes biológicos de quarenta anos puderam ser analisados por técnicas moleculares (Scorsato et al., 2011).

Os blocos de parafina guardam grandes informações e podem ser eficazes na quantidade, qualidade de moléculas de DNA. Tais estudos possibilitam a elucidação de diagnósticos retrospectivos, identificação de indivíduos, estudos populacionais, envios de amostras à distância e aplicações na Medicina Forense, identificação de determinadas cepas de parasitas, entre outros.

Com este estudo retrospectivo pudemos analisar a diversidade gênica de *T. gondii* e foi uma ótima opção analisar tecidos fixados em blocos de parafina provenientes de pacientes que foram a óbito.

1.5. 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, 2001; 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 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, 2001; Ajioka et al., 2001; Grigg et al, 2003; 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). Segundo Dubey e Beattie (1988) a virulência em camundongos não apresenta correlação com a doença em humanos ou animais domésticos.

1.6. Caracterização molecular de *T. gondii*

A análise genética de *T. gondii* revelou um genoma nuclear estável de 87 Mb, constituído de 14 cromossomos, um DNA circular extracromossomal dentro de uma organela denominada apicoplasto com propriedades de plasmídeo-like de 35 Kb e um genoma mitocondrial de 6 Kb.

O genoma nuclear é haploide para a maioria dos estágios do ciclo do parasita, exceto para uma fase diploide breve no intestino do gato antes da meiose (Kham et al 2005 a).

Khan et al. (2005a) através de recombinações de cepas dos tipos II e III e cepas dos tipos I e III definiram um 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.

O genoma de *T. gondii* foi sequenciado em 1997 (GenBank accession U87145) (Figura 6) 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).

Os genótipos de *T. gondii* foram baseados nos estudos de polimorfismo genético e foram formados pela combinação de duas classes 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., 2001). 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., 2001; Su et al., 2003).

Segundo Howe e Sibley (1995), *T. gondii* possui uma estrutura populacional altamente clonal, que consiste predominantemente de três linhagens, designadas I, II e III, indicando que sua propagação na natureza ocorra principalmente pela replicação assexuada ou por cruzamentos uniparenterais. A clonalidade foi evidenciada pelos isolamentos de cepas com genótipos idênticos de diferentes hospedeiros provenientes de áreas geográficas distintas. A divergência genômica entre as linhagens é de cerca de 1% (Ajioka et al., 2001). Uma implicação prática de uma população com estrutura fortemente clonal é que determinadas características biológicas, por exemplo, a virulência, poderia ser atribuída a subgrupos geneticamente bem definidos da população de parasitos (Dardé et al., 2007).

A possibilidade de que o genótipo do parasita tenha influência sobre a severidade da doença no homem tem suporte nas diferenças de virulência das cepas em modelos experimentais animais (Su et al, 2003).

As cepas do tipo II levam à infecção crônica e produção de cistos teciduais em camundongos, sendo caracteristicamente de crescimento lento *in vitro* (Maubon et al., 2008), enquanto as cepas do tipo I são extremamente virulentas para camundongos, com alta taxa de multiplicação *in vitro* e penetração da lâmina própria e submucosas (Maubon et al., 2008), causando níveis significativos de parasitemia, que pode aumentar o risco de transmissão transplacentária ou severidade de infecção nos fetos em desenvolvimento (Howe e Sibley, 1995). Cabe lembrar que, a despeito dos estudos *in vivo* e *in vitro* demonstrarem as características genéticas dos parasitas, a expressão da virulência está correlacionada com as características dos parasitas e as do sistema imune hospedeiro (Dardé et al., 2007).

Estudos genéticos de cepas provenientes da América do Sul, África e Ásia demonstraram uma predominância de cepas não arquetípicas. São cepas mais virulentas para camundongos que as cepas do tipo II, as mais frequentemente isoladas na Europa e América do Norte (Maubon et al., 2008).

Lehmann et al. (2006) coletaram amostras de galinhas de várias partes do mundo e determinaram a frequência de genótipos avaliando sete *locus* polimórficos. Propuseram que *T. gondii* é composto de quatro populações, sendo duas restritas às Américas do Sul e Central (SA1 e SA2), uma população presente na Europa, Ásia, África e América do Norte (RW), mas ausente das Américas do Sul e Central e uma quarta população, de distribuição cosmopolita (WW). O cálculo das distâncias genéticas entre os vários haplótipos analisados levou os autores a formular a hipótese de que o parasito haveria surgido na América do Sul, onde então se concentraria o maior grau de variabilidade genética. A partir daí, dois eventos migratórios distintos teriam originado as populações RW (mais antiga) e WW (mais recente), tendo esta última sido levada a todo o mundo através das navegações a partir do século XVI.

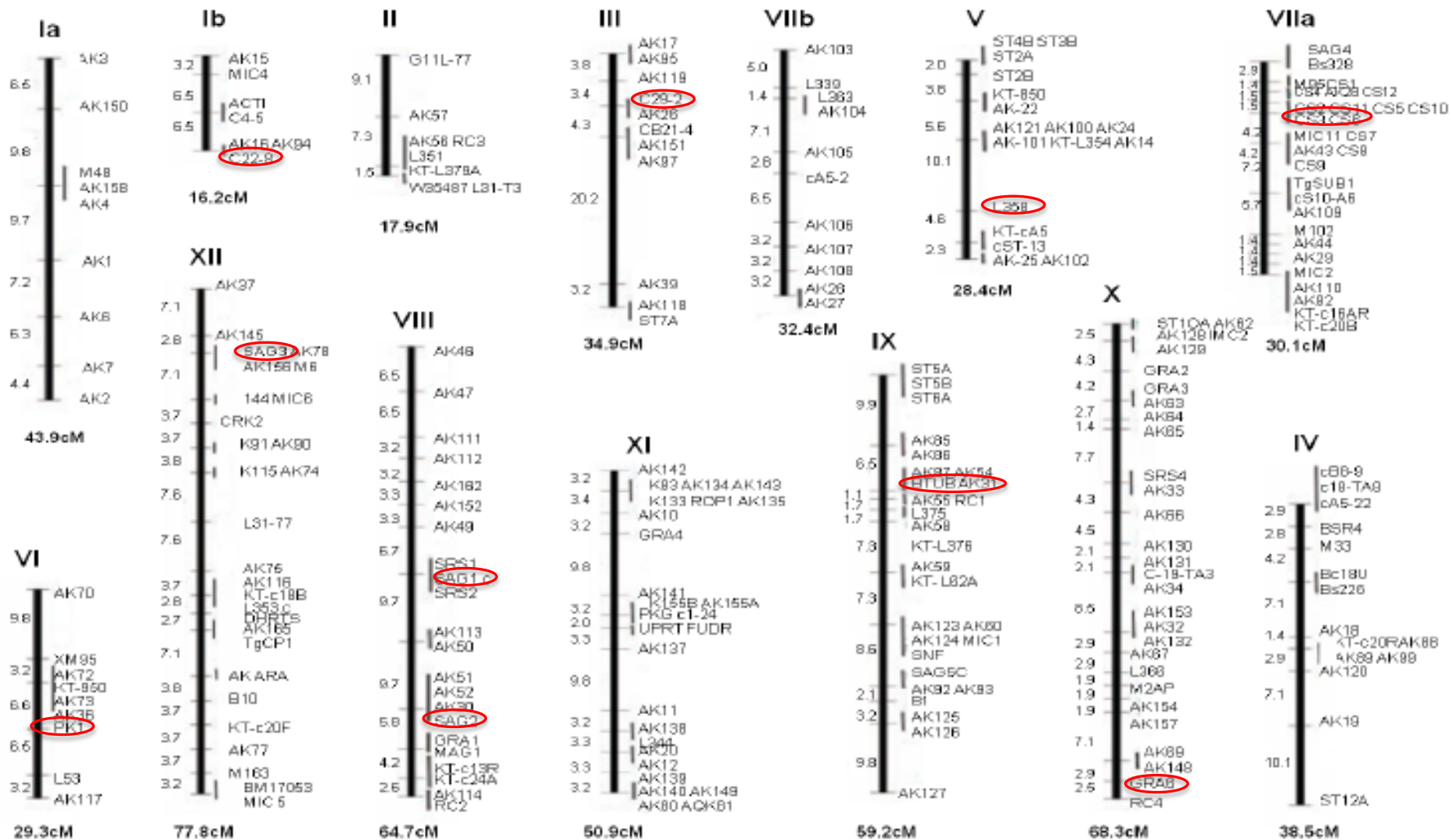


Figura 6. Mapa genômico de *T. gondii* constituído de 14 cromossomos- Fonte: (Khan et al, 2005).

Marcadores utilizados nesse estudo estão circulados de vermelho*.

Pena et al. (2008) estudaram a estrutura populacional e a virulência para camundongos de 46 isolados de *T. gondii* provenientes de gatos de 11 localidades no Brasil. Comparam os resultados obtidos de dez marcadores moleculares com a virulência em camundongos. Avaliando os resultados obtidos com outros 125 isolamentos brasileiros provenientes de galinhas, cães e gatos no Brasil identificaram-se 48 genótipos, sendo que destes, quatro foram isolados em vários hospedeiros e origens geográficas, propondo-se então a denominação destas linhagens como BrI, BrII, BrIII e BrIV, representativas de linhagens clonais. A linhagem BrI seria a mais virulenta, a BrIII não virulenta e as demais de virulência intermediária.

O estudo do marcador CS3 permitiu corroborar a correlação com a virulência para camundongos. Desta maneira o estudo da variabilidade genética das cepas de *T. gondii* tem, além de um interesse no estudo da biologia do parasito e da epidemiologia da enfermidade, pode ser utilizada no diagnóstico, seja para avaliar o risco de desenvolvimento de casos graves em dada população, seja para estimar o prognóstico em casos individuais. Por outro lado, o reconhecimento de cepas recombinantes associadas a casos atípicos de toxoplasmose em animais e no ser humano, inclusive em áreas onde o contato entre o homem e animais silvestres tem aumentado o risco de casos graves da enfermidade (Demar et al., 2008).

Os primeiros estudos sobre genotipagem de *T. gondii* mostravam que as cepas do tipo I ocorriam em casos de toxoplasmose humana congênita, enquanto que as cepas do tipo II são prevalentes em pacientes com AIDS (Howe e Sibley, 1995; Fuentes et al., 2001). Casos sintomáticos humanos originários da Europa e USA apresentam uma predominância de cepas genótipo II. Outras regiões apresentam padrões diferentes (Dardé et al., 2007).

Nos casos de toxoplasmose ocular, manifestação comum em muitos casos de toxoplasmose crônica pós-natal no Brasil, mas também resultado de infecções congênitas, a tipagem do DNA do parasito obtido diretamente de amostras de humor vitreo demonstrou a presença apenas de cepas tipo I (Vallochi et al., 2005), entretanto estes autores usaram apenas a amplificação do *locus* SAG2. Por outro lado, este resultado é corroborado pela alta frequência deste genótipo na maioria dos trabalhos brasileiros (Dardé et al., 2007).

1.6.1. Métodos de tipagem

Os primeiros casos descritos da existência de linhagens bem definidas dentre os isolados de *T. gondii* foram demonstradas 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, microssatélites 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).

Evidenciava-se que os casos sintomáticos humanos apresentavam uma predominância de cepas genótipo II, entretanto estes casos foram originários da Europa e USA, e provavelmente outras regiões apresentariam padrões diferentes (Dardé et al., 2007).

Apesar de o gênero *Toxoplasma* ser monoespecífico, a espécie *T. gondii* foi considerada por algum tempo como sendo composta por três linhagens clonais, chamadas de tipos I, II e III. Esta estrutura populacional foi definida com auxílio de um sistema de tipificação baseado no Teste de Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de DNA gerados por Enzimas de Restrição sobre Produtos Amplificados pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR-RFLP) (Howe, Sibley, 1995; Howe et al, 1997) e com amostras oriundas predominantemente da Europa Ocidental e Estados Unidos. Os tipos clonais I e II estavam geralmente associados à toxoplasmose clínica em humanos (Howe et al., 1997), entretanto, essa caracterização genética foi realizada a partir de isolados de pacientes que morreram com toxoplasmose. Ao contrário dos humanos, a maioria dos isolados do *T. gondii* de animais são do tipo II ou III, independente do estado clínico do animal (Howe, Sibley, 1995).

