

Ana Carolina de Aguiar Vasconcelos Carneiro

**Caracterização Molecular de
isolados de *Toxoplasma gondii*
obtidos de crianças com
toxoplasmose congênita no Estado
de Minas Gerais**

**Belo Horizonte
Minas Gerais
2011**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG
Instituto de Ciências Biológicas - ICB
Pós-Graduação em Parasitologia

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE
TOXOPLASMA GONDII OBTIDOS DE CRIANÇAS
COM TOXOPLASMOSE CONGÊNITA NO ESTADO DE
MINAS GERAIS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Ricardo Wagner de Almeida Vitor
Co-orientadora: Profa. Dra. Gláucia M. Q. de Andrade

ANA CAROLINA DE AGUIAR VASCONCELOS CARNEIRO

Belo Horizonte
2011

COLABORAÇÃO:

Dra. Adriana de Melo Ferreira – ICB, UFMG

Dr. Daniel V. Vasconcelos-Santos – Setor de Uveíte do HC, UFMG

Dr. José Nélio, NUPAD, UFMG

Dra. Luciana Macedo – Setor de Audiologia do HC, UFMG

Dr. Wesley Ribeiro - Setor de Uveíte do HC, UFMG

Trabalho realizado no Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, com o auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), da Secretaria do Estado de Saúde de Minas Gerais e do Núcleo de Ações e Pesquisa em apoio Diagnóstico (NUPAD) da UFMG.

Dedico este trabalho à Maria Modesta Salvador Aguiar (avó), Vânia S. Aguiar Vasconcelos Carneiro (mãe), à Rosálida Estevan Nazar Lopes (técnica do laboratório de Toxoplasmose -UFMG) e à Júlia Gatti Ladeia Costa (iniciação científica). Pessoas essenciais nesta trajetória tão importante da minha vida. Obrigada pela dedicação, paciência, ensinamentos, entusiasmo, carinho e cuidado. A elas, todo o meu amor e gratidão!

“Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe. Só levo a certeza de que muito pouco eu sei, que nada sei....”

Almir Sater

AGRADECIMENTOS

"A sorrir... eu pretendo levar a vida..."

Cartola

Sobretudo a Deus, por minha maravilhosa vida, pela proteção e por Ele ter colocado pessoas tão especiais em meu caminho.

A minha família por TUDO! Aos meus pais, José Geraldo e Vânia, por me apoiaram incondicionalmente neste trabalho e em todos os meus projetos de vida; sempre serão minha melhor referência, meu horizonte. Aos meus irmãos, Filipe e Marco, Luan e Vitor, pelo companheirismo, carinho, torcida, e incentivo. À Arésia por estar sempre aos nossos lados, obrigada por fazer parte da nossa família!

À toda minha família: vó Modesta, vó Flor, tio Alziro, tia Mirissan, Guigui, Dadaia, Nenessa, Tia Palma, Dindinha Delza, todos tios, tias e primos, que sempre torceram, vibraram e rezaram muito por mim.

Ao meu Orientador, Professor Dr. Ricardo Wagner de Almeida Vitor, que além de toda a dedicação a este nosso trabalho, sempre me incentivou a buscar o conhecimento. Obrigada por ser para mim mais do que um orientador, encontrei em você um amigo, exemplo de pessoa e de profissional. Meu eterno agradecimento!

À minha co-orientadora, Professora Dra. Gláucia M. Q. de Andrade pelo entusiasmo com a toxoplasmose congênita, idéias e sugestões neste trabalho.

À Rosálida Estevan Nazar Lopes, pela enorme colaboração e apoio técnico na realização deste trabalho. Muito obrigado Rosa, pela dedicação, paciência, ensinamentos, carinho de mãe!

Aos amigos do Laboratório de Toxoplasmose: Carlos, Letícia, Anderson, Milena, Renata, Mariana e em especial à Júlia e ao Breno, meus anjos da guarda nessa caminhada. Muito mais que alunos de iniciação científica, vocês se tornaram grandes amigos. Foram muitas conversas, confidências, vocês foram essenciais para tudo isso acontecer. Essa vitória é nossa!

Ao Breno, com poucas palavras é difícil descrever a gratidão e o carinho que sinto por você. Seu entusiasmo, companheirismo e dedicação me contagiaram. A admiração é grande e o carinho e a amizade que ficam são verdadeiros. Você foi peça primordial deste trabalho. Obrigada por estar sempre comigo!

À Dra. Adriana Melo Ferreira pelos ensinamentos, amizade e contribuição para minha formação profissional. Muito bom poder contar sempre com você!

Aos colaboradores, em especial ao Daniel V. Vasconcelos-Santos pelo incentivo e entusiasmo contagiante em relação ao nosso projeto.

Ao Rodrigo Costa da Silva pela disponibilidade e ajuda essencial na construção das árvores filogenéticas. Sua ajuda chegou no momento que eu mais precisava.

À Faculdade de Medicina, Hospital das Clínicas, e Núcleo de Ações e Pesquisas em Apoio Diagnóstico (NUPAD) pelo trabalho desenvolvido, o qual foi a base para o desenvolvimento do presente estudo.

Aos amigos do Departamento de Parasitologia pelos momentos felizes e de descontração. Foram muito boas as conversas de corredores!

Aos amigos do mestrado ("turma do bico"-2004). Agradeço a Deus por ter encontrado grandes e verdadeiras amizades nessa turma, importantes na realização deste trabalho, e sempre importantes na minha vida.

Aos grandes amigos da Biologia, em especial a Ludmila, Andréa, Vânia, Flávia, Marina, Marcela, Nabak, Batata, Erikinha, Nilo, Marcelo, Nicolau pela amizade sincera, pela torcida, e por todos os momentos vividos.

Aos meus eternos amigos: meninas da SEITA (Clara, Júlia, Ana e Deby), Camila, Rafael, Cris...

À secretária da pós-graduação de parasitologia, Sumara, pelo grande apoio, por todos os conselhos, e pelo grande carinho e atenção dedicados a mim e a todos os alunos.

Aos professores do Departamento de Parasitologia, em especial ao Professor Alan Lane de Melo, por ser um exemplo de pesquisador e mestre. Grandes ensinamentos dentro e fora da sala de aula.

Ao departamento de Parasitologia ICB - UFMG, na pessoa do seu chefe Dr. Marcos Pezzi Guimarães e ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia, na pessoa da Dra. Érika Martins Braga, pela grande oportunidade de realizar este trabalho de doutorado e pelo apoio financeiro na divulgação dos resultados em Congressos.

Às crianças e suas mães que de maneira significativa participaram deste trabalho. Agradeço com todo carinho.

SUMÁRIO

RESUMO	XII
ABSTRACT.....	XIV
LISTA DE TABELAS	XVI
LISTA DE FIGURAS	XVII
LISTA DE FLUXOGRAMAS	XVIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XIX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. BIOLOGIA E TRANSMISSÃO DO <i>TOXOPLASMA GONDII</i>	1
1.2. TOXOPLASMOSE CONGÊNITA.....	6
1.2.1. DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA	7
1.2.2. PREVENÇÃO DA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA	15
1.2.3. PREVALÊNCIA DA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA	20
1.2.4. SINAIS CLÍNICOS.....	22
1.3. DIVERSIDADE DO <i>T. GONDII</i>	24
1.3.1. POLIMORFISMO GENÉTICO DO <i>T. GONDII</i> E GENOTIPAGEM	24
1.3.2. VIRULÊNCIA	36
2. JUSTIFICATIVA.....	39
3. OBJETIVOS:.....	41
3.1. OBJETIVO GERAL.....	41
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4. MATERIAL E MÉTODOS:	42
4.1. PACIENTES.....	42
4.2. COLETA DE SANGUE.....	50
4.3. DETECÇÃO DE <i>TOXOPLASMA GONDII</i> EM SANGUE DE RECÉM NASCIDOS POR PCR DO GENE B1	50
4.4. ISOLAMENTO DO <i>T. GONDII</i> POR BIOENSAIO.....	52
4.4.1. MANUTENÇÃO DOS NOVOS ISOLADOS DE <i>TOXOPLASMA GONDII</i>	53
4.4.2. CRIOPRESERVAÇÃO DE TAQUIZOÍTOS DOS NOVOS ISOLADOS.....	53
4.4.3. OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DE TAQUIZOÍTOS DE <i>TOXOPLASMA GONDII</i>	54
4.5. DETERMINAÇÃO DA VIRULÊNCIA DE ISOLADOS DE <i>TOXOPLASMA GONDII</i>	55
4.5.1. CRITÉRIOS DE CLASSIFICAÇÃO DA VIRULÊNCIA DOS ISOLADOS DE <i>TOXOPLASMA GONDII</i>	56
4.5.2. ELISA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IGG ANTI- <i>T. GONDII</i> EM CAMUNDONGOS.....	57
4.5.2.1. OBTENÇÃO DO ANTÍGENO SOLÚVEL DE <i>TOXOPLASMA GONDII</i> (STAG) ..	57
4.5.2.2. ELISA	57
4.6. CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE <i>T. GONDII</i> ISOLADO DE RECÉM NASCIDOS COM TOXOPLASMOSE CONGÊNITA	59
4.6.1. EXTRAÇÃO DE DNA.....	59
4.6.2. ANÁLISE GENÉTICA POR POLIMORFISMO POR TAMANHO DE FRAGMENTO DE RESTRIÇÃO (PCR-RFLP).....	59
4.7. ANÁLISE DOS RESULTADOS	61
5. RESULTADOS.....	64
5.1. DETECÇÃO DE <i>TOXOPLASMA GONDII</i> EM SANGUE DE RECÉM NASCIDOS PELA PCR	64
5.2. ISOLAMENTO DO <i>T. GONDII</i> POR BIOENSAIO.....	68
5.3. DETERMINAÇÃO DA VIRULÊNCIA DE ISOLADOS DE <i>TOXOPLASMA GONDII</i>	77

5.4. CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE ISOLADOS DE <i>T. GONDII</i> OBTIDOS DE RECÉM NASCIDOS COM TOXOPLASMOSE CONGÊNITA POR POLIMORFISMO POR TAMANHO DE FRAGMENTO DE RESTRIÇÃO (PCR-RFLP)	88
6. DISCUSSÃO	98
6.1. DIAGNÓSTICO MOLECULAR DO TOXOPLASMA GONDII (NESTED PCR DO GENE B1) EM SANGUE DE RECÉM NASCIDOS	98
6.2. ISOLAMENTO DO <i>T. GONDII</i> EM SANGUE PERIFÉRICO	107
6.3. VIRULÊNCIA DOS ISOLADOS	112
6.4. GENOTIPAGEM DO <i>T. GONDII</i>	116
7. CONCLUSÕES	131
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133
9. ANEXOS	150

RESUMO

Toxoplasma gondii é um parasito apicomplexo amplamente distribuído de grande importância médica. Em humanos, a transmissão congênita tem sido responsabilizada pela ocorrência de abortos, natimortos, debilidade e mortalidade neonatal. A infecção por *T. gondii* pode ser diagnosticada indiretamente, através de métodos sorológicos, e diretamente por isolamento do parasito em camundongos (bioensaio) e pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Através do Programa Estadual de Triagem Neonatal em Minas Gerais, 146.307 crianças foram submetidas à pesquisa de anticorpos IgM anti-*T. gondii*, em amostras de sangue seco em papel filtro. Dessas, 220 que apresentaram resultado positivo/duvidoso foram selecionadas para este estudo. Foram coletadas amostras de sangue periférico desses recém nascidos para PCR e bioensaio. A toxoplasmose foi confirmada em 178 crianças que apresentaram anticorpos IgG persistentes até o 12^o mês de vida. A amplificação do gene B1 por *nested* PCR foi realizada em todas as amostras de sangue verificando 64/220 (29,1%) crianças positivas por PCR (31,46% de sensibilidade e 80,95% de especificidade). A *nested* PCR do gene B1 não se mostrou suficientemente sensível e específica para ser uma ferramenta útil para o diagnóstico da toxoplasmose congênita em amostras de sangue periférico de recém-nascidos. Através do bioensaio foram obtidos 27 isolados de *T. gondii*. A presença do *T. gondii* foi evidenciada no sangue em 15,2% (27/178) dos recém-nascidos com toxoplasmose congênita. Os isolados foram divididos em três grupos de acordo com o fenótipo de virulência para camundongos. Quatorze isolados (54%) foram caracterizados como de virulência intermediária, dez (38%) como virulentos e apenas dois (8%) foram identificados como avirulentos. A variabilidade genética dos isolados foi analisada por Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) em 11 *loci* (SAG1, 5'3'SAG2, SAG2 alt, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico). As cepas RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como cepas de referência. O genótipo completo foi obtido em 25/27 (92,6%) dos isolados. Quatorze genótipos diferentes foram identificados, sendo doze novos genótipos, e um isolado com infecção mista. Dois genótipos encontrados são comuns no Brasil (BrII e BrIII). Não foi identificado nenhum genótipo

arquétipo tipo I, II ou III nos isolados estudados. Não foi observada associação entre os sinais clínicos da toxoplasmose congênita e os resultados obtidos pelo diagnóstico molecular, bioensaio, virulência e genotipagem dos isolados. Este estudo confirma a variabilidade genotípica do parasito no Brasil além de ser o primeiro registro de genotipagem de isolados de sangue de recém nascidos em nosso país.

Palavras Chave: Toxoplasmose congênita, *Toxoplasma gondii*, diagnóstico molecular, gene B1, sangue periférico, isolamento, genotipagem, PCR-RFLP

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is a widely distributed Apicomplexa parasite with great medical importance. Congenital toxoplasmosis has been associated with abortion and stillborn, debility and neonatal mortality. Toxoplasmosis can be diagnosed through serologic methods or by directed methods: parasite isolation in mice (bioassay) or Polymerase Chain Reaction assay (PCR). The *Programa Estadual de Triagem Neonatal* (Neonatal Screening State Program) in Minas Gerais state, evaluated 146.307 children by anti-*T. gondii* IgM antibodies search, using blood samples dried in filter paper. Out of those, 220 newborns presented positive/doubtful results and were selected for this study. New blood samples were collected from newborns for PCR and bioassay. Toxoplasmosis was confirmed in 178 children who had specific IgG antibodies after 12 months. The B1 gene amplification by nested PCR was performed on all 220 blood samples. Sixty-four (29,1%) children presented positive results by PCR (31,46% sensibility and 80,95% specificity). This PCR in peripheral blood was not sufficiently sensitive or specific to be considered as an useful tool for the diagnosis of congenital toxoplasmosis in newborns. Using bioassay in mice, 27 *T. gondii* isolates were obtained. Parasitemia was detected in 15,2% (27/178) of newborns with congenital toxoplasmosis. *T. gondii* isolates were divided into three different groups according to the virulence in mice: Fourteen isolates (54%) were characterized as intermediate virulence, ten (38%) as virulent and only two (8%) as avirulent isolates. The genetic variability was assessed by Restricted Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) in 11 *loci* (SAG1, 5'+3'SAG2, SAG2 alt, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, *PK1*, Apico). The strains RH (Type I), ME49 (Type II) and VEG (Type III) were used as references strains. The complete genotyping was achieved in 25/27 isolates (92,6%). Fourteen different genotypes were identified: two previously described genotypes, common in Brazil (BrII and BrIII) and twelve new genotypes. One isolate presented mixed infection. No archetypal I, II or III genotype were found in the isolates studied. It was not observed association between clinical signs of congenital toxoplasmosis and the results obtained by molecular diagnosis, bioassay, virulence or genotyping of the isolates. This is the first report of

isolation and genotyping of *T. gondii* from newborns blood in Brazil and confirms the genotypic variability of the parasites in our country.

Keywords: Congenital Toxoplasmosis, *Toxoplasma gondii*, molecular diagnostic, peripheral blood, isolation, PCR-RFLP genotyping