O polimorfismo dos fragmentos de DNA é encontrado como resultado da clivagem do DNA pelas enzimas de restrição que reconhecem uma sequência específica de quatro a oito bases. Portanto, ao se clivarem duas moléculas de DNA relacionadas, porém diferentes, com a mesma enzima de restrição, pode-se obter segmentos de comprimentos diferentes. Quando

são separadas por eletroforese em um gel são observadas bandas de diferentes pesos moleculares (Clark, Russel, 1997).

Após a descoberta das linhagens, a evolução clonal de *T. gondii* foi considerada indiscutível e, a partir de então, a caracterização molecular passou a ser feita com o emprego de um único *locus* gênico, no caso, o gene SAG2, localizado no cromossomo VIII e que codifica o antígeno de superfície p22 do parasito (Howe et al., 1997).

A caracterização molecular de *T. gondii* isolados de humanos e animais através da PCR-RFLP e com avaliação do polimorfismo no *locus* SAG2 vem ocorrendo desde 1995 (Howe; Sibley, 1995; Howe et al., 1997; Mondragon et al., 1998; Owen; Trees, 1999; Cole et al., 2000; Fuentes et al., 2001; Grigg et al., 2001; Aspinall et al., 2003), além de (Aspinall et al., 2002) que genotiparam isolados de *T. gondii* de produtos alimentícios à base de carne suína. Todos estes pesquisadores determinaram os genótipos também em outros *loci*, além do SAG2, como no *locus* SAG1 (que também, assim como o gene SAG2, é codificador de antígeno de superfície) e outros como 850, L328, 62 (de função desconhecida), ROP1 (codificador de proteína de roptria), além dos *loci* TGR1E e TGR6.

No Brasil, a avaliação dos genótipos de *T. gondii* em animais foi realizada pela primeira vez por Dubey et al. (2002) em amostras de galinhas caipiras infectadas naturalmente e procedentes do interior do estado de São Paulo. A partir daí, vários outros estudos relacionados à genotipagem dos isolados do protozoário em galinhas foram realizados e publicados. Após a pesquisa dos genótipos de isolados de *T. gondii* de galinhas no estado de São Paulo no Brasil foram realizadas outras pesquisas utilizando apenas este marcador (SAG2) por diversos pesquisadores em todo o mundo (Dubey et al., 2003).

Os microssatélites, também denominados de repetições de sequências simples, compreendem uma classe de DNA repetitivo composto de dois a seis pares de base e encontram-se dispersos no genoma da grande maioria dos organismos estudados (Slatkin, 1996).

Com a descoberta do polimorfismo em microssatélites (VNTR – *variable number of tandem repeat*), medidas de distância genética foram sugeridas por alguns autores para a análise de variação genética com base no

número de repetições (Fondon; Garner, 2004). A alta taxa de mutação dos *loci* de microssatélites, comparado com outras regiões do DNA (como os *loci* que sofrem variabilidade por substituição nucleotídica) gera uma grande variação genética. Estes marcadores microssatélites para *T. gondii*, desenvolvidos por (Ajzenberg et al. 2004) e de PCR-RFLP *multilocus* de Lehmann et al. (2004) aplicados a uma amostragem maior e com maior diversidade regional, começaram a demonstrar que a subdivisão da população de *T. gondii* em apenas três arquétipos (I, II e III) não tinha sustentação científica.

Com efeito, a genotipagem usando marcadores *multilocus* em isolados de *T. gondii* obtidos a partir de frangos (Dubey et al., 2007a), gatos (Dubey et al., 2004a; Su et al., 2006) e cães (Dubey et al., 2007a) revelaram que a estrutura populacional do parasito no Brasil é bastante diversificada e realmente diferente daquela encontradas na Europa e América do Norte. Nestes estudos foram empregados marcadores *multilocus* PCR-RFLP, sendo revelado que as amostras de *T. gondii* oriundas de outras regiões do mundo, além de Europa e EUA, apresentavam genótipos recombinantes em relação os arquétipos clonais I, II e III.

A genotipagem de *T. gondii* utilizando marcadores moleculares na PCR-RFLP tem gerado informação valiosa para revelar a diversidade do parasita. As vantagens destes marcadores PCR-RFLP são a facilidade de utilização e a alta resolução na identificação de isolados de *T. gondii*. Estes marcadores foram originalmente desenvolvidos com base na sequência de polimorfismo de DNA das linhagens clonais I, II e III (Su et al., 2006). Com o emprego de PCR-RFLP, alelos distintos dos alelos não clonais (denominados u-1, u-2) são revelados por alguns marcadores, incluindo SAG1, SAG2, C22-8, c29-2 e PK1. Também foram detectadas combinações de alelos dos diferentes arquétipos. Em conjunto, estes achados sugerem que muitos isolados de *T. gondii* são diferentes dos Tipos I, II e III na sequência de DNA. De acordo com a pesquisa de Pena et al. (2008) esta afirmação é verdadeira principalmente quando se avalia isolados de *T. gondii* a partir de população de parasitas (em vários isolados) encontrada no Brasil. A partir de 2007, um maior número de marcadores foi incluído neste tipo de estudo, sendo C22-8, C29-2, L358, PK1 e Apico utilizados nos trabalhos de Dubey et al. (2007a) e Velmurugan et al.

(2008) além dos anteriormente citados, respectivamente no Rio Grande do Sul (Brasil) e na África.

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. Os ensaios são feitos com soros imunes contra peptídeos recombinantes de regiões polimórficas (SAG2, GRA3, GRA6 e GRA7) do parasito (Peyron et al.,2006; Tsukuda, 2007).

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 Colômbia (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 (Vaudaux et al., 2010).

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 de *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 brasileiros.

1.7. Justificativa

Diante do panorama descrito nesta introdução, diferentes parâmetros desta parasitose devem ser estudados para um melhor entendimento da infecção. Um deles é o estudo de populações de *T. gondii*. As análises genéticas de populações de *T. gondii* são importantes para

compreender os padrões epidemiológicos (Ajzenberg et al., 2004). Como aqui relatado, as primeiras análises genéticas de populações indicavam que as cepas de *T. gondii* eram agrupadas em três linhagens designadas tipos I, II e III. Estes estudos foram realizados em animais experimentais e verificou-se que a virulência e a evolução da infecção variam de acordo com cepa de *T. gondii* utilizada (Howe e Sibley, 1995; Howe et al., 1997). Os trabalhos pioneiros de genotipagem de cepas de *T. gondii* provenientes de animais domésticos e humanos empregavam a PCR-RFLP com um único marcador. Somente cepas clonais eram genotipadas, principalmente porque eram isoladas na Europa e América do Norte (Howe e Sibley, 1995; Dardé et al., 1992; Howe et al., 1997). Aventou-se a possibilidade de uma correlação com a severidade da doença humana (Fuentes et al., 2001). Gradativamente foram realizados estudos em isolados provenientes de diferentes regiões do mundo, como Estados Unidos, Europa, Ásia e África. Com o emprego da mesma metodologia, mas com mais marcadores moleculares (multilocus), estes estudos mostraram que a maioria apresentava características gênicas do tipo II, embora os isolados polimórficos e mistos também tenham sido encontrados nessas regiões (Ajzenberg et al., 2004; Peyron et al; 2006; Zakimi et al., 2006).

Surpreendentemente, os estudos realizados com isolados na América do Sul mostraram que eram mais virulentos e, predominantemente dos tipos I ou III (Peyron et al., 2006; Lehmann et al., 2006). No Brasil, a maioria dos estudos foi realizada em cepas isoladas de animais. Os genótipos foram também correlacionados com a virulência das cepas em animais experimentais (Dubey et al., 2002; Dubey et al., 2006; Pena et al., 2008; Dubey et al., 2007). Contudo, os isolados provenientes de humanos eram praticamente impossível de isolar as cepas em animais experimentais. Assim os estudos foram realizados isolando-se DNA de *T. gondii* a partir de amostras clínicas humanas (Fuentes et al., 2001; Peyron et al., 2006; Lehmann et al., 2006; Ferreira et al., 2006, Ferreira et al., 2008; Ferreira et al., 2011).

Baseados nos dados acima relatados e na ideia que a progressão e severidade da toxoplasmose cerebral poderiam estar correlacionadas com o isolado do parasita, Ferreira et al. em 2008 realizaram genotipagens diretamente em amostras clínicas. Foi um trabalho pioneiro quanto ao uso de um grande número de amostras clínicas (87 amostras de DNA de pacientes

com AIDS). A partir de DNA extraído de amostras clínicas humanas, isolados de *T. gondii* foram genotipados por PCR-RFLP utilizando-se 4 marcadores moleculares. Apesar dos resultados mostrarem uma predominância de cepas do tipo I (46%) corroborando com estudos anteriores (Vallochi et al., 2005; Khan et al., 2005), uma grande parcela das amostras não foi genotipada por nenhum marcador molecular (15%) ou apresentaram resultados de isolados polimórficas, recombinantes ou mistos. Outros estudos brasileiros também descreveram esta diversidade genética (Ferreira et al., 2006; Dubey et al. 2007; Pena et al., 2008). Ferreira et al. (2008), ainda, mostraram que os marcadores empregados apresentaram baixa sensibilidade e foram impróprios para genotipar parte das amostras estudadas haja vista os iniciadores serem desenhados para discriminar cepas norte-americanas ou europeias.

Em seguida, com mais marcadores moleculares para analisar isolados brasileiros. Ferreira et al. (2011) processaram 62 amostras de DNA de pacientes com toxoplasmose ativa. Somente em 20 delas, os isolados de *T. gondii* foram inteiramente genotipados. Destes pacientes foram correlacionados os dados clínicos com os genótipos dos isolados. A amostragem foi constituída de isolados provenientes de pacientes com toxoplasmose nas formas cerebral, ocular, congênita e gestacional. A maioria dos isolados foi agrupada no genótipo ToxoDB 65. Porém, o que foi bastante intrigante é que os dois pacientes com toxoplasmose cerebral que desenvolveram a forma disseminada e, que foram a óbito albergavam parasitas com genótipos diferentes (ToxoDB 6 e Toxo DB 7). Estes achados levaram a supor que alguns genótipos poderiam ser mais virulentos para o homem.

Assim, este estudo analisou amostras de necropsias de uma coorte de 15 pacientes que foram a óbito por desenvolverem a toxoplasmose disseminada. Foi um estudo retrospectivo, na qual os dados clínico-laboratoriais eram conhecidos. A hipótese era que estes pacientes poderiam albergar parasitas altamente virulentos pela condição em que eles foram a óbito. As moléculas de DNA isoladas das necropsias foram utilizadas para determinar as características genotípicas de *T. gondii*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Genotipar isolados de *T. gondii*, por PCR-RFLP em “Multilocus”, diretamente de amostras clínicas de pacientes que foram a óbito por toxoplasmose disseminada.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a possibilidade de extração de DNA em tecidos humanos fixados em formol e conservados em blocos de parafina.
- Realizar a PCR-RFLP em multiplex diretamente em amostras de necropsias parafinadas (cérebro e pulmão) para a genotipagem de *T. gondii*.
- Genotipar amostras DNA extraídas de tecidos conservados em parafina de pacientes com AIDS e toxoplasmose disseminada e que foram a óbito.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Considerações éticas

Este trabalho foi aprovado no comitê de ética do Instituto Adolfo Lutz, onde foi realizado sob o numero 186 971 (Anexo 1). As amostras de tecidos em blocos de parafina foram provenientes de um banco de blocos de tecidos do Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz.

3.2. Amostras clínicas

As genotipagens de *T. gondii* foram realizadas em 30 amostras de DNA extraídas de tecido encefálico e pulmonar. As amostras de tecidos estavam formolizadas e parafinadas e foram provenientes de pacientes que foram a óbito no Instituto de Infectologia Emílio Ribas com diagnóstico de toxoplasmose disseminada grave. Os óbitos ocorreram entre 2005 a 2011. As necropsias foram encaminhadas para o Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz para a realização do diagnóstico anatomo-patológico, a seguir foram encaminhadas para o Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas e Fungos do Instituto Adolfo Lutz, onde foi realizado o diagnóstico molecular e as genotipagens de *T. gondii* por PCR-RFLP.