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Segmentos de DNA utilizados na análise de RFLP, com os iniciadores para amplificação e as endonucleases de restrição de polimorfismo.	63
Tabela 2. Avaliação da sensibilidade, especificidade, razão de verossimilhança, e índice <i>Kappa</i> da PCR-B1 utilizando como teste referência a persistência de IgG anti – <i>T. gondii</i> após o 12º mês de vida.	65
Tabela 3. Associação entre o resultado da PCR-B1 (diagnóstico molecular) e presença ou ausência de lesão ocular (p= 0,3047).....	67
Tabela 4. Associação entre o resultado da PCR-B1 (diagnóstico molecular) e presença ou ausência de déficit auditivo (p=0,4986).....	67
Tabela 5. Associação entre o resultado da PCR-B1 (diagnóstico molecular) e presença ou ausência de calcificações cerebrais (p= 0,1984).....	67
Tabela 6. Avaliação da sensibilidade, especificidade, razão de verossimilhança, e índice <i>Kappa</i> do bioensaio utilizando como teste referência a persistência de IgG anti- <i>T. gondii</i> após o 12º mês de vida.	69
Tabela 7. Avaliação da sensibilidade, especificidade, razão de verossimilhança, e índice <i>Kappa</i> do bioensaio e/ou PCR-B1 utilizando como teste referência a persistência de IgG anti- <i>T. gondii</i> após o 12º mês de vida.....	70
Tabela 8. Isolados de <i>Toxoplasma gondii</i> de acordo com as características dos recém-nascidos de onde foram obtidos o sangue periférico para o isolamento.....	73
Tabela 9. Associação entre isolamento do <i>Toxoplasma gondii</i> por bioensaio e presença ou ausência de lesão oftalmológica (p= 0.4099).....	76
Tabela 10. Associação entre isolamento do <i>Toxoplasma gondii</i> por bioensaio e presença ou ausência de déficit auditivo (p=0,1412).....	76
Tabela 11. Associação entre isolamento do <i>Toxoplasma gondii</i> por bioensaio e presença ou ausência de calcificações cerebrais (p=0,1536).....	76
Tabela 12. Classificação da virulência dos isolados de <i>T. gondii</i> em camundongos BALB/c....	84
Tabela 13. Associação entre a virulência dos isolados de <i>T. gondii</i> em camundongos e presença ou ausência de lesão oftalmológica em crianças com toxoplasmose congênita (p = 0.6404).	86
Tabela 14. Associação entre a virulência dos isolados de <i>T. gondii</i> em camundongos e presença ou ausência de déficit auditivo em crianças com toxoplasmose congênita (p=0,5169)	86
Tabela 15. Associação entre a virulência dos isolados de <i>T. gondii</i> em camundongos e presença ou ausência de calcificações cerebrais em crianças com toxoplasmose congênita (p=0,9314)	87
Tabela 16. Perfil genotípico e de virulência das amostras de <i>T. gondii</i> isolados em sangue periférico de recém nascidos de MG.	91
Tabela 17. Associação entre os genótipos de isolados de <i>Toxoplasma gondii</i> com a mesorregião de origem, apresentação clínica no recém nascido e virulência em camundongos.	92

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Proporção de crianças com toxoplasmose congênita identificadas no período de novembro de 2006 a maio de 2007 pela triagem neonatal, de acordo com a divisão por macrorregião de UBS (Unidade Básica de Saúde), em Minas Gerais (1 para X nascidos vivos)..... 45
- Figura 2.** Nested PCR do gene B1. Pacientes 01 à 43. CN: controle negativo; DNA extraído de sangue de paciente não infectado com toxoplasmose. RH: controle positivo; DNA extraído de sangue negativo para a toxoplasmose adicionado de 100 taquizoítos/mL da cepa RH. ME49: controle positivo; DNA extraído de taquizoítos da cepa ME49. 64
- Figura 3.** Localização da origem dos isolados de *T. gondii* proveniente de recém nascidos nas doze mesorregiões em Minas Gerais. * isolados de *T. gondii*..... 71
- Figura 4.** Mortalidade acumulativa em camundongos fêmeas BALB/c inoculados pela via intraperitoneal com diferentes doses de taquizoítos dos isolados classificados como avirulentos: ME49 (cepa padrão), TgCTBr5 e TgCTBr10 do *Toxoplasma gondii*. 79
- Figura 5.** Mortalidade acumulativa em camundongos fêmeas BALB/c inoculados pela via intraperitoneal com diferentes doses de taquizoítos dos isolados classificados como de virulência intermediária: TgCTBr2, TgCTBr7, TgCTBr12, TgCTBr14, TgCTBr15, TgCTBr16, TgCTBr18, TgCTBr19, TgCTBr20, TgCTBr21, TgCTBr22, TgCTBr24, TgCTBr26, TgCTBr27 do *Toxoplasma gondii*. 81
- Figura 6.** Mortalidade acumulativa em camundongos fêmeas BALB/c inoculados pela via intraperitoneal com diferentes doses de taquizoítos dos isolados classificados como virulentos: RH (cepa padrão), TgCTBr1, TgCTBr3, TgCTBr4, TgCTBr8, TgCTBr9, TgCTBr11, TgCTBr13, TgCTBr17, TgCTBr23, TgCTBr25 do *Toxoplasma gondii*. 83
- Figura 7:** Análise filogenética dos isolados de *T. gondii* em sangue de recém nascidos de MG, com base em 11 marcadores genéticos.....96
- Figura 8:** Análise filogenética dos isolados de *T. gondii* obtidos no presente estudo, juntamente com os descritos por Dubey et al (2007), Pena et al (2008), Dubey et al (2008), Silva et al (2011) e Frazão-Teixeira et al (2011).....97

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1. Identificação das 178 crianças infectadas (toxoplasmose congênita) e 42 crianças controle não infectadas pelo *T. gondii* participantes deste estudo..... 48

Fluxograma 2. Exames clínicos nas 178 crianças infectadas (grupo TC) e em 42 crianças controle (C). Avaliação oftalmológica, calcificações cranianas e déficit auditivo. Retinocoroidite ativa (grupo RA), cicatrizada (grupo RC) e ativa + cicatrizada (grupo RAC), calcificações cerebrais (grupo CC), sem calcificações cerebrais (grupo SCC), comprometimento auditivo (grupo CA), sem comprometimento auditivo (grupo SCA).....49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	- Síndrome da imunodeficiência adquirida
C	- Controle
CA	- Comprometimento auditivo
CC	- Calcificações cerebrais
CETEA	- Comitê de ética em experimentação animal
COEP	- Comitê de ética em pesquisa
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DNA	- Ácido desoxiribonucléico
dATP	- 2'-deoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	- 2'-deoxicitosina 5'-trifosfato
dGTP	- 2'-deoxiguanosina 5'-trifosfato
DL	- Dose letal
dTTP	- 2'-deoxitimidina 5'-trifosfato
EDTA	- Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	- <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> : teste imunoenzimático
GBTC	- Grupo Brasileiro de toxoplasmose congênita
HC	- Hospital das Clínicas
ICB	- Instituto de Ciências Biológicas
IgG	- Imunoglobulina G
IgM	- Imunoglobulina M
IgA	- Imunoglobulina A
IL	- Interleucina
INF- γ	- Interferon-gama
i.p.	- intraperitoneal
M	- Molar
Mb	- Megapares de bases
mL	- Mililitro(s)
mM	- Milimolar
Ng	- Nanograma(s)
NUPAD	- Núcleo de Ações e Pesquisa em apoio Diagnóstico
PB	- Pares de bases
PBS	- Solução de fosfato tamponada
PBS-T	- Solução de fosfato tamponada Tween 20
PEAT	- Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico
PCR-B1	- Reação em cadeia da polimerase do gene B1
pmol	- Picomol(s)
RA	- Retinocoroidite ativa
RAC	- Retinocoroidite ativa e cicatrizada
RAPD	- Amplificação aleatória de DNA polimórfico
RC	- Retinocoroidite cicatrizada
RFLP	- Polimorfismo por tamanho de fragmento de restrição
RIFI	- Reação de imunofluorescência indireta
SCA	- Sem comprometimento auditivo
SCC	- Sem calcificações cerebrais
SL	- Sem lesão
SNC	- Sistema nervoso central
SSR	- Seqüências simples repetidas

STag	- Antígeno solúvel de <i>Toxoplasma</i>
Taq	- <i>Thermophilus aquaticus</i>
TA	- Tampão de amostra
TC	- Toxoplasmose congênita
TgCTBr	- <i>Toxoplasma gondii</i> -Congenital Toxoplasmosis-Brasil
TNF- α	- Fator de necrose tumoral- α
UBS	- Unidade básica de Saúde
PCR-B1	- reação em cadeia pela polimerase para o gene B1
PEATE	- potencial evocado auditivo de tronco encefálico

1. INTRODUÇÃO

1.1. BIOLOGIA E TRANSMISSÃO DO *TOXOPLASMA GONDII*

O *Toxoplasma gondii* é um parasito intracelular obrigatório, de distribuição mundial, podendo ser encontrado parasitando uma grande variedade de hospedeiros vertebrados (Dubey & Beattie 1988; Carruthers 2002). Este protozoário foi descrito simultaneamente no Brasil por SPLENDORE, em coelho (*Oryctolagus cuniculus*) e por NICOLLE & MANCEAUX no Norte da África em um roedor (*Ctenodactylus gundi*), ambos em 1908. O *T. gondii* pertence ao Filo Apicomplexa, à Classe Conoidasida, à Sub-classe Coccidia, à Ordem Eucoccidiida, à Família Sarcocystidae e à Sub-família Toxoplasmatinae (Levine et al. 1980; Levine 1988).

O ciclo do *T. gondii* é heteroxeno facultativo, sendo os hospedeiros definitivos membros da Família Felidae e os hospedeiros intermediários provavelmente todos os animais homeotérmicos (mamíferos e aves) inclusive seres humanos (Tenter et al. 2000). As duas principais formas envolvidas na transmissão do parasito são o cisto tecidual (contendo bradizoítos) e o oocisto (contendo esporozoítos).