3.2.1. Coleta de amostras clínicas

3.2.1.1. Fragmentos de necropsias de pacientes

Foram utilizados fragmentos de necropsias de tecido cerebral e pulmonar incluídas em parafina de 15 pacientes com toxoplasmose disseminada. Foram retirados de cada bloco, com auxílio de um micrótomo, alíquotas de 5-10 micrometros (usamos para extração metade de um eppendorf cheio, a outra metade armazenamos) para a extração do DNA.

3.3. Cepas de *T. gondii*

As cepas RH, GTI (Genótipo I), ME-49, PTG (Genótipo II), CTG, VEG (Genótipo III) e COUGAR (TgCgCal), TgCatBr5, MAS (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 cedidas pelo Dr Chunlei Su do “Department of Microbiology”, The University of Tennessee, Knoxville, USA.

3.3.1. 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 intraperitoneais com 1×10^5 taquizoítos/animal. Após quatro dias de infecção os animais foram eutanasiados em câmara de gás CO₂ e feitas lavagens intraperitoneais com 5 mL de solução salina (NaCl 0,85%) estéril. A seguir as soluções foram centrifugadas por 15 min a 1800 g, 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 e para extração de DNA (controle positivo na PCR e genotipagem)

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.

3.4. Diagnóstico clínico e histopatológico

O diagnóstico da toxoplasmose disseminada foi determinado por médicos do Instituto de Infectologia Emílio Ribas e foi baseado em características clínicas, radiológicas e laboratoriais. Todos tinham o diagnóstico prévio de HIV.

O diagnóstico clínico foi definido de acordo com as “*definições de diagnóstico clínico-radiológico de toxoplasmose em pacientes com AIDS*” (CDC, 1993; Potergies et al., 2004). A presença da taquizoítos nos cortes histológicos foi determinada previamente através da coloração de hematoxilina-eosina e do método imuno-histoquímico pela Profa. Dra. Roosecelis Brasil.

3.5. Diagnóstico Molecular

3.5.1. Extração de DNA

3.5.1.1. Em tecidos incluídos em blocos de parafina

O primeiro protocolo foi utilizado o xilol para dissolver a parafina incluída no tecido. Inicialmente retirou-se o excesso de parafina da amostra do tecido com bisturi estéril. A parte onde continha o tecido foi cortada em pedaços de 5 a 10 μm . A seguir, os fragmentos foram colocados em tubos de 1,5 a 2 mL com 1 mL de xilol, agitados em vortex por 10 segundos e centrifugados na 13000 g por 2 minutos. Os sobrenadantes foram removidos. Os tubos contendo os sedimentos foram abertos e encubados a temperatura ambiente por 10 minutos, para que os resíduos de xilol evaporassem completamente. Os precipitados foram utilizados para extração de DNA com o

Kit extração de DNA QIAamp® DNA FFPE Tissue. Basicamente, os sedimentos foram diluídos em 180 µL de “Buffer ATL” e 20 µL de proteinase K, agitados em vortex por 10 segundos e centrifugados por 1 minuto a 11 000 g. A seguir, as amostras foram incubadas em banho maria a 56°C por 60 minutos ou até completa lise do tecido. A seguir, as amostras foram incubadas em banho maria 90°C mais 60 minutos. Uma nova centrifugação por 1 minuto, o conteúdo da parte de baixo do tubo (fase limpa) foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL e adicionados 200 µL do “Buffer AL”, agitado no vortex, incubado por 5 minutos no banho-maria a 56 °C. Em seguida foram adicionados 200 µL de etanol (96-100%), homogeneizado em vortex e centrifugado a 13 000 g. Cuidadosamente, o lisado foi transferido para uma coluna QIAamp MinElute (com um tubo de coleta de 2 mL) e centrifugado a 6000 g por 1 minuto. A seguir, a coluna foi transferida para um novo tubo coletor. As lavagens foram realizadas 500 µL do “Buffer AW1” e 500 µL do “Buffer AW2” seguidas das centrifugações de 6000 g por 1 minuto. Após uma nova centrifugação de 20 000g por 3 minutos, as moléculas de DNA foram eluídas com 50 µL do “Buffer ATE” (incubado em temperatura ambiente por 1 minuto e, centrifugado a 13 000 g por 1 minuto). As amostras de DNA foram armazenadas -20°C.

No segundo protocolo, como alternativa ao uso de xilol, a desparafinização foi realizada aquecendo as amostras dos blocos de parafina em forno microondas em potencia alta até o completo derretimento da parafina (aquecemos e retiramos a água observando se a quantidade de parafina da amostra tinha diminuído, repetindo esse processo aproximadamente dez vezes). O xilol foi substituído por água para a retirada da parafina do tecido. Em seguida, o protocolo foi realizado como descrito acima.

3.5.1.2. *T. gondii* – taquizoitos provenientes de cultura

As extrações dos taquizoítos (concentração de 1×10^7 taquizoítos/mL) e dos cistos foram realizadas com o kit QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN®). As amostras de tecido cerebral ou parasitas foram maceradas, e a

seguir, adicionaram-se 20 µL de proteinase K dissolvida em 180 µL do tampão Qiagen–ATL. Procedeu-se a homogeneização das amostras em um agitador tipo Vortex seguida de incubação a 56°C (em banho-maria) até a completa lise das células. Após a adição de 200 µL de etanol absoluto, as misturas foram transferidas para colunas de afinidade. Após a lavagem das colunas com os tampões Qiagen-AW1 e AW2, as moléculas de DNA foram eluídas com 200 µL Buffer AE.

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., 2010).

3.5.2. PCR

As amplificações foram realizadas 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 10 mM 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 concentração de no máximo 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 e um controle negativo, onde foi utilizada água ultrapura que substituiu o DNA. Os marcadores utilizados foram B22 (5’AACGGGCGAGTAGCACCTGAGGAGA3’) e B23 (5’ TGGGTCTACGTCGATGGCATGACAAC3’) que amplificam uma sequência de 115 pb de uma região repetitiva do gene B1 de *T. gondii* (Burg et al, 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 $\beta 1$ (5'-ACCACCAACTTCATCCACGTTCCACC-3') e $\beta 2$ (CTTCTGACACAACCTGTGTTCACTAGC-3') que amplificam uma sequência de 140 pb do gene β -globulina humana, realizadas simultaneamente, e com o mesmo protocolo de temperatura (Mesquita et al., 2010a).

3.5.2.1. Eletroforese em gel de agarose

Os produtos amplificados pela PCR 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 transiluminador Gene Genius (Programa Gel Capture, Mini Bis Pro, versão 4.5.3) de ultravioleta a um comprimento de onda de 302 nm.

3.6. Genotipagem por PCR-RFLP

As reações foram realizadas como descrito anteriormente (Ferreira et al., 2011) e exemplificadas na Figura 7. Inicialmente foram genotipadas as cepas de *T. gondii* citadas no item 3.3.1. para servirem de modelo e comparação nas genotipagens das amostras clínicas. As reações foram realizadas 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 anteriormente (Su et al., 2006; Su et al., 2010). Os marcadores, genes e localização nos cromossomos estão descritos na Tabela 1.

3.6.1. 1º PCR (Multiplex)

Foram realizadas duas reações em multiplex. Na primeira foram adicionados os oligonucleotídeos iniciadores externos dos marcadores na primeira reação SAG1, SAG2 (5'-SAG2 e 3'-SAG2), SAG3, GRA6, BTUB. Na segunda reação os oligonucleotídeos utilizados foram c22-8, c29-2, L358, PK1, novo SAG2 e Apico. Todos os marcadores estão descritos na Tabela 2. As reações foram realizadas adicionando 0,25 µL da mistura dos iniciadores “forward” (25 uM) e 0,25 µL da mistura do iniciador “reverse” (25 uM), 2,5 µL de tampão de PCR 10X sem magnésio (50mM KCl, 10mM Tris-HCl), 2.5 mM de cada dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 50mM de MgCl₂, 0,2 µL de DNA *Taq* polimerase (5U/ µL), 3 µL de DNA de cepas de *T. gondii*, em um volume final de 25 µL 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 até a realização do 2º PCR.

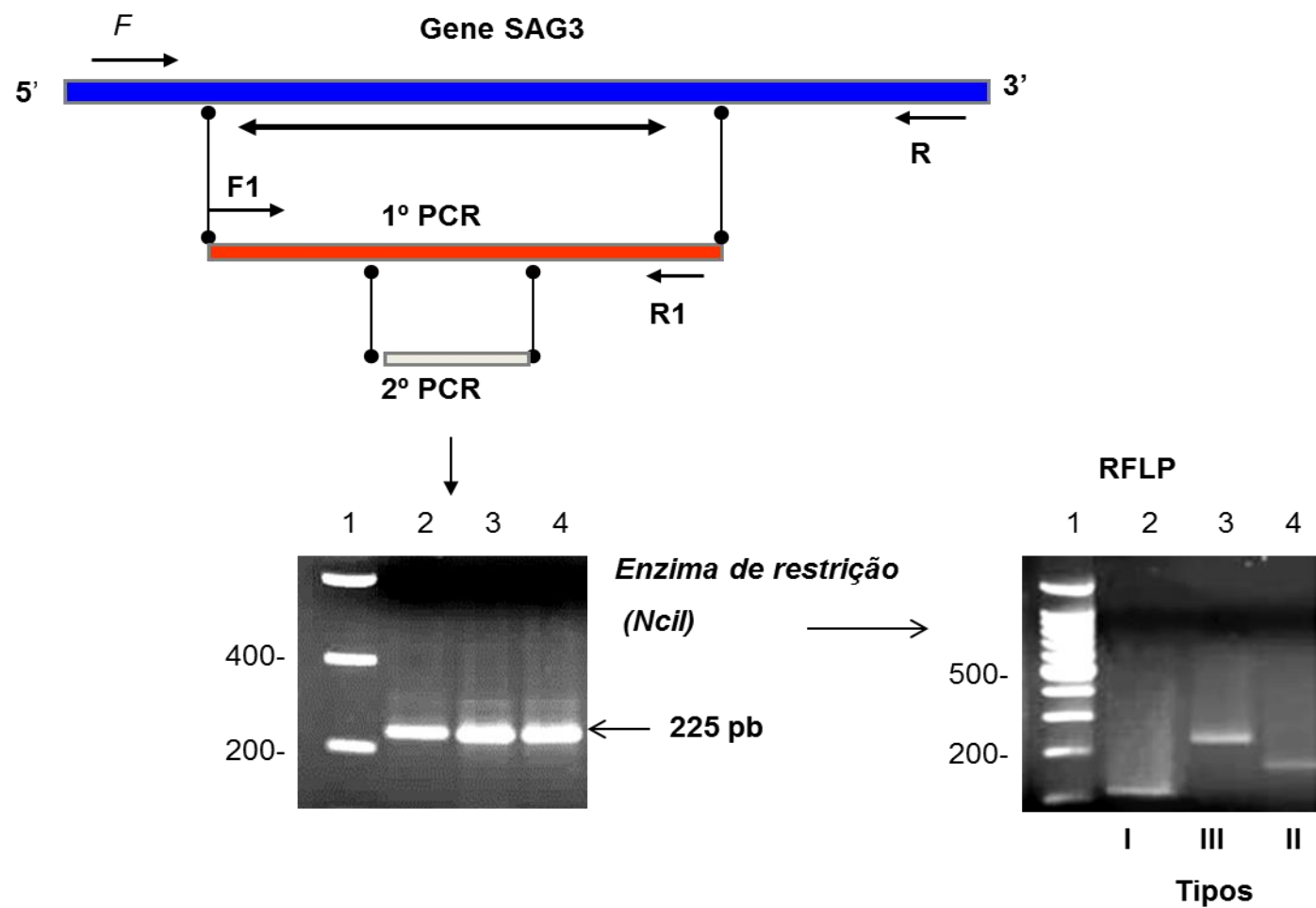


Figura 7. Esquema das sequencias da PCR-RFLP por marcador genético, apenas um exemplo de como funcionam as reações.