No epitélio intestinal dos hospedeiros definitivos o parasito inicia uma fase assexuada de proliferação através de uma série de esquizogonias nos enterócitos. Após essa fase proliferativa acontece a diferenciação de gametas, fecundação e formação de oocisto. Os hospedeiros definitivos eliminam em suas fezes oocistos imaturos, não esporulados, que em condições ambientais

propícias como temperatura, umidade e oxigenação ideais, esporulam e se tornam infectantes. Após a esporogonia, cada oocisto esporulado de *T. gondii* possui em seu interior dois esporocistos, cada um contendo quatro células haplóides denominadas esporozoítos (Tenter et al. 2000; Montoya & Liesenfeld 2004). A ingestão do oocisto pode ocorrer através de água e alimentos contaminados (Hill et al. 2005). Entre os três estágios infecciosos do *T. gondii*, o oocisto é o mais virulento, quando comparado com taquizoítos ou bradizoítos para hospedeiros não felinos (Dubey & Beattie 1988).

Associação entre surtos de toxoplasmose e a contaminação de fontes de água por oocistos classificou o *T. gondii* como agente de prioridade categoria B pelo *National Institute of Allergy and Infectious Disease* (NIAID) (Kim & Weiss 2008).

Além da ingestão de oocistos, a transmissão oral ocorre também pela ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cistos teciduais que são formas de resistência do parasito formadas nos tecidos de mamíferos ou aves. Após a ingestão, ocorre o rompimento da parede externa dos oocistos ou cistos teciduais por degradação enzimática e as formas infectantes (esporozoítos ou bradizoítos) invadem o epitélio intestinal dos hospedeiros intermediários onde rapidamente se diferenciam em taquizoítos (formas de multiplicação rápida), e sofrem intensa multiplicação por divisão assexuada (Dubey 1988; Gross et al. 2004). Os taquizoítos penetram em qualquer célula nucleada e a propagação do *T. gondii* no hospedeiro ocorre pelo rompimento de células infectadas, através de taquizoítos livres no sangue circulante ou na linfa. A infecção é

sistêmica pode provocar um quadro polissintomático, cuja gravidade dependerá da quantidade de formas infectantes adquiridas, da susceptibilidade do hospedeiro e da cepa do parasito (Tenter et al. 2000).

Os taquizoítos não possuem grande importância na transmissão do *T. gondii* (infecções adquiridas pós natais em indivíduos imunocompetentes), uma vez que a parasitemia geralmente ocorre por um curto período de tempo após a infecção primária (Tenter et al. 2000).

Embora o parasito seja intracelular, alguns estudos relatam a presença e a viabilidade de alguns poucos taquizoítos por breves períodos em meio extracelular (líquidos intersticiais e exsudatos) (Chiari & Neves 1984; Vitor et al. 1991). Porém acredita-se que esses taquizoítos possuem pouca relevância na disseminação da doença (Unno et al. 2008).

O período inicial da infecção caracteriza a fase aguda da toxoplasmose onde os taquizoítos se multiplicam rapidamente por repetidas endodiogenias em diferentes tipos de células. Durante essa fase proliferativa, a toxoplasmose pode causar a morte do hospedeiro (principalmente em fetos ou indivíduos imunossuprimidos). Porém, em casos de indivíduos imunocompetentes, com o desenvolvimento da resposta imune, a multiplicação dos taquizoítos é interrompida e ocorre a formação de cistos teciduais contendo bradizoítos, formas de multiplicação lenta, o que caracteriza a fase crônica da infecção sem sintomatologia significativa no hospedeiro (Filisetti & Candolfi 2004; Gross et al. 2004; Hill et al. 2005).

Estes cistos teciduais se localizam predominantemente no sistema nervoso central, retina e na musculatura esquelética e cardíaca e quando intactos não causam nenhum dano podendo persistir por toda a vida do hospedeiro (Hill et al. 2005). O mecanismo dessa permanência indefinida dos cistos nos tecidos dos hospedeiros não é muito bem compreendido, entretanto, alguns pesquisadores acreditam que periodicamente alguns cistos se rompem, liberando os bradizoítos que se transformam em taquizoítos, invadindo novas células formando assim novos cistos (Tenter et al. 2000). Além disso, hoje já são conhecidos alguns mecanismos anti-apoptóticos mediados pelo parasito na célula infectada (Laliberte & Carruthers 2008). Em casos de supressão do sistema imune do hospedeiro, os cistos se tornam reservatórios para a reativação da toxoplasmose e o desenvolvimento de infecções locais e até mesmo infecções disseminadas (Montoya & Liesenfeld 2004).

O ciclo do *T. gondii* pode ser mantido apenas nos hospedeiros intermediários através de expansões clonais do parasito proveniente da ingestão de cistos teciduais de outro hospedeiro intermediário infectado (Tenter et al. 2000).

Outra importante forma de infecção por *T. gondii* ocorre pela via transplacentária onde os taquizoítos são capazes de atravessar a placenta estando assim envolvidos na transmissão vertical da toxoplasmose. A transmissão transplacentária tem sido responsabilizada pela ocorrência de abortamentos, natimortos, debilidade e mortalidade neonatal, tanto no homem como em outros animais (Tenter et al. 2000).

As fontes de infecção variam em diferentes populações com diferentes culturas e hábitos alimentares (Dubey 1996; Tenter et al. 2000; Jones et al. 2003). A infecção pode ocorrer ainda por outros mecanismos de transmissão como transplantes de órgãos, acidentes laboratoriais e ingestão de leite cru (Hill & Dubey 2002).

A prevalência da infecção por *T. gondii* em humanos é alta, com estimativas de infecção crônica em indivíduos adultos variando de 15% a 85%, dependendo da região geográfica (Dubey & Beattie 1988). No Brasil a prevalência varia de 54% na Região Centro-Oeste a 75% na Região Norte do país (Galisteu et al. 2007).

A infecção por *T. gondii* é geralmente assintomática, entretanto a toxoplasmose é mais grave nos casos de transmissão congênita e em indivíduos imunodeficientes. E mesmo entre esses indivíduos mais susceptíveis, existe uma grande variabilidade na gravidade da toxoplasmose (Howe et al. 1997).

Atualmente esta parasitose tem sido relatada como séria infecção oportunista, associada a AIDS, sendo que 25% dos indivíduos que apresentam co-infecção desenvolvem toxoplasmose encefálica (Tenter et al. 2000; Bhopale 2003; Sukthana 2006).

1.2. TOXOPLASMOSE CONGÊNITA

A transmissão congênita pode ocorrer durante a primoinfecção de fêmeas, no período de gestação, quando taquizoítos do *T. gondii* podem ser transmitidos ao feto pela via transplacentária (Tenter et al. 2000; Jones et al. 2003; Kravetz et al. 2005).

De acordo com Dunn et al. (1999), cerca de 20 a 30% dos fetos podem ser infectados se a primoinfecção ocorrer durante a gravidez. Portanto nem todas as infecções pelo *T. gondii*, durante a gestação, são transmitidas ao feto. Na ausência de tratamento, a incidência de infecção fetal é de aproximadamente 10% a 15% durante o primeiro trimestre da gestação, de 30% no segundo trimestre e de 60% no terceiro trimestre (Wong & Remington 1994).

A relação entre idade gestacional, taxa de transmissão e gravidade da toxoplasmose congênita é conhecida. Casos mais graves ocorrem quando gestantes se infectam em idades gestacionais prematuras e transmitem o parasito para o feto. Nestes casos o risco de transmissão é baixo. Risco de transmissão mais elevado ocorre quando a soroconversão materna acontece entre 24 e 30 semanas de gestação. Durante este período, o risco de nascimento de criança com sintomas clínicos detectáveis é de 10% (Pinardi et al. 2003).

De acordo com Desmonts (1985) aproximadamente 5% das mulheres que soropositivaram até 12 semanas de gestação e 80% daquelas que tiveram a soroconversão pouco antes do parto, transmitem a infecção para o feto. Ao

contrário, o risco de sinais clínicos em recém nascidos infectados diminui de 60% para fetos de mulheres que tiveram a soroconversão até a 12ª semana de gestação, para aproximadamente 5% para aquelas que tiveram a soroconversão próximo do parto.

Infecções anteriores à gestação oferecem um risco muito pequeno para o feto, caso ocorram no mínimo três meses antes da concepção (Montoya & Liesenfeld 2004). Uma gestante imunocompetente e com infecção crônica não apresenta risco significativo de transmitir a infecção para o feto (Sensini 2006) mas em raros casos, pode ocorrer em consequência à reativação da infecção (Rorman et al. 2006) ou reinfecção por cepas de diferentes genótipos (Gavinet et al. 1997; Elbez-Rubinstein et al. 2009). Embora existam poucos registros na literatura, é prudente que a gestante soropositiva para toxoplasmose também seja orientada a respeito das medidas profiláticas que devem ser adotadas (Brandão et al. 2009; Elbez-Rubinstein et al. 2009).