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

Marcadores	Genes	Localização	Referências
C22-8	C22-8	cromossomo Ib	Khan et al., 2005a
C29-2	C29-2	cromossomo III	Khan et al., 2005a
L358	L358	cromossomo V	Khan et al., 2005a
PK1	PK1	cromossomo VI	Khan et al., 2005a
SAG1	SAG1	cromossomo VIII	Grigg et al., 2001b ; Khan et al., 2005a
5'+3'SAG2	SAG2	cromossomo VIII	Howe et al., 1997; Khan et al., 2005a
NEW sag2	SAG2	cromossomo VIII	Lehmann et al., 2006, Khan et al., 2005a
SAG3	SAG3	cromossomo XII	Grigg et al., 2001b; Khan et al., 2005a
BTUB	BTUB	cromossomo IX	Khan et al., 2005a
GRA6	GRA6	cromossomo X	Khan et al., 2005a

Tabela 2: Iniciadores utilizados no primeiro (multiplex) e segundo (nested) PCRs, e as enzimas de restrição. (Fonte: Ferreira, 2012).

Marcadores	Iniciadores externos 5'→ 3'	Iniciadores internos 5'→ 3'	(RFLP) ^a	Referência
SAG1	GTTCTAACCACGCACCCTGAG AAGAGTGGGAGGCTCTGTGA	CAATGTGCACCTGTAGGAAGC GTGGTTCTCCGTCGGTGTGAG	Sau96I+HaeII (digestão dupla)	Grigg et al., 2001
5'-SAG2	GCTACCTCGAACAGGAACAC GCATCAACAGTCTTCGTTGC	GAAATGTTTCAGGTTGCTGC GCAAGAGCGAACTTGAACAC	Sau3 AI	Howe et al., 1997
3'-SAG2	TCTGTTCTCCGAAGTGA CTCC TCAAAGCGTGCATTATCGC	ATTCTCATGCCTCCGCTTC AACGTTTCACGAAGGCACAC	HhaI	Howe et al., 1997
SAG3	CAACTCTCACCATTCCACCC GCGCGTTGTTAGACAAGACA	CACAAGGAGACCGAGAAGGA TCTTGTCCGGTGTTCACCTCA	NciI	Grigg et al., 2001
GRA6	ATTTGTGTTTCCGAGCAGGT GCACCTTCGCTTGTGGTT	TTTCCGAGCAGGTGACCT TCGCCGAAGAGTTGACATAG	MseI	Khan et al. , 2005
BTUB	TCCAAAATGAGAGAAATCGT AAATTGAAATGACGGAAGAA	GAGGTCATCCTCGGACGAACA TTGTAGGAACACCCGGACGC	BsiEI+TaqI (digestão dupla)	Khan et al. , 2005
c22-8	TGATGCATCCATGCGTTTAT CCTCCACTTCTTCGGTCTCA	TCTCTACGTGGACGCC AGGTGCTTGGATATTCGC	BsmA I, Mbo II	Khan et al. , 2005
c29-2	ACCCACTGAGCGAAAAGAAA AGGGTCTCTTGCGCATA CAT	AGTTCTGCAGAGTGTCGC TGTCTAGGAAAGAGGCGC	HpyCH4IV, Rsa I	Khan et al. , 2005
L358	TCTCTCGACTTCGCCTCTTC GCAATTTCTCGAAGACAGG	AGGAGGCGTAGCGCAAGT CCCTCTGGCTGCAGTGCT	Hae III, Nla III	Khan et al. , 2005
PK1	GAAAGCTGTCCACCCTGAAA AGAAAGCTCCGTGCAGTGAT	CGCAAAGGGAGACAATCAGT TCATCGCTGAATCTCATTGC	Ava I, Rsa I	Khan et al. , 2005
SAG2	GGAACGCGAACAATGAGTTT GCACTGTTGTCCAGGGTTTT	ACCCATCTGCGAAGAAAACG ATTCGACCAGCGGGAGCAC	Hinf I, Taq I	Lehmann et al.,2006

3.6.2. 2º PCR (ou nested PCR)

Para cada marcador realizou-se uma reação totalizando um mix de 25 µL, onde foram adicionados oligonucleotídeos iniciadores internos. As concentrações de todos os componentes foram às mesmas descritas na reação de multilocus - PCR, com exceção dos oligonucleotídeos, onde cada região do DNA foi amplificada separadamente. 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.

3.6.3. 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) (a temperatura ideal para cada enzima vem junto de sua descrição quando a adquirimos). Para cada reação, as cepas RH, ME-49, VEG, GTI, PTG, CTG, MAS, TgCatBr5 foram utilizadas como controles positivos, e como controle negativo água ultrapura, que substituiu o DNA.

3.7. 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 3.6.

Todas as reações como 1º PCR (Multiplex), 2º PCR e RFLP foram realizadas exatamente como descritas anteriormente, sendo que as quantidades de DNA foram modificadas em cada etapa. Na reação de 1º PCR foram adicionados em cada reação 5 µL de cada amostra de DNA. No 2º PCR foram adicionadas 3 µL, sendo que diluídas (para totalizar o mix de 25 µL) conforme descrito anteriormente.

Os produtos amplificados para genotipagem, bem como os produtos digeridos com as enzimas de restrição foram visualizados conforme o item 3.5.2.1.

3.8. Análise de dados

Os diagnósticos clínico, histopatológico e molecular foram utilizados para estabelecer a forma clínica dos pacientes. Os resultados dos pacientes foram chamados de “genótipos sugestivos”, uma vez que não foi possível isolar os parasitas das amostras clínicas. A seguir, eles foram comparados com os existentes no <http://toxodb.org/toxo/>. O ToxoDB é um banco de dados disponível publicamente contendo todas informações sobre *T. gondii*. Nele encontra-se disponível dados do genoma, como as sequências genômicas das cepas do parasita, sendo encontrados mais de 70 milhões de pares de base de sequência de nucleotídeos, além de proteínas conhecidas.

4. RESULTADOS

4.1. Validação da extração de DNA de blocos de parafina

Foram testadas duas metodologias para extração de DNA de tecido conservados em parafina. A diferença dos métodos foi apenas a fase inicial da extração, onde o intuito foi o de retirar a maior quantidade de parafina possível a fim de que tecido ficasse livre. No primeiro protocolo utilizou-se o xilol para a retirada da parafina do tecido. No segundo, a água e aquecimento no forno micro-ondas foram utilizados em substituição ao xilol.

A Figura 8 mostra que ambas as metodologias foram eficientes para a retirada da parafina. Optou-se pelo uso do xilol, pois a parafina foi liberada mais rapidamente. O uso da água e forno micro-ondas acrescia 1:30 h a mais na metodologia de extração.

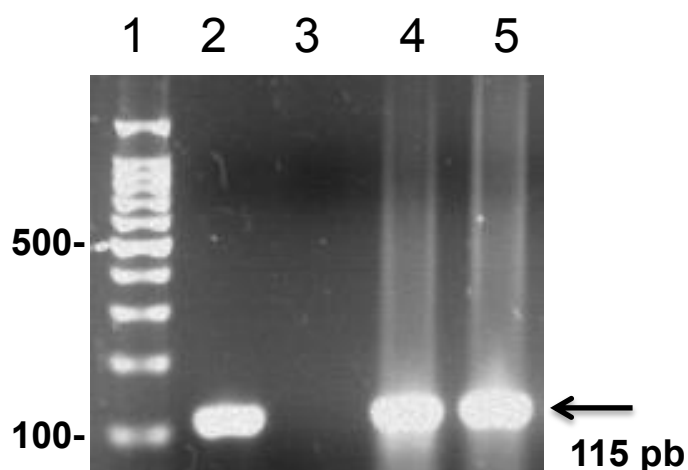
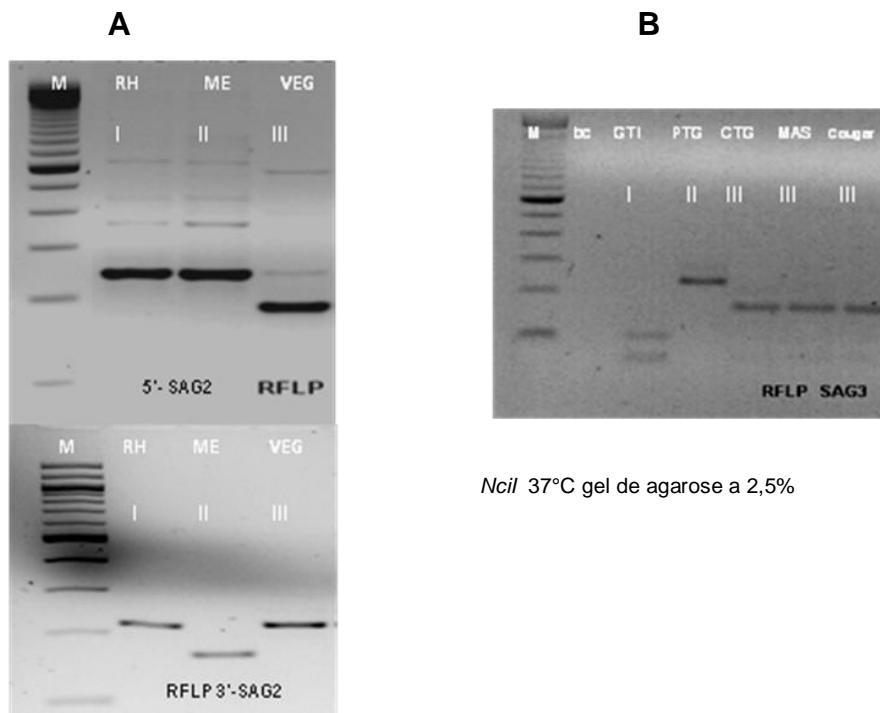


Figura 8. Produtos de PCR amplificados das amostras de DNA extraídas de blocos de parafina (gene B1), que foi dissolvida com xilol (canaleta 4) e com água e aquecimento em micro-ondas (canaleta 5). Os produtos amplificados de 115 pares de base (pb) foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 2% e corados com brometo de etídio. Canaleta 1, marcador de massa molecular (100 pb); canaletas 2 e 3, controles positivo e negativo, respectivamente.

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 *Mbol* e *HhaI* respectivamente e analisados em gel de agarose por eletroforese (Figura 10 A). 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.

O marcador SAG3 amplifica uma região do gene SAG3 (Grigg et al., 2001). Os produtos do 2ºPCR foram digeridos com a enzima de restrição *NciI* e analisados em gel de agarose por eletroforese (Figura 10B). Os fragmentos digeridos distinguiram os genótipos I, II e III.



Mbol 37°C gel de agarose a 2,5%
HhaI 37°C gel de agarose a 2,5%

NciI 37°C gel de agarose a 2,5%

Figura 10. Perfil de restrição enzimática de produtos do gene SAG2 (5'-SAG2 e 3'- SAG2) digeridos com as enzimas *Mbol* e *HhaI* que distigues os genótipos I, II e III de *T.gondii*. **(A)** e os produtos do gene SAG3 digeridos com a enzima *NciI* que distigues os genótipos I, II e III de *T.gondii* **(B)**.

O marcador GRA6 amplifica uma região do gene GRA6 (Khan et al., 2005). Os produtos do 2ºPCR foram digeridos com a enzima de restrição *MseI* e analisados em gel de agarose por eletroforese (Figura 11A). Os fragmentos digeridos distinguiram os genótipos I, II e III.

O marcador BTUB amplifica uma região do gene BTUB (Khan et al., 2005). 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 11B). Os fragmentos digeridos distinguiram os genótipos I, II e III.

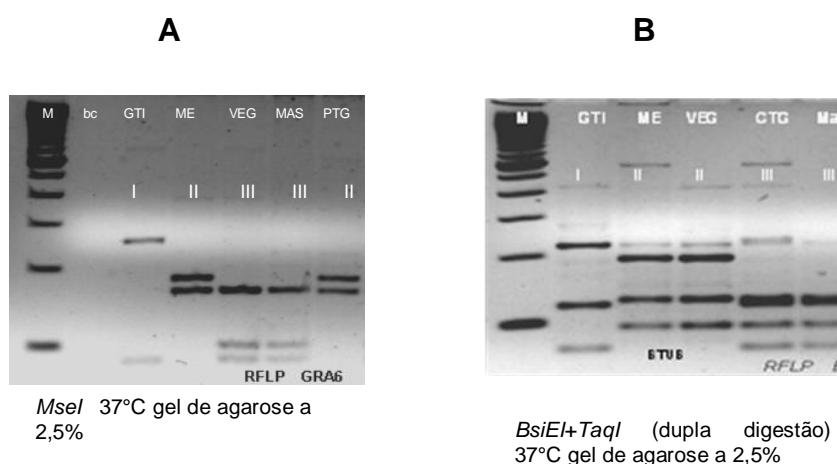


Figura 11. Perfil de restrição enzimática de produtos do gene GRA6 digeridos com a enzima *MseI* que distingue os genótipos I, II e III de *T.gondii* (A) e de produtos do gene BTUB digeridos com as enzimas *BsiEI* e *TaqI* que distingue os genótipos I, II e III de *T.gondii* (B).

O marcador C22-8 amplifica uma região do gene C22-8 (Khan et al., 2005). Os produtos do 2ºPCR foram digeridos com as enzimas de restrição *BsmAI* e *MboII* (dupla digestão) e analisados em gel de agarose por eletroforese (Figura 12 A). Os fragmentos digeridos distinguiram os genótipos I, II, III e u-1(IV – genótipo misto). O marcador C29-2 amplifica uma região do gene C29-2 (Khan et al., 2005). 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 12 B). Os fragmentos digeridos distinguiram os genótipos I, II, III e u-1(IV).

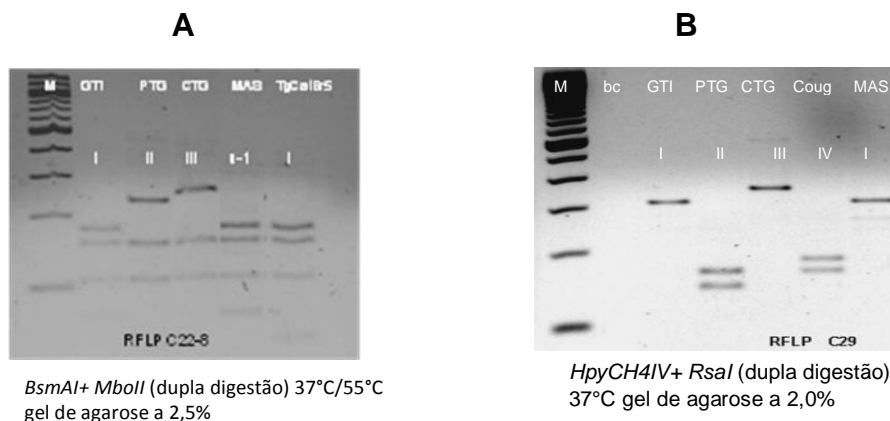


Figura 12: Perfil de restrição enzimática de produtos do gene C22-8 digeridos com as enzimas *BsmAI+ MbolI* que distigie os genótipos I, II, III e u-1 de *T.gondii* (**A**) e de produtos do gene C29-2 digeridos com as enzimas *HpyCH4IV* e *RsaI* que distigie os genótipos I, II, III e u-1 de *T.gondii* (**B**).

O marcador L358 amplifica uma região do gene L358 (Khan et al., 2005). 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 13 A). Os fragmentos digeridos distinguiram os genótipos I, II e III.

O marcador PK1 amplifica uma região do gene PK1 (Khan et al., 2005). 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 13 B). Os fragmentos digeridos distinguiram os genótipos I, II, III, u-1 (IV) e u-2 (V).

O marcador Apico amplifica uma região do gene Apico (Dubey et al; 2007). 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 13 C). Os fragmentos digeridos distinguiram os genótipos I, II e III.

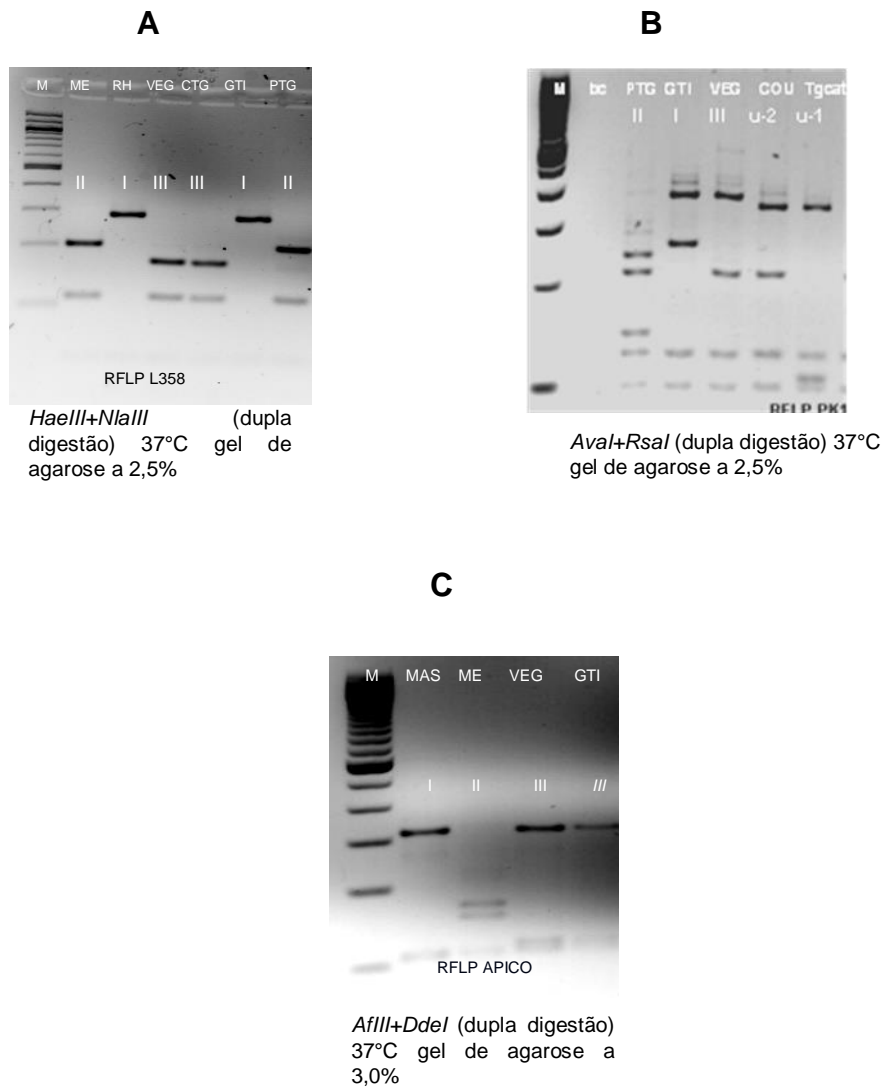


Figura 13. Perfil de restrição enzimática de produtos do gene L358 digeridos com as enzimas *HaeIII* e *NlaIII* que distigüe os genótipos I, II, e III de *T.gondii* (A); de produto do gene PK1 digeridos com as enzimas *AvaI* e *RsaI* que distigüe os genótipos I, II, III, u-1 (IV) e u-2 (V) de *T.gondii* (B) e de produtos do gene Apico digeridos com as enzimas *AflIII* e *DdeI* que distigüe os genótipos I, II, III de *T.gondii* (C).

4.3. Diagnóstico das amostras clínicas

Todas as 30 amostras cérebro e pulmão e provenientes de 15 pacientes que foram a óbito apresentaram diagnóstico anatomo-patológico de toxoplasmose disseminada grave. Após a extração de DNA das amostras de tecido apresentaram PCR positiva com os marcadores moleculares B22 e B23, que amplificaram uma sequência de 115 pb de uma região repetitiva do gene B1 de *T. gondii*. A qualidade e eficiência das extrações foram verificadas utilizando-se os marcadores moleculares β 1 e β 2 que amplificam uma sequência de 140 pb do gene β -globulina humana (Figura 14).

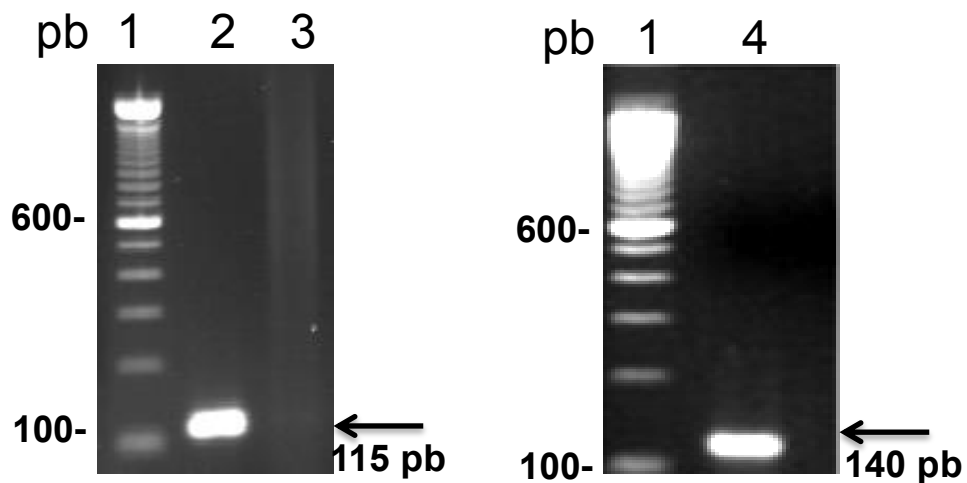


Figura 14. Produto de PCR amplificado de 115 pb do gene B1 de *T. gondii* de uma das amostras clínica (canaleta 2) e do gene β -globulina humana (canaleta 4). Os produtos amplificados foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 2% e corados com brometo de etídio. Canaleta 1, marcador de massa molecular (100 pb); canaleta 3, controle negativo.

4.4. Caracterização genotípica das amostras clínicas

Com objetivo de investigar se estes pacientes poderiam ter se infectado com mais de uma cepa é que realizamos as genotipagens em material genético extraído de dois tecidos (cérebro e pulmão). Contudo os resultados sugerem, que nestes pacientes não foram observadas cepas diferentes em um mesmo paciente.

As 30 amostras clínicas (duas de cada paciente) foram genotipadas com sucesso em 8 ou mais loci gênicos e estão descritos em detalhes na Tabela 3. Destas, 6 genótipos sugestivos foram identificados. De acordo com as análises realizadas no ToxoDB, 5 genótipos sugestivos não foram descritos ainda e um deles é o genótipo #11 (Paciente 11) O genótipo TgHuDis1 foi o mais frequente, sendo detectado em 8 pacientes (1, 2, 5, 6, 12, 13, 14, 15). Os genótipos TgHuDis3 (*Toxoplasma gondii* – disseminada em humanos) e TgHuDis5 foram presentes em dois pacientes cada (4 e 10) e (8 e 9) respectivamente. Os demais, B TgHuDis2, e TgHuDis4 foram vistos nos pacientes 3 e 7.

Os dados clínicos e laboratoriais dos 15 pacientes cujos isolados de *T. gondii* foram genotipados estão apresentados na (Tabela 4). As fichas clínicas dos pacientes informaram que todos os 15 pacientes tiveram toxoplasmose cerebral previa antes do episódio de toxoplasmose disseminada que resultou em óbito. Todos tinham AIDS. Os exames anatopatológicos e histopatológico foram compatíveis com toxoplasmose e revelaram encefalite. Todos apresentaram PCR positiva para *T. gondii* nos tecidos (cérebro e pulmão).

Tabela 3: Genótipos de *T. gondii* determinados em 30 amostras clínicas humanas parafinadas provenientes de 15 pacientes que foram a óbito.