1.2.1. DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA

O diagnóstico clínico da toxoplasmose congênita é na maioria das vezes impreciso, pois quando sintomática, as manifestações clínicas podem ser facilmente confundidas com outras patologias (Tenter et al. 2000). Além disso, a infecção congênita pode permanecer latente por um longo período podendo, ser reativada durante a puberdade, pela influência hormonal, ou mesmo na vida adulta (Amato & Marchi 2002).

A presença do *T. gondii* pode ser diagnosticada indiretamente por métodos sorológicos ou diretamente através de bioensaio, cultura celular, imunohistoquímica ou pelo diagnóstico molecular através da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) em sangue, líquido amniótico ou placenta (Montoya & Liesenfeld 2004; Rorman et al. 2006).

A identificação direta do parasito por cultura celular ou isolamento através do bioensaio é considerada padrão ouro para a definição da infecção, mas são métodos demorados, laboriosos, de custo elevado além de serem poucos sensíveis (Castro et al. 2001; Kompalic-Cristo et al. 2007; Abdul-Ghani 2011). Sabe-se que parasitemia é detectável de forma intermitente em alguns pacientes (Hitt & Filice 1992).

A sorologia é um dos principais métodos utilizados para estabelecer o diagnóstico da toxoplasmose. Baseia-se na pesquisa de anticorpos de diferentes classes de imunoglobulinas (IgG, IgM, IgA, e, mais raramente, IgE) anti-*T. gondii* e de acordo com o perfil sorológico apresentado pelo indivíduo pode-se determinar a fase da infecção (aguda ou crônica). Os testes sorológicos mais comumente utilizados são a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), o Teste de Aglutinação Modificada (MAT), o *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) convencional, de captura (IgM ou IgA) ou de avidéz para IgG, o *Immunosorbent Agglutination Assay* (ISAGA) e *Imunoblotting* (IB) (Remington et al. 2005; Rorman et al. 2006).

Técnicas moleculares, além da sorologia, também têm sido utilizadas para a realização do diagnóstico de toxoplasmose congênita. A amplificação de segmentos específicos pela PCR permite a identificação do *T. gondii* em amostras clínicas quando o parasito está presente em pequeno número ou mesmo em fragmentos (Kompalic-Cristo et al. 2005). O diagnóstico molecular é mais comumente realizado em líquido amniótico, sangue de cordão umbilical do feto, em líquido cefalorraquidiano, material de biópsia cerebral e lavagem bronco-alveolar e em alguns casos sangue periférico de recém nascidos (Montoya & Liesenfeld 2004; Remington et al. 2004; Abdul-Ghani 2011).

A realização da PCR como diagnóstico para a toxoplasmose se torna uma boa opção por ser uma técnica não invasiva dependendo do tipo de amostra, rápida, apresentando altas especificidade e sensibilidade, especialmente quando se utiliza a *nested* PCR (Burg et al. 1989; Ho-Yen et al. 1992). Guy & Joynton (1995) demonstraram a importância do diagnóstico molecular complementando e reafirmando os resultados sorológicos principalmente em casos de infecção aguda.

Diferentes iniciadores têm sido utilizados para a realização do diagnóstico molecular (Jones et al. 2000). Inicialmente, o alvo comumente utilizado era o gene P30 de cópia única e que codifica o principal antígeno de superfície do *T. gondii* (SAG1) (Burg et al. 1988; Abdul-Ghani 2011). Em busca de uma melhor sensibilidade outras sequências-alvo foram utilizadas. De acordo com a literatura, um dos genes mais utilizados é o B1 (2,2Kb) que se encontra repetido em 35 cópias no genoma do *T. gondii*. Esse gene B1 foi descrito por

Boothroyd et al. em 1987 e demonstrou alta sensibilidade sendo capaz de detectar até 1 parasito em cerca de 100 mil células hospedeiras (Burg et al. 1989). Além disso, o B1, por ser uma região conservada do genoma do *T. gondii*, é altamente específico (Kompalic-Cristo et al. 2005, Abdul-Ghani 2011).

Segundo Montoya & Liesenfeld (2004), a realização da PCR para detecção do gene B1 de *T. gondii* no sangue periférico, líquido e urina deve ser considerada em todo neonato com suspeita de toxoplasmose. Fuentes et al. (1996) amplificaram o gene B1 nessas diferentes amostras de neonatos sendo confirmada a infecção congênita e o início de tratamento específico. Os autores sugerem que o uso da *nested* PCR como diagnóstico da toxoplasmose em crianças infectadas congenitamente.

A detecção de *T. gondii* em sangue venoso e placenta de gestante foi avaliada por Spalding et al. (2002). Os autores efetuaram as ampliações com iniciadores para o gene B1 e para o gene TGR sendo que as reações se mostraram sensíveis e específicas evidenciando a presença de um a dez taquizoítos nas amostras analisadas. Guy & Johnson (1995) também realizaram o diagnóstico molecular utilizando o sangue periférico. Foram obtidos resultados positivos em pacientes na fase aguda da infecção, entretanto os autores ressaltam que a PCR negativa não exclui a infecção recente.

Apesar de o sangue ser uma amostra conveniente e promissora para o diagnóstico da infecção humana, os procedimentos para utilização da PCR

neste tipo de amostra não estão totalmente estabelecidos. (Ho-Yen et al. 1992).

O líquido amniótico normalmente é a amostra biológica mais utilizada para a realização do diagnóstico da toxoplasmose congênita por ser de fácil obtenção, segura e pode ser utilizada mais precocemente quando comparado com o sangue periférico do recém nascido (Abdul-Ghani 2011). Segundo Antsaklis et al. (2002) a PCR em líquido amniótico para amplificação do DNA do *T. gondii* é a melhor ferramenta para diagnosticar a transmissão vertical da toxoplasmose.

Foulon et al. (1999) encontraram altas taxas de sensibilidade (81,0%) e especificidade (96,0%) para a PCR realizada em líquido amniótico, demonstrando que esta técnica é a mais indicada para a realização do diagnóstico pré-natal quando comparada com o bioensaio e cultura celular. Corroborando esses resultados, Bessieres et al. 2009, demonstram que a sensibilidade e especificidade da PCR em fluídos amnióticos são de 91% e 99%, respectivamente, comparados com 71% e 100% para o isolamento em camundongos. Apesar de Jenum et al. (1998) encontrarem a mesma sensibilidade para essas duas técnicas, os autores discutem que a PCR é a melhor escolha principalmente em casos de tratamentos com anti-parasitários anteriores à amniocentese pela capacidade da técnica em detectar parasitos não viáveis.

Castro et al. (2001) avaliaram a eficácia da PCR em líquido amniótico para diagnóstico fetal da toxoplasmose congênita em gestantes em fase aguda da

infecção. De modo contrário aos outros estudos, os autores encontraram taxas moderadas de sensibilidade (66,7%) e especificidade (87,1%) concluindo que a PCR não deve ser utilizada isoladamente para o diagnóstico da toxoplasmose congênita. Esses dados corroboram com Romand et al. (2001) que avaliaram o uso da PCR em líquido amniótico como diagnóstico pré-natal para a toxoplasmose em 270 mulheres que adquiriram a infecção primária durante a gravidez. Dos 75 casos de infecção congênita, apenas 48 foram positivos pelo diagnóstico molecular demonstrando uma baixa sensibilidade (64%) da técnica.

Diversos trabalhos indicam alta sensibilidade e especificidade para marcadores que amplificam diferentes regiões do gene B1 em outros tipos de amostras clínicas (Colombo et al. 2005; Jones et al. 2000; Chabbert et al. 2004). A PCR tem se mostrado como uma boa ferramenta para o diagnóstico da toxoplasmose cerebral (Colombo et al. 2005; Mesquita et al. 2010), extracerebral e pulmonar (Khalifa et al. 1994).

Colombo et al (2005) utilizando a PCR do gene B1 como diagnóstico para toxoplasmose cerebral em amostras de sangue periférico de pacientes com AIDS encontraram 80% e 98% de sensibilidade e especificidade respectivamente. Um estudo realizado em Cuba utilizou a *nested* PCR do gene B1 com objetivo de diagnosticar o *T. gondii* em fluido cefalorraquidiano de pacientes com AIDS. Os resultados demonstraram uma sensibilidade moderada de 75% e alta especificidade (Alfonso et al. 2009). Esses autores concluem que a *nested* PCR do gene B1 é suficientemente sensível e

específica para ser utilizada como uma importante ferramenta no diagnóstico da toxoplasmose cerebral em indivíduos com AIDS.

Mesquita et al. (2010) avaliaram a PCR utilizando o alvo B1 em sangue periférico no diagnóstico de toxoplasmose cerebral em pacientes brasileiros. Foi demonstrada alta sensibilidade e especificidade em amostras de líquido cefalorraquidiano de pacientes com AIDS.

Kompalic-Cristo et al. (2004) através das amplificações do gene B1 em 42 pacientes do Rio de Janeiro encontraram falha na especificidade da técnica molecular. Os autores sugerem que os iniciadores utilizados podem co-amplificar sequências humanas. O mesmo grupo em 2007 (Kompalic-Cristo et al.) avaliou diferentes iniciadores ainda para o gene B1 através da *Real Time* PCR com objetivo de detectar e quantificar o *T. gondii* presente em amostras de sangue periférico de pacientes nas fases aguda ou crônica da infecção. Neste trabalho, os autores encontraram uma boa especificidade (95,3%), porém uma baixa sensibilidade (48,6%).

Outros iniciadores têm sido utilizados para o diagnóstico molecular. O 18S rDNA é considerado um bom alvo por ter centenas de repetições no genoma do parasito tornando a PCR mais sensível em amostras de fluidos biológicos (Cazenave et al. 1992). Os alvos P30, 18s rDNA e B1 foram utilizados para amplificação de DNA em amostras de fluidos oculares. Os três demonstram a mesma sensibilidade, porém o B1 foi considerado o alvo mais específico e sensível que os alvos P30 e SAG1 (Jones et al. 2000).

Em 2000, Homan et al. identificaram no genoma do *T. gondii* um sítio-alvo de 200-300 repetições de 529 pb classificado como AF146527. Wahab et al. (2010) compararam os alvos AF146527 e B1 para a detecção do *T. gondii* em amostras de sangue de pacientes HIV positivos do leste da África. Em algumas cepas há deleções ou mutações em parte ou mesmo em todo fragmento de AF146527. Homan et al. (2000) sugerem que proporções relativas de repetições dos alvos AF146527 e B1 diferem entre os isolados além de concluir que os segmentos AF146527 não estão presentes em todos os isolados estudados. Estudos recentes (Abdul-Ghani 2011) corroboram com esses resultados demonstrando que esse iniciador não é tão específico quanto o B1.

Em estudo realizado em São Paulo foram avaliados diferentes métodos moleculares (PCR para os alvos rDNA, AF146527 e gene B1) para o diagnóstico da toxoplasmose congênita no líquido amniótico. Segundo esses autores o diagnóstico da toxoplasmose fetal no Brasil deve utilizar como alvo o gene B1 e realizar o método de *nested*-PCR (Okay et al. 2009).

Apesar das vantagens apresentadas como diagnóstico da toxoplasmose congênita, o uso da PCR ainda é de alto custo e exige controles rigorosos para evitar contaminações e resultados falsos. Além disso, a técnica não está completamente padronizada, sendo comum a observação de resultados divergentes entre os diversos laboratórios (Kompalic-Cristo et al. 2005; Sensini 2006). A PCR como ferramenta de diagnóstico para a toxoplasmose precisa ser melhor estudada para se conseguir resultados mais confiáveis. Atualmente, PCR possui um importante papel apenas para a complementação da sorologia

no diagnóstico da toxoplasmose aguda, sendo que o diagnóstico molecular não substitui os métodos sorológicos tradicionais para diagnosticar a toxoplasmose (Kompalic-Cristo et al. 2004).

1.2.2. PREVENÇÃO DA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA

A prevenção da toxoplasmose congênita se divide em três categorias: prevenção primária, secundária e terciária (Elsheika 2008). A prevenção primária se baseia em programas de educação em saúde pública onde a gestante é orientada a tomar medidas preventivas identificando quais são os fatores de risco para a toxoplasmose durante a gestação. Foulon (1992) demonstra que essas orientações, quando realizadas durante o pré-natal, reduzem em cerca de 63% a primoinfecção na gravidez.

A prevenção secundária consiste na tentativa de evitar a transmissão transplacentária do *T. gondii*. Para isso realiza-se a triagem pré-natal que se baseia no diagnóstico da toxoplasmose aguda em gestantes seguida de tratamento específico das mesmas. Normalmente este diagnóstico é realizado através da detecção de anticorpos específicos anti – *T. gondii* em amostras sanguíneas das mães: IgM, soroconversão de IgG e avidéz de IgG. Esta estratégia se justifica pela possibilidade de tratamento precoce para tentar prevenir a transmissão do parasito para o feto (Remington et al. 2005; Sensini 2006; Bessieres 2009). O tratamento da mãe/feto durante a gestação é controverso, pois sabe-se que, além dos efeitos adversos do tratamento, somente os taquizoítos são sensíveis aos medicamentos e que a parasitemia materna tem curta duração, cessando com o surgimento da resposta imune

específica (Kravetz et al. 2005). Sendo assim, para um tratamento eficaz, é de suma importância mensurar a soroconversão da gestante que é uma difícil tarefa mesmo quando são realizados exames mensais (Gilbert 2009).

Por fim, a prevenção terciária tem como objetivo a realização de um diagnóstico precoce no recém nascido na tentativa de prevenir ou minimizar seqüelas futuras. Com esse intuito é realizada a triagem neonatal que se baseia na detecção de IgM e/ou IgA específica para *T. gondii* em amostras de sangue em papel filtro que rotineiramente são colhidas para triagem de doenças metabólicas e genéticas em recém nascidos.

Os recém-nascidos infectados pelo *T. gondii* e diagnosticados pela triagem neonatal são rotineiramente tratados por 3 meses a 1 ano dependendo do centro médico onde está sendo realizado o tratamento. A terapêutica, geralmente constituída de sulfonamidas+pirimetamina+ácido folínico, tem por objetivo reduzir o risco de aparecimento de novas lesões inflamatórias no cérebro e no olho com conseqüente déficit neurológico e visual (Guerina et al. 1994; Lebech et al. 1999).

Há evidências que o tratamento pós-natal não seria tão efetivo na Europa e EUA. Por isto, a triagem pós-natal seguida de tratamento está sendo questionada nestes locais tanto na América do Norte como na Europa, onde predominam as cepas de *T. gondii* do tipo II que causam quadro clínico menos grave (Gilbert et al. 2008). Segundo estes autores, na América do Sul, onde predominam cepas mais virulentas (recombinantes I-III) e onde os casos de

toxoplasmose congênita são mais graves, deve-se continuar a fazer a triagem e tratar os recém nascidos.

As estratégias de prevenção à toxoplasmose congênita adotadas pelo sistema público de saúde não são uniformes. Observam-se variações entre os países e dentro de um mesmo país (Carellos 2008). Em todo o mundo, portanto, existe uma incerteza em relação ao melhor programa profilático a ser instituído para diminuir as seqüelas oculares e neurológicas nas crianças infectadas.

A maioria dos autores concorda com a necessidade de realização de uma triagem, visto que o diagnóstico clínico tanto da mãe quanto do bebê é muito difícil de ser realizado e a prevalência e morbidade da doença são elevadas. Entretanto a opção por uma estratégia de triagem pré-natal ou neonatal ainda é controversa (Lebech et al. 1999; McLeod et al. 2009) assim como a eficácia do tratamento da mãe/feto durante a gestação.

Alguns trabalhos ainda questionam o real valor da introdução da triagem sistemática, principalmente devido à essas incertezas em relação ao tratamento durante a gestação (Gilbert & Peckham 2002; Carellos et al. 2008).

As estratégias de prevenção variam de acordo com a realidade local sendo que normalmente países com alta prevalência da toxoplasmose tem implementado a triagem pré-natal, enquanto países com baixa prevalência adotam triagem neonatal além das práticas educativas (Carellos et al. 2008). O potencial

benefício da triagem neonatal, portanto está relacionado à prevalência da toxoplasmose congênita.

A triagem pré-natal é feita em países como Áustria, França e Eslovênia, e em algumas regiões da Itália e da Espanha (Bénard et al. 2008). A França, país que tem uma alta prevalência da parasitose, realiza a triagem pré-natal mensal desde 1978, mas não existem normas definidas para tratamento da gestante que apresenta soroconversão, ocorrendo variações em relação à indicação de aborto terapêutico, protocolos de confirmação (amniocentese-PCR, ultra-som) e protocolos de tratamento (Petersen 2007).

Na Áustria a triagem pré-natal é trimestral. Se a infecção primária é detectada antes da 15^a semana, a gestante é tratada com espiramicina. Se o diagnóstico ocorre após a 16^a semana, o tratamento é feito com sulfadiazina + pirimetamina (Petersen 2007). Pelos potenciais efeitos adversos, como inibição da síntese de ácido fólico e efeito teratogênico, não é recomendado o uso da pirimetamina no primeiro trimestre da gestação. Caso haja confirmação da infecção fetal, recomenda-se a partir do segundo trimestre de gestação seu uso associado à sulfadiazina (Gilbert & Peckham 2002; Jones et al. 2003; Remington et al. 2004).