Amostras clínicas		Marcadores moleculares											Genótipo
	código ¹	SAG1	5'+3' SAG2	SAG2	SAG3	BTUB	GRA6	c22-8	c29-2	L358	PK1	Apico	
Paciente 1	A04/05/pulmão	I	I	I	III	III	III	III	I	I	I	nd	TgHuDis1
	A04/05/cérebro	I	I	I	III	III	III	III	I	I	I	nd	
Paciente 2	A13/05/pulmão	I	I	I	III	III	III	III	I	I	I	I	TgHuDis1
	A13/05/ cérebro	I	I	I	III	III	III	III	I	I	I	I	
Paciente 3	A21/05/pulmão	II	I	I	III	III	III	III	I	nd	nd	I	TgHuDis2
	A21/05/ cérebro	II	I	I	III	III	III	III	I	nd	nd	I	
Paciente 4	A35/05/pulmão	I	II	I	III	III	III	III	I	I	nd	nd	TgHuDis3
	A35/05/ cérebro	I	II	I	III	III	III	III	I	I	nd	nd	
Paciente 5	A6/06/pulmão	I	I	I	III	III	III	III	I	nd	nd	nd	TgHuDis1
	A6/06/ cérebro	I	I	I	III	III	III	III	I	nd	nd	nd	
Paciente 6	A17/06/pulmão	I	I	I	III	III	III	III	I	I	nd	nd	TgHuDis1
	A17/06/ cérebro	I	I	I	III	III	III	III	I	I	nd	nd	
Paciente 7	A21/07/pulmão	I	II	I	III	I	nd	nd	I	III	I	nd	TgHuDis4
	A21/07/ cérebro	I	II	I	III	I	nd	nd	I	III	I	nd	
Paciente 8	A11/08/pulmão	I	II	II	III	nd	III	nd	nd	I	I	I	TgHuDis5
	A11/08/coração	I	II	II	III	nd	III	nd	nd	I	I	I	
Paciente 9	A21/08/pulmão	I	II	II	III	nd	III	nd	nd	I	I	I	TgHuDis5
	A21/08/ cérebro	I	II	II	III	nd	III	nd	nd	I	I	I	
Paciente 10	A31/08/pulmão	I	II	I	III	III	III	nd	nd	I	nd	I	TgHuDis3
	A31/08/ cérebro	I	II	I	III	III	III	nd	nd	I	nd	I	
Paciente 11	A12/09/pulmão	I	I	II	III	III	III	I	III	I	II	nd	ToxoDB #11
	A12/09/ cérebro	I	I	II	III	III	III	I	III	I	nd	nd	
Paciente 12	A39/09/pulmão	I	I	I	III	III	III	I	I	nd	nd	I	TgHuDis1
	A39/09/ cérebro	I	I	I	III	III	III	nd	I	nd	nd	I	
Paciente 13	A02/10/pulmão	I	I	I	III	III	III	I	nd	I	I	nd	TgHuDis1
	A02/10/ cérebro	I	I	I	III	III	III	I	nd	nd	I	nd	
Paciente 14	A6/11/pulmão	I	I	I	III	III	III	nd	I	I	nd	nd	TgHuDis1
	A6/11/ cérebro	I	I	I	III	III	III	nd	I	I	nd	nd	
Paciente 15	A21/11/pulmão	I	I	I	III	nd	III	III	I	I	I	nd	TgHuDis1
	A21/11/cérebro	I	I	I	III	nd	III	III	I	I	I	nd	

nd : não determinado¹código do bloco/ano

Tabela 4: Resultados clínico e laboratorial dos 15 pacientes com os isolados genotipados

Paciente - Código ¹	Idade (anos)	sexo	Diagnóstico (clínico, imagem e laboratorial)	PCR/ <i>T. gondii</i>	HIV (sorologia)	Histopatologia p/ <i>T. gondii</i> necrópsia	Status do paciente	Genótipo
Paciente 1 A04/05	39	M	Toxoplasmose disseminada e CMV	pos	pos	pos	Óbito	TgHuDis1
Paciente 2 A13/05	31	F	Toxoplasmose disseminada	pos	pos	pos	Óbito	TgHuDis1
Paciente 3 A21/05	24	F	Toxoplasmose disseminada e Neuro TB	pos	pos	pos	Óbito	TgHuDis2
Paciente 4 A35/2005	39	M	Toxoplasmose disseminada	pos	pos	pos	Óbito	TgHuDis3
Paciente 5 A6/06	40	M	Toxoplasmose disseminada	pos	pos	pos	Óbito	TgHuDis1
Paciente 6 A17/06	31	F	Toxoplasmose disseminada	pos	pos	pos	Óbito	TgHuDis1
Paciente 7 A21/07	50	M	Toxoplasmose disseminada	pos	pos	pos	Óbito	TgHuDis4
Paciente 8 A11/08	38	F	Toxoplasmose disseminada	pos	pos	pos	Óbito	TgHuDis5
Paciente 9 A21/08	48	F	Toxoplasmose disseminada	pos	pos	pos	Óbito	TgHuDis5
Paciente 10 A31/08	42	F	Toxoplasmose disseminada	pos	pos	pos	Óbito	TgHuDis3
Paciente 11 A12/09	30	M	Toxoplasmose disseminada e amebíase generalizada	pos	pos	pos	Óbito	ToxoDB #11
Paciente 12 A39/09	40	M	Toxoplasmose disseminada	pos	pos	pos	Óbito	TgHuDis1
Paciente 13 A02/10	43	M	Toxoplasmose disseminada	pos	pos	pos	Óbito	TgHuDis1
Paciente 14 A6/11	30	F	Toxoplasmose disseminada	pos	pos	pos	Óbito	TgHuDis1
Paciente 15 A21/11	59	M	Toxoplasmose disseminada	pos	pos	pos	Óbito	TgHuDis1

nd : não determinado¹ código do bloco/ano.

5. DISCUSSÃO

A toxoplasmose é uma doença assintomática em grande parte da população mundial, mas quando é associada à AIDS via de regra ocorre a doença neurológica devido ao caráter oportunista do parasita. No Brasil, apesar dos avanços no tratamento da AIDS, a prevalência da toxoplasmose sintomática em pacientes com AIDS ainda é alta e com considerável morbidade e mortalidade (Pereira-Chioccola et al., 2009). Portanto estudos que avaliem diferentes parâmetros da infecção podem contribuir para o melhor entendimento desta infecção oportunista, bem como, a sua prevenção.

Atualmente, na era pós-HAART, a toxoplasmose disseminada é rara pelo avançado de tratamento da co-infecção AIDS-toxoplasmose (Saadatinia e Golkar, 2012). Os 15 pacientes analisados neste estudo tiveram um episódio inicial toxoplasmose cerebral e foram tratados com sucesso. Todos desenvolveram num segundo tempo a infecção disseminada no mínimo 6 meses após ao episódio de toxoplasmose cerebral. Mesmo com a segunda rodada de tratamento eles foram a óbito. Os óbitos dos 15 pacientes ocorreram em 6 anos (2005 a 2011), portanto, esta coorte é rara e importante. O grupo foi constituído de 8 indivíduos do sexo masculino e 7 do sexo feminino, com idades entre 24 a 59 anos.

Este estudo relata as características genéticas de DNA de *T. gondii* analisadas diretamente em necropsias humanas. As amostras de DNA foram extraídas diretamente de amostras clínicas conservadas em parafina. Populações de *T. gondii* no Brasil têm alta diversidade genética (Dubey et al., 2012). Na maioria dos estudos, as amostras contendo isolados de *T. gondii* são inoculadas em muitos camundongos com objetivo de isolar a cepa do parasita (Howe e Sibley, 1995; Pena et al., 2008; Dubey et al., 2008a).

O estudo da diversidade de *T. gondii* analisando o DNA do parasita diretamente de amostras clínicas é um desafio, uma vez que a infecção crônica é caracterizada por cistos teciduais e ausência de parasitas circulantes. No entanto, na infecção ativa, comum nas imunossupressões, as moléculas de

DNA de *T. gondii* podem ser detectáveis em fluidos biológicos (Khan et al., 2005; Ferreira et al., 2006; Ferreira et al., 2008).

Os estudos pioneiros realizados em amostras clínicas humanas utilizavam a PCR-RFLP multiplex com dois a quatro marcadores moleculares (Grigg et al., 2001b; Khan et al., 2005; Ferreira et al., 2006; Ferreira et al., 2008). Os posteriores passaram a utilizar um maior número de marcadores. Os resultados revelaram que o parasita apresenta estrutura populacional bastante diversificada com grande número de genótipos com linhagens típicas do Brasil (Dubey et al., 2007; Pena et al., 2008; Ferreira et al., 2011). Assim, a tipagem genética baseada em um ou dois *loci* ficou limitada para detecção de cepas recombinantes (Su et al., 2006). A PCR-RFLP multiplex possibilitou a determinação de genótipos em múltiplos loci utilizando pequena quantidade de DNA extraído de tecidos, tais como líquido cefalorraquiano, líquido amniótico ou sangue (Su et al., 2006; Ferreira et al., 2011). Porém somente uma pequena porção de amostras clínicas são genotipadas (Su et al., 2010).

A vantagem desta metodologia neste trabalho foi a possibilidade de extrair DNA de tecidos conservados a, pelo menos 10 anos. Contudo o uso desta metodologia diretamente em amostras clínicas apresenta desvantagens. Uma delas está relacionada às amostras clínicas que apresentam pouca quantidade de DNA de *T. gondii*. Os marcadores moleculares para os genes com única cópia, como o APICO, PK1 e L358 são raramente amplificados. Com estes marcadores a PCR-RFLP tem baixa sensibilidade quando comparado com a do gene B1, que é altamente repetitiva (35 cópias no genoma) e, utilizado em PCR para diagnóstico molecular (Burg et al., 1989; Colombo et al., 2005; Su et al., 2010). A outra desvantagem (desvantagem da amostra) é a impossibilidade de verificar a virulência de cepas de *T. gondii* em animais experimentais, uma vez que é muito difícil isolá-los em amostras clínicas humanas, como de outros hospedeiros (Carneiro et al., 2013).

As 30 amostras clínicas foram genotipadas com sucesso em 8 ou mais loci gênicos, mas não foram observadas cepas diferentes em um mesmo paciente. Para controlar todas as etapas dos experimentos e monitorar a possíveis contaminações foram incluídos em cada reação amostras de DNA controle, que incluíram DNA extraído de *T. gondii* e DNA proveniente de

amostras negativas para *T. gondii*. Os resultados questionáveis foram retestados para impedir a contaminação.

O marcador molecular SAG2 (5'- SAG2 e 3'- SAG2) que amplifica uma região do gene SAG2 e apresenta maior número de cópias apresentou maior sensibilidade, porque possui 36 números de cópias, já o marcador APICO presente no apicoplasto foi o que apresentou o pior resultado, mostrando ser o marcador menos sensível porque tem apenas um número de cópia.

Apesar das análises de DNA de *T. gondii* terem sido feitas em amostras de necropsia fixadas em formal e emblocadas em parafina foram identificados 6 genótipos sugestivos. Assim, estas necropsias fornecem informações importantes. De acordo com as análises realizadas no Toxo DB, um dos genótipos sugestivos foi identificado como sendo o Toxo DB # 11 (Paciente 11, com óbito em 2009). Este genótipo foi identificado previamente em galinhas, capivaras, cães, carneiros, coelhos e gatos e de diferentes regiões geográficas do Brasil. Na Argentina e EUA este genótipo foi também descrito (Dubey et al, 2007; Pena et al, 2008; Yai et al., 2009; Ragozo et al; 2010; Dubey et al, 2012; Silva et al, 2014).

Num outro estudo uma cepa pertencente ao Toxo DB # 11 foi isolada de um bebê infectado por via congênita (Carneiro et al., 2013). A cepa foi isolada em camundongos e análises histopatológicas em tecido pulmonar demonstraram, que os pulmões estavam gravemente comprometidos e levaram os animais experimentais à óbito (Pinheiro et al., 2015). Estes dados confirmam que humanos e animais partilham os mesmos genótipos e estas ocorrências confirmam a importância destes animais que servem como reservatórios de infecção humana (Carneiro et al., 2013; Silva et al., 2014; Pinheiro et al., 2015).