Na Eslovênia, as gestantes soronegativas são submetidas a exames trimestrais (Petersen 2007). A partir de 1998 na Itália, a triagem tornou-se mensal, porém ainda não foi estabelecido um protocolo terapêutico padronizado (Stagni et al. 2009).

Países com baixa prevalência da toxoplasmose normalmente adotam práticas educativas ou ainda a triagem neonatal. Nos EUA, somente em Massachusetts e em New Hampshire são oferecidos programas de triagem neonatal para toxoplasmose (Jones et al. 2003). Na Europa, a Suécia, a Polônia e a Dinamarca também oferecem triagem neonatal, enquanto o Reino Unido e a Holanda realizam apenas a prevenção primária (Bénard et al. 2008; Carellos et al. 2008). Mais recentemente o México e a Indonésia, estão avaliando a possibilidade de triagem neonatal (Queiroz et al. 2006; Bénard et al. 2008).

No Brasil a triagem pré-natal é sugerida como política pública não obrigatória. Em algumas regiões do país essa triagem sorológica é oferecida sem custo como em Campinas e no Mato Grosso do Sul (Carellos et al. 2008).

Em Belo Horizonte existe um programa de assistência pré-natal para a investigação sistemática da ocorrência de toxoplasmose aguda durante a gestação. As gestantes são triadas pela presença de IgM e IgG anti-*T. gondii* na primeira consulta do pré-natal e em torno da 24^a a 28^a semana de gestação. São apontadas falhas na prevenção da toxoplasmose congênita devido às dificuldades para agendamento de consultas e dos exames complementares necessários, e na realização dos testes sorológicos em laboratórios diferentes, fazendo com que o diagnóstico na gestante seja tardio, muito distante da provável infecção materna, e dificultando o uso adequado do tratamento pelas gestantes (Carellos 2006; Andrade et al. 2008).

1.2.3. PREVALÊNCIA DA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA

A prevalência da toxoplasmose congênita em neonatos varia bastante de acordo com as técnicas de diagnóstico utilizadas, local do estudo, tipo de amostra e principalmente pelo tipo de triagem realizada na população (Stagni et al. 2009).

Em Campania, Itália, através de triagem pré-natal, foi encontrada uma taxa de infecção por *T. gondii* de 0,14/1000 neonatos nascidos vivos (Stagni et al. 2009), prevalência baixa quando comparada com 1,9 – 3,2/1000 encontrada na França por Remington et al. (2005).

Através da triagem neonatal, a prevalência da toxoplasmose congênita pode variar de 1/10000 neonatos nascidos vivos em Massachusetts (Guerina et al. 1994) à 4,7/10000 nascidos vivos na Polônia (Paul et al. 2001).

No Brasil estima-se que a infecção seja elevada. A prevalência da toxoplasmose congênita varia entre 0,3/1000 neonatos em Ribeirão Preto, SP (Carvalho et al. 2005), 0,9/1000 em Porto Alegre (Varella et al. 2009) e 5,0/1000 em Uberlândia - MG (Segundo et al. 2004), sendo que essa grande diferença pode ser explicada por características regionais, amostras clínicas e testes diagnósticos utilizados.

No período de setembro de 2003 a outubro de 2004 foi realizado em Belo Horizonte um estudo piloto que identificou, entre 31.000 crianças triadas, 20 com toxoplasmose congênita, resultando em uma proporção de 1 recém-nascido infectado para 1.590 nascidos vivos. Esses dados mostram a elevada

prevalência da toxoplasmose congênita em Belo Horizonte e, provavelmente, em todo o Estado de Minas Gerais (Queiroz et al. 2006). Posteriormente este estudo foi ampliado para todo o estado de Minas Gerais, sendo observado um bebê com toxoplasmose congênita para cada 770 nascidos vivos (Vasconcelos-Santos et al. 2009; Machado et al. 2010).

Cerca de 95% das crianças com infecção congênita não apresentam sintomas de doença disseminada, e uma em cada seis tem evidência de lesão cerebral ou ocular refletindo processo inflamatório pregresso. Observam-se lesões oculares cicatrizadas na maioria das crianças afetadas. Entretanto, devido à imaturidade da resposta imune fetal (Guglietta et al. 2006), é possível que o tempo de transformação do taquizoíto para bradizoíto seja mais longo que nos adultos imunocompetentes, ou que os períodos de reativação sejam mais freqüentes.

1.2.4. SINAIS CLÍNICOS

Os sinais clínicos classicamente descritos em crianças com toxoplasmose congênita são chamados de tetrade de Sabin, em que o feto apresenta hidrocefalia, com macro ou microcefalia, retinocoroidite, calcificações cerebrais e retardo mental ou perturbações neurológicas. As alterações oculares podem acontecer com graus diferentes de degeneração e edema na retina além de lesões vasculares da coróide, nistagmo, estrabismo, neurite óptica (Montoya & Liesenfeld 2004; Elsheikha 2008).

Segundo Gilbert & Peckham (2002), aproximadamente 90% das crianças com toxoplasmose congênita parecem se desenvolver normalmente. Natimortos ou mortes pós-natais ocorrem em aproximadamente 1% dos casos de bebês infectados e aproximadamente 2% tem seqüelas neurológicas graves. Existem evidências de que a intensidade de sintomas clínicos da toxoplasmose congênita é menor nos Estados Unidos e em países da Europa, quando comparado aos países da América do Sul (Gilbert 2009).

Apesar de grande parte dos casos de infecções congênitas serem assintomáticas no momento do nascimento, muitos neonatos apresentam seqüelas em algum momento da vida, principalmente complicações de tipo ocular ou do sistema nervoso central (Jones et al. 2003).

Devido a carência de estudos de seguimento das crianças desde o nascimento até o período escolar, a prevalência de seqüelas menos graves que podem não ser detectadas nos primeiros meses de vida, não é bem conhecida (McLeod et

al. 2006). Quando infectadas e não tratadas, 85% das crianças que não apresentaram manifestações clínicas ao nascimento desenvolverão tardiamente efeitos da infecção, na maioria dos casos retinocoroidite e atraso no desenvolvimento (Desmonts 1985; Montoya & Rosso 2005).

Lesões oculares causadas por reativação de cistos latentes (bradizoítos) na retina e a reação inflamatória associada, podem aparecer em qualquer momento da infância, ou mesmo durante a fase adulta. Estudos realizados com crianças que foram tratadas para toxoplasmose durante o período pré-natal e pós-natal mostram que aproximadamente 10% tiveram retinocoroidite detectada durante a infância, e 23% tiveram pelo menos uma lesão até os 7 anos de idade. Além disto, mais da metade tiveram algum grau de prejuízo ocular unilateral (Gilbert & Peckham 2002; Jones et al. 2003).

Andrade et al. (2008) sugerem que a toxoplasmose congênita pode causar déficit auditivo em até em 21% dos casos sendo que no Brasil é um fator de risco para hipoacusia.

Os fatores relacionados à variabilidade de sintomas clínicos no bebê ainda permanecem por serem melhor definidos. Presumivelmente, refletem uma combinação de fatores, como o genótipo e o estado imune do hospedeiro, a carga tecidual parasitária, a idade fetal, o estágio de desenvolvimento da placenta e a composição genética do parasito (Wong & Remington 1994; Sibley & Howe 1996).

1.3. DIVERSIDADE DO *T. GONDII*

1.3.1. POLIMORFISMO GENÉTICO DO *T. GONDII* E GENOTIPAGEM

O *T. gondii* foi considerado por muito tempo ser um organismo de estrutura genética populacional clonal (Howe & Sibley 1995). Apesar de ser um protozoário parasito com um ciclo sexual bem definido, esse modo de propagação parece ocorrer raramente na natureza.

Segundo Boothroyd & Grigg (2002) o fato do *T. gondii* ser haplóide bem como a não obrigatoriedade da reprodução sexuada para a obtenção de sucesso na disseminação desse parasito na natureza, se mantendo apenas pela transmissão oral de cistos teciduais entre os hospedeiros intermediários, possibilita a existência de uma estrutura populacional predominantemente clonal. Além disso, outra possível explicação para essa estrutura clonal do parasito seria o curto período de produção de gametócitos nos gatos e raramente os felídeos se infectam simultaneamente com múltiplas cepas, o que limita muito as trocas genéticas. Associado a isso, os hospedeiros intermediários desenvolvem uma resposta imune robusta durante a primeira infecção limitando a chance de infecções simultâneas que gerariam cistos de cepas diferentes coabitando o mesmo tecido (Sibley & Ajioka, 2008).