Os outros 5 genótipos sugestivos identificados em 14 pacientes não foram descritos no ToxoDB ainda. Foram nomeados como TgHuDis (*T. gondiiHumanDisseminated*) 1, 2, 3, 4, e 5. A condição em que os pacientes foram a óbito sugere que estes isolados também possam ser virulentos. O genótipo sugestivo TgHuDis1 foi o mais frequente sendo detectado em 8 pacientes (1, 2, 5, 6, 12, 13, 14, 15). Os óbitos aconteceram em 2005 (2 pacientes), 2006 (2 pacientes), 2009 (1 paciente), 2010 (1 paciente) e 2011 (2 pacientes). O TgHuDis3 foi identificado em um paciente (4) que foi a obito em 2005 e outro (10) em 2008. Da mesma forma, o TgHuDis 5 foi identificado em 2

pacientes (8 e 9), que foram a óbito em 2008. Os genótipos sugestivos TgHuDis2 e TgHuDis4 foram identificados em um paciente (3) que foi a óbito em 2005 e outro paciente (7), em 2007, respectivamente. Assim, esses genótipos sugestivos poderiam ser considerados como genótipos de *T. gondii* virulentos uma vez que causaram lesões teciduais intensas tinham características semelhantes de Toxo DB # 11. Contudo, deve ser considerado também as deficiências imunológicas e genéticas dos pacientes

Os 15 pacientes foram diagnosticados e tratados em São Paulo em momentos diferentes, apesar de incerto o local da infecção. Estes dados podem contribuir para a possibilidade de compreender a apresentação clínica toxoplasmose em seres humanos.

Este estudo demonstrou que foi possível realizar genotipagem de amostras clínicas provenientes de tecidos parafinados de cérebro e pulmão e estocados por muito tempo. O isolamento das cepas em animais experimentais não foi tentado, já que as amostras já estavam armazenados por um longo período de tempo. Assim, o uso de animais experimentais não foi necessário, atendendo as boas praticas da pesquisa e ética animal, onde animais de laboratório devem ser utilizados apenas quando são extremamente necessários.

6. CONCLUSÕES

1. Este estudo demonstrou que foi possível extrair DNA de tecidos fixados em formol e conservados em blocos de parafina por muito tempo (de 5 a 10 anos) e com boa qualidade de resultado mesmo o DNA estando degradado;
2. As genotipagens de *T. gondii* por PCR-RFLP em multiplex foram realizadas com sucesso nas amostras de necropsias;
3. Os resultados sugerem uma possível relação entre a apresentação clínica incomum da toxoplasmose com desfecho fatal a presença desses genótipos sugestivos de *T. gondii*.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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.

Aspinall TV, Marlrr D, Hyde JE, Sims PFG. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in commercial meat products as monitored by polymerase chain reaction – food for thought. *Int J Parasitol* 2002. 32, 9 1193-1199.

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

Barbosa CJDG, Molina RJ, Souza MB, Silva ACA, Micheletti AR, Reis MA. Disseminated toxoplasmosis presenting as sepsis in two AIDS patients. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2007, 49:113-116

Bastien P. Molecular diagnosis of toxoplasmosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96: 205-215.

Beaman MH, McCabe RE, Wong SY, Remington JS. *Toxoplasma gondii*. In: Mandell GL, Benett JE e Dolin R.. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Vol. 2, 4 ed., Churchill Livingstone; 1995. p. 2455-2475.

Bessièrès MHO, Le Breton SO, Séguéla JP. Analysis by immunoblotting of *Toxoplasma gondii* exo-antigens and comparison with somatic antigens. *Parasitol Res* 1992; 78: 222-228.

Black MW, Boothroyd JC. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Molec Biol Rev* 2000;11, 607-623.

Borges AS, Ferreira MS, Nishioka SA, Silvestre MTA, Silva AM, Rocha A. Agreement between premortem and postmortem diagnoses in patients with

acquired immunodeficiency syndrome observed at a Brazilian teaching hospital. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1997;39: 217-221.

Borges AS, Figueiredo JFC. Detecção de imunoglobulinas IgG, IgM e IgA anti-*Toxoplasma gondii* no soro, líquido e saliva de pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida e neurotoxoplasmose. Arq Neurop 2004a; 4: 1033-1037.

Borges AS, Figueiredo JFC. Evaluation of intrathecal synthesis of specific IgG antibodies against *Toxoplasma gondii* in the diagnosis assessment of presumptive toxoplasma encephalitis in AIDS patients. Rev Soc Bras Med Trop 2004; 6: 480-484.

Bossi P, Paris L, Caumes E, Katlama C, Danis M, Bricaire F. Severe Acute Disseminated Toxoplasmosis Acquired by an Immunocompetent Patient in French Guiana. Scand J Infect Dis, 2000; 34 :311-313.

Botterel F, Ichai O, Feray C, Bouree P, Saliba S, Raspa RT, Samuel D, Romand S. Disseminated Toxoplasmosis, resulting from Infection of Allograft after Orthotopic Liver Transplantation: Usefulness of Quantitative PCR. J Clin Microbiol. 2002. 1648-1650.

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

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Boletim eletrônico epidemiológico. Brasília, ano 2, n.3, 2012.

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

Camara VD, Tavares W, Ribeiro M, Dumas M.. Manifestações neurológicas de toxoplasmose em AIDS. DST – J Bras Doenças Sex Transmis. 2003;15, 46-50.

Camargo ME. Toxoplasmosis. In: Ferreira AW, Ávila SLM (eds.) Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2001: 65-174.

Carneiro AC, Andrade GM, Costa JG, Pinheiro BV, Vasconcelos-Santos DV, Ferreira AM; Su C, Januário JN, Vitor RWA. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* revealed highly diverse genotypes from human congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil J. Clin. Microbiol. 2013: 51 3901–3907

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

Clark, DP; Russel, L. D. *Molecular biology: made simple and fun*. Illinois:Cache River Press, 1997. p. 235-268.

Cole RA, Lindsay DS, Howe DK, Roderick CL, Dubey JP, Thomas NJ, Baeten LA. Biological and molecular characterizations of *Toxoplasma gondii* strains obtained from southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). *J Parasitol*, 2000. 86, 526-530.

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

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

Copeland R, Phillipotts BA. Ocular manifestations of HIV. *E Medicine*. 2006: 1-46.

Coutinho SG, Vergara TRC. Toxoplasmosis. In: Coura JR, editor. *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 815-829.

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

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, 33–39.

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

Dardé ML, Bouteille B, Pestre-Alexandre M. Isoenzyme characterization of seven strains *Toxoplasma gondii* by isoelectrofocusing polyacrylamide gels. *J Parasitol*. 1998; 39, 551-558.

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

Dardé, M. L.; Ajzenberg, D.; Smith, J. Population structure and epidemiology of *Toxoplasma gondii*. In: Weiss, L.; Kim, K. *Toxoplasma gondii*. The model Apicomplexan – Perspectives and Methods. Burlington: Academic Press, 2007. p.49-80.

De Moura L, Bahia-Oliveira LMG, F, Wada MY, Jones JL, Tubol, SH, Carmo EH.. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. *Emerg Infect Dis*. 2006; 12: 326-329.

Demar M, Ajzenberg D, Serrurier B, Dardé ML, Carme B. Case report: Atypical *Toxoplasma gondii* strain from a free-living Jaguar (*Panthera onca*) in French Guiana. *Am J Trop Med Hyg*. 2008; 78,195-197.

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

Dubey JP, Frenkel JK. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. *J Protozool*. 1976; 4, 537-546.

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, Gennari SM, Sundar N, Vianna MC, Bandini LM, Yai LE, Kwok CH, Su C. Diverse and atypical genotypes identified in *Toxoplasma gondii* from dogs in São Paulo, Brazil. *J Parasitol*. 2007;93, 60–64.

Dubey JP, Graham DH, Dahl E, Hilani M, El-Ghaysh A, Sreekumar C, Kwok OCH, Shen SK; Lehmann T. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from chicken and ducks from Egypt. *Vet Parasitol*. 2003; 114, 89-95.

Dubey JP, Lago EG, Gennari SM, Su C, Jones JL. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: High prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology* 2012; 140: 1–50

Dubey JP, Navarro IT, Sreekumar C, Dahl E, Freire RL, Kawabata HH, Vianna MCB, Kwok OCH, Shen SK, Hullez P, Lehmann T. *Toxoplasma gondii* infections in cats from Paraná, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. *J Parasitol*. 2004a; 90,721-726.

Dubey JP, Sundar N, Gennari S M, Minervino AHH, Farias NAR, Ruas JL, dos Santos TRB, Cavalcante GT, Kwok OCH, Su C. Biologic and genetic comparison of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from the northern Pará state and the southern state Rio Grande do Sul, Brazil revealed highly diverse and distinct parasite populations. *Vet Parasitol*. 2007a; 143, 182-188.

Dubey JP, Velmurugan GV, Chockalingam A, Pena HFJ, Nunes de Oliveira L, Leifer CA, Gennari SM, Bahia Oliveira LMG, Su C. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chicken from Brazil. *Vet Parasitol.* 2008a: 157, 299-305.

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

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

Dubey JP. Toxoplasmosis – waterborne zoonosis. *Vet Parasitol.* 2004. 126, 57-72,

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

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

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

Ferreira IMR, Vidal JE, Mattos CCB, Mattos LC, Qu D, Su C, Pereira-Chioccia VL. *Toxoplasma gondii* isolates: Multilocus RFLP–PCR genotyping from human patients in Sao Paulo State, Brazil identified distinct genotypes. *Exp Parasitol.* 2011: 129,190-195.

Ferreira MS. Infections by protozoa in immunocompromised hosts. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000: 95, 159-162.

Filisetti D, Gorcii M, Pernot-Marino E, Villard O, Candolfi E. Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis: Comparison of Targets for Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR. *J Clin Microb.* 2003: 41, 4826-4828.

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

Frenkel JK, Hassenem KM, Hassenem RS, Brown E, Thulliez P, Quintero-Nunez R. Transmission of *Toxoplasma gondii* in Panama city, Panama: a five

year prospective cohort study of children, cats, rodents, birds and soil. *Am J Trop Med Hyg.* 1995; 53,458-468.

Gadea I, Cuenca M, Benito N, Pereda J, Soriano F. Bronchoalveolar Lavage for the diagnosis of disseminated toxoplasmosis in Aids patients. *Diagn Microbiol. Infect Dis.* 1995; 22: 339-341

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.

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, 136-144.

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

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.* 2001a: 39, 398-400.

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

Grigg ME, Suzuki Y. Sexual recombination and clonal evolution of virulence in *Toxoplasma*. *Microbes Infect.* 2003; 5, 685-690.

Gross U, Keksel O, Dardé ML. Value of detecting immunoglobulin E antibodies for the serologic diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1997; 4, 247-251.

Gutiérrez J, Maroto C. Are IgG antibody avidity assays useful in the diagnosis of infectious disease. A review. *Microbios.* 1996; 87, 113-121.

Hedman K, Lappalainen M, Seppä I, Makela O. Recent primary *Toxoplasma* infection indicated by a low avidity of specific IgG. *J Infect Dis.* 1989; 159, 736-740.

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

Hohlfeld P, Daffos F, Costa JM, Thulliez P, Forestier F, Vidaud M. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase-chain-reaction test on amniotic fluid. *N Engl J Med.* 1994; 331: 695-699.

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

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

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

Jenum PA, Stray-Pedersen B, Melby KK, Kapperud G, Whitelaw A, Eskild A, Eng J. Incidence of *Toxoplasma gondii* infection in 35.940 pregnant women in Norway and pregnancy outcome for infected women. *J Clin Microbiol.* 1998; 36, 2900-2906.

Joyson DH, Payne Ra, Rawal Bk. Potential role of IgG avidity for diagnosing toxoplasmosis. *J Clin Pathol.* 1990; 43, 1032-1033.

Kaye A. Toxoplasmosis: diagnosis, treatment and prevention in congenitally exposed infants. *J Pediatr Health Care* 2011; 25, 355-364.

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.* 2005; 43, 5881–5887.

Khan A., Fux B, Su C, Dubey JP, Darde ML, Ajioka JW. Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. *PNAS.* 2007; 104, 14872–14877.

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

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, 1485-1489.

Kupferschmidt O, Kruger D, Held TK, Ellerbrok H, Siegert W, Janitschke K. Quantitative detection of *Toxoplasma gondii* DNA in human body fluids by TaqMan polymerase chain reaction. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7, 120-124.

Leão RNQ. Doenças Infecciosas e Parasitárias - Enfoque Amazônico. Belém. Ed. CEJUP. 1997. 885p.

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, 107-114.

Lehmann T, Marcet PL, Graham DH, Dahl ER, Dubey JP. From the cover: globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. *Proc Nat Acad Sci USA.* 2006: 103 11423-11428.

Levine ND. Taxonomy of *Toxoplasma*. *J Protozol.* 1977: 66, 830-834.

Lin MH, Chen TC, Kuo TT, Tseng CC, Tseng CP. Real time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol.* 2000: 38, 4121-4125.

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

Macrì G, Sala M, Linder A, Pettirossi N, Scarpulla M. Comparison of indirect fluorescent antibody test and modified agglutination test for detecting *Toxoplasma gondii* immunoglobulin G antibodies in dog and cat. *Parasitol. Res* 2009: 105: 35-40.

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

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

Medeiros BC, Medeiros CR, Werner B, Loddo G, Pasquini R, Bieggi-Torres LF. Disseminated toxoplasmosis after bone marrow transplantation: report of 9 cases. *Transplant Infectious Disease.* 2001. 3, 24-28.

Meirelles LR Estudo das fontes de infecção da toxoplasmose humana. 2001. 98f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Mentzer A, Perry M, Fitzgerald N, Barrington S, Siddiqui A, Kulasegaram R. Is it all cerebral toxoplasmosis, *Lancet.* 2012: 379, 21-27.

Mesquita RT, Vidal JE, Pereira-Chioccola 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, 346-350.

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*. 2010; 59: 641-647.

Mondragon R, Howe DK, Dubey JP, Sibley LD. Genotypic analysis of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs. *J Parasitol*. 1998. 84, 639-641.

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

Nascimento FS, Suzuki LA, Rossi CL. Assessment of the value of detecting specific IgA antibodies for the diagnosis of a recently acquired primary *Toxoplasma* infection. *Prenatal Diagnosis*. 2008; 28, 749-752.

Neves, DP. *Parasitologia Médica Parasitologia Humana*- 11ed. São Paulo. Editora Atheneu, 2005.

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

Nogueira OAE. *Toxoplasmose: Um problema de saúde Pública*. 2005. 88f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Okay TS, Yamamoto L, Oliveira LC, Manuli ER, Andrade Junior HF, Del Negro GMB. Significant performance variation among PCR systems in diagnosing congenital toxoplasmosis in São Paulo, Brazil: Analysis of 467 amniotic fluid samples. *CLINICS*. 2009; 64: 171-176.

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

Pereira-Chiocola VL, Vidal JE, Su C. *Toxoplasma gondii* infection and cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients. *Future Microbiol*. 2009; 4, 1363-1379.

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

Pinheiro BV, Noviello Mde L, Cunha MM, Tavares AT, Carneiro AC, Arantes RM, Vitor RW. Pathological changes in acute experimental toxoplasmosis with

Toxoplasma gondii strains obtained from human cases of congenital disease. *Exp Parasitol.* 2015;156: 87-94.

Pinon JM, Dumon H, Chemla C, Franck J, Petersen E, Lebech M. Strategy for diagnosis of congenital toxoplasmosis: evaluation of methods comparing mothers and newborns and standard methods for postnatal detection of immunoglobulin G, M, and A antibodies. *J Clin Microbiol.* 2001; 39, 2267- 2271.

Pinon JM, Toubas D, Marx C, Mougeot G, Bonnin A, Bonhomme A. Detection of specific immunoglobulin E in patients with toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 1990; 8, 1739-1743.

Rabaud C, May T, Amiel C, Katlama C, Leport C. Extracerebral toxoplasmosis in patients infected with HIV. A French National Survey. *Medicine (Baltimore).* 1994; 73: 306-314.

Ragozo AMA, Pena HFJ, Yai LEO, Su C, Gennari SM. Genetic diversity among *Toxoplasma gondii* isolates of small ruminants from Brazil: Novel genotypes revealed. *Veterinary Parasitology*; 2010: 170, 307–312.

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

Rey L. *Toxoplasma gondii* e Toxoplasmose. In: *Parasitologia.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.321-334.

Saadatnia G, Golkar M. A review on human toxoplasmosis. *Scand J Infec Dis.* 2012. 1-10.

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

Sanchez MCA. Testes Sorológicos. In: Ferreira AW, Ávila SLM (eds.) *Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes.* Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 2001: p. 9-44.

Schmidt. Clinical features and outcomes in patients with disseminated toxoplasmosis admitted to intensive care: a multicenter study. *Clinical Infectious Diseases*; 2013, 57:1535–1541.

Scorsato AP, Telles JEQ. Factors that affect the quality of DNA extracted from biological samples stored in paraffin blocks. *J Bras Patol Med Lab.* 2011: 47, 541-548.

Shaapan RM, El-Nawawi FA, Tawfik MAA. Sensivity and specificity of various serological tests for the detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected sheep. *Vet Parasitol.* 2008: 153: 359-362.

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

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

Silva LA, Andrade RO, Carneiro AC, Vitor RW. Overlapping *Toxoplasma gondii* genotypes circulating in domestic animals and humans in Southeastern Brazil. PLoS One; 2014: 27, e90237.

Silva MC. Toxoplasmose com ênfase no diagnóstico. Rev Saúde Pub Zoon. 2008: 9, 154-259.

Silva VLM. Construções e redefinições da toxoplasmose. Rev Saúde Púv Zoon. 2008a: 11, 231-238.

Sousa S, Canada N, Correia da Costa JM, Dardé ML. Serotyping of naturally *Toxoplasma gondii* infected meat-producing animals. Vet Parasitol. 2010: 169, 24-28.

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

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

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

Suzuki Y. Host resistance in the brain against *Toxoplasma gondii*. J Infec Dis 2002: 185, 58-65.

Tsukuda, LR. Imunidade humoral na toxoplasmose ocular, Tese (doutorado). Universidade de São Paulo. 2007.

Ueno TEH. Prevalência das infecções por *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em matrizes e reprodutores ovinos de rebanhos comerciais do Distrito Federal. 2005. 122f, Tese (Doutorado). - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Vaudaux JD, Muccioli C, James ER, Silveira C, Magargal SL, Jung C. 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, 1226-1233.

Velmurugan G V, Dubey JP, Su C. Genotyping studies of *Toxoplasma gondii* isolates from Africa revealed that archetypal clonal lineages predominate as in North America and Europe. *Vet Parasitol.* 2008, 155: 314-318.

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

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; 41:3537-3541.


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

Yai LE, Ragozo AM, Soares RM, Pena HF, Su C, Gennari SM. Genetic diversity among capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) isolates of *Toxoplasma gondii* from Brazil. *Vet Parasitol;* 2009: 10; 332-337.

Zakimi S, Kyan H, Oshiro M, Sugimoto C, Xuenan X, Fujisaki K. 2006. Genetic characterization of GRA6 genes from *Toxoplasma gondii* from pigs in Okinawa, Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, 68: 1105-1107.

8. ANEXOS

8.1. Parecer do Comitê de Ética Humana do Instituto Adolfo Lutz (CEPIAL)

INSTITUTO ADOLFO LUTZ/SES 
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Perfil genotípico de *Toxoplasma gondii* isolados de humanos e cães infectados

Pesquisador: Vera Lucia Pereira Chioccola

Área Temática: Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.

Versão: 2

CAAE: 11295212.0.0000.0059

Instituição Proponente: Instituto Adolfo Lutz

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 186.971

Data da Relatoria: 17/01/2013

Apresentação do Projeto:

Sem alterações em relação ao parecer anterior.

Objetivo da Pesquisa:

Sem alterações em relação ao parecer anterior.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Sem alterações em relação ao parecer anterior.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Foram esclarecidas as questões apontadas no parecer anterior.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram esclarecidas as questões apontadas no parecer anterior.

Recomendações:

Foram esclarecidas as questões apontadas no parecer anterior.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Os autores responderam de forma satisfatória às pendências apresentadas.

Entretanto, mantiveram o projeto como Área Temática 3, a qual refere-se a estudo clínico.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 2º andar - Sala 73		
Bairro: Cerqueira César		CEP: 01.246-902
UF: SP	Município: SAO PAULO	
Telefone: (11)3068-2859	Fax: (11)3085-3505	E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com o item IX. 2 da Resolução CNS nº 196/1996 - cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo, sob sua guarda, por 5 anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar, perante o CEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Os relatórios parciais deverão ser encaminhados ao CEPIAL a cada seis meses a partir do início da pesquisa.

SAO PAULO, 18 de Janeiro de 2013

Assinador por:
Luz Marina Trujillo
(Coordenador)

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 2º andar - Sala 73
Bairro: Cerqueira César CEP: 01.246-902
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3068-2859 Fax: (11)3085-3505 E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

8.2. Artigo publicado :

Bastos da Silva I, Batista TP, Martines RB, Kanamura CT, Ferreira IM, Vidal JE, Pereira-Chiocola VL. 2016. Genotyping of *Toxoplasma gondii*: DNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded autopsy tissues from AIDS patients who died by severe disseminated toxoplasmosis. *Exp Parasitol*;165:16-21.



Full length article

Genotyping of *Toxoplasma gondii*: DNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded autopsy tissues from AIDS patients who died by severe disseminated toxoplasmosis



Inara Bastos da Silva ^a, Tatiana Pimental de Andrade Batista ^b, Rosecelis Brasil Martines ^c, Cristina Takami Kanamura ^c, Isabelle Martins Ribeiro Ferreira ^{a,d}, Jose Ernesto Vidal ^{b,e}, Vera Lucia Pereira-Chiocola ^{a,*}

^a Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas e Fungos, Centro de Parasitologia e Micologia, São Paulo, Brazil

^b Instituto de Infectologia Emílio Ribas, São Paulo, Brazil

^c Centro de Patologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brazil

^d Supervisão de Vigilância em Saúde de Santo Amaro/Cidade Ademar, Prefeitura Municipal de São Paulo, Brazil

^e Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brazil

HIGHLIGHTS

- This study investigated the genetic features of *Toxoplasma gondii*.
- DNA was isolated directly in 30 autopsies of brain and lung.
- Cohort of 15 HIV and disseminated toxoplasmosis patients were investigated.
- The analysis was conducted by Multilocus PCR-RFLP genotyping.
- Six suggestive genotypes of *T. gondii* were determined.

GRAPHICAL ABSTRACT

Genotype	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

ARTICLE INFO

Article history:
Received 6 January 2016
Received in revised form
25 February 2016
Accepted 4 March 2016
Available online 10 March 2016

Keywords:
Disseminated toxoplasmosis
Brazilian AIDS patients
Toxoplasma gondii genotyping

ABSTRACT

This study investigated the genetic features of *Toxoplasma gondii* isolated directly in autopsies of HIV-infected patients who died with severe disseminated toxoplasmosis. This retrospective analysis was conducted in a cohort of 15 HIV-infected patients with clinical and laboratory data. They had previous cerebral toxoplasmosis at least 6 months before the disseminated toxoplasmosis episode. The hypothesis was that they were infected with highly virulent parasites due to the condition in which they died. *T. gondii* genotyping was done directly in DNA extracted from 30 autopsy brain and lung samples (2 per patient) and multilocus PCR-RFLP genotyping was done using 12 molecular markers. The 30 clinical samples were genotyped successfully in 8 or more loci and six suggestive genotypes were identified. One of them was Toxo DB #11, previously identified in different domestic animals and virulent in experimental animals. The other five suggestive genotypes identified in 14 patients were not described. **TgHuDis1** was the most frequent and was determined in 8 patients. **TgHuDis3** and **TgHuDis5** were identified in two patients each. **TgHuDis2** and **TgHuDis4** have been identified in one patient each. These