Estudos sobre os polimorfismos genéticos e caracterização genotípica em diferentes isolados de *T. gondii* originados tanto de material humano quanto animal demonstram a existência de diversidade genética nesse parasito. Várias técnicas moleculares tem sido utilizadas objetivando o estudo dessa diversidade genética entre diferentes isolados de *T. gondii* como a análise

isoenzimática (Cristina et al. 1995; Dardé 1996), amplificação aleatória do DNA polimórfico (RAPD) (Guo & Johnson 1995; Guo & Johnson 1996; Ferreira et al. 2004), análise de microssatélites (Ajzenberg et al. 2002a; Ferreira et al. 2004; Ajzenberg et al. 2005) e polimorfismo por tamanho de restrição (RFLP) (Howe & Sibley 1995; Cristina et al. 1995; Ferreira et al. 2006; Cavalcante et al. 2007).

A genotipagem dos isolados deve ser simples, rápida, reprodutível, podendo ser utilizada em larga escala e ser capaz de detectar a diversidade genotípica de uma determinada espécie (Ajzenberg et al. 2005). Seguindo estes critérios, para a genotipagem do *T. gondii*, muitos estudos utilizam a técnica da PCR-RFLP (polimorfismo por tamanho de fragmento de restrição). A PCR é realizada para a amplificação de uma região de um gene de interesse que contém uma ou múltiplas substituições de bases. O produto da PCR é submetido à digestão por uma ou mais enzimas de restrição. O RFLP é um método que detecta variações mínimas em um gene, sendo que uma única substituição de bases pode originar ou extinguir um sítio capaz de ser digerido pelas endonucleases de restrição (Singh 1997). Este método é rápido e de fácil execução (Ajzenberg et al. 2005).

Os primeiros estudos com cepas do *T. gondii* foram geográfica e numericamente restritos. Análise molecular através do RFLP de isolados dispersos principalmente na Europa e EUA, mostra que a maioria das cepas apresenta um padrão genético clonal e são pertencentes a um dos três genótipos designados como tipo I, II e III (Howe & Sibley 1995). A existência de três linhagens clonais mais uma vez indica que a disseminação deste parasito

na natureza ocorreria apenas por reprodução assexuada ou cruzamentos uniparentais. Essa estrutura clonal está acompanhada de uma pequena divergência genética entre as três linhagens, de aproximadamente 2% (Dardé 2008).

Estudos filogenéticos mais recentes subdividem o *T. gondii* em dois grandes grupos clonais, apesar da existência das três linhagens clonais postuladas por Howe & Sibley (1995). Em vez disso, o grupo 2 seria geneticamente heterogêneo e a linhagem tipo III seria apenas um subgrupo desse grupo 2 (Ajzenberg et al 2002a).

Cepas de *T. gondii* classificadas como tipo I estão normalmente associadas a casos de toxoplasmose aguda. O genótipo tipo II é predominante em pacientes imunossuprimidos (síndrome da imunodeficiência adquirida – AIDS) e em casos de toxoplasmose congênita e ocular em humanos. Ainda segundo Howe & Sibley (1995) cepas do tipo III são mais comumente encontradas em animais sendo importante salientar que na maioria das vezes as amostras de *T. gondii* provenientes de casos humanos se originam da forma sintomática da doença, enquanto que grande parte das amostras provenientes de animais é responsável por infecções crônicas e assintomáticas.

Em 1997, Howe et al. desenvolveram um sistema de tipagem de cepas de *T. gondii* baseando-se na análise de restrição de fragmentos do gene SAG 2 amplificado por nested PCR que identifica genótipos de cepas das três linhagens clonais descritas anteriormente (Howe & Sibley 1995). Das 68

amostras genotipadas, 55 (81%) foram classificadas como tipo II, sendo que estas estavam altamente relacionadas com a toxoplasmose congênita.

Também através da PCR-RFLP do *locus* SAG2, foi realizado um ensaio na Espanha para determinar a prevalência dos diferentes genótipos de *T. gondii* associados à toxoplasmose humana neste país. Foram avaliados 34 isolados encontrando maior prevalência de cepas do tipo II em casos em pacientes imunocompetentes enquanto cepas do tipo I estavam presentes em 75% dos indivíduos com infecção congênita (Fuentes et al. 2001).

Aspinall et al. (2003) investigaram o genótipo de *T. gondii* associado a casos agudos da toxoplasmose humana na Inglaterra e País de Gales. A análise de sítios de restrição do *locus* SAG2 demonstrou igual freqüência entre os genótipos tipo I e tipo II, mas nenhuma associação foi encontrada entre os genótipos estudados e as formas clínicas da toxoplasmose. Um resultado interessante neste estudo é a presença de amostras mistas (I + II) associadas principalmente a casos congênitos.

Mais recentemente, Gallego et al. (2006) realizaram uma análise genética do *locus* SAG2 em 33 amostras obtidas de animais e humanos provenientes da Colômbia (América do Sul). Quase a totalidade dos isolados caracterizados (94%) foram identificados como tipo I, sendo apenas um isolado classificado como tipo III e um como atípico. Os autores discutem que esses resultados indicam que as mesmas cepas circulam entre os homens e animais, além disso, esses achados demonstram diferenças na estrutura populacional do *T.*

gondii isolados na América do Sul quando comparados aos da América do Norte.

Achados semelhantes foram encontrados em isolados de *T. gondii* em animais domésticos provenientes de Minas Gerais (Brandão et al. 2006). Através da PCR-RFLP para o *locus* SAG2, 80,9% dos isolados foram classificados como tipo I sugerindo diferenças epidemiológicas na prevalência dos genótipos no Brasil.

Utilizando apenas o marcador SAG2, Dardé (2008) atribui o genótipo tipo II como responsável por mais de 90% dos casos de toxoplasmose congênita na França e nos Estados Unidos.

Apesar de grande parte dos estudos sobre genotipagem do *T. gondii* se basear na análise da PCR-RFLP do gene SAG2 (que codifica o antígeno de superfície p22 localizado no cromossomo VIII do parasito), existem limitações na genotipagem de cepas baseadas somente em um *locus* (Lehmann et al. 2000; Ajzenberg et al. 2002a).

Alguns autores chamam a atenção para diferentes comportamentos fenotípicos em cepas caracterizadas pelo mesmo genótipo através da análise de um único gene (Khan et al. 2005; Su et al. 2006).

A utilização de um único marcador genético limita o poder de distinção dos isolados de *T. gondii*, não sendo possível detectar recombinações ou alelos

atípicos (Dardé 2004; Ajzenberg et al. 2005; Sue et al. 2006). Além disso, a PCR-RFLP do gene SAG2 apresenta outros tipos de problemas como amplificação e digestão (pelas enzimas de restrição) incompletas, o que limita a reprodutibilidade da técnica (Lehmann 2000; Fuentes et al. 2001).

A utilização de *multilocus* para a tipagem genética é necessária para avaliar a real diversidade da população de *T. gondii*, encontrar fatores genéticos que podem influenciar na virulência do parasito, entender eventuais mecanismos de seleções genóticas de acordo com a espécie hospedeira ou tentar relacionar o genótipo do parasito às manifestações clínicas da toxoplasmose em humanos (Dardé 2004).

A primeira descrição de cepa recombinante I-III isolada no Brasil foi realizada por Fux et al. (2003), estudo que também incluiu relações com o genótipo do hospedeiro (camundongos BALB/C, C3H, C57Bl/6 e DBA1/J) e aspectos da resposta imune.

Vários outros estudos de genotipagem do *T. gondii* através da PCR-RFLP *multilocus* vem sido realizados em todo o mundo. Entretanto, a ausência de padronização da técnica e principalmente do conjunto de marcadores utilizados dificultavam a comparação dos resultados obtidos por diversos laboratórios. Com o objetivo de aumentar o poder discriminativo de identificação dos isolados, Su et al. (2006) desenvolveram um conjunto de marcadores que facilitam a distinção dos arquétipos de tipos atípicos além de revelar a diversidade genética dos parasitas. Ainda segundo Su et al. (2006), a utilização

desses marcadores permite a identificação dos isolados mistos com maior segurança além de facilitar a identificação de isolados de *T. gondii* em estudos epidemiológicas e de genética populacional.

Estudos de genotipagem têm sido embasados principalmente na pesquisa em 11 *loci* gênicos (SAG1, 5'+3'SAG2, SAG3, SAG2 alt, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358. *PK1*, Apico), confirmando a presença de uma população clonal de *T. gondii* muito variada em nosso país (Su et al. 2006; Pena et al. 2008). Através da análise em vários *loci*, estudos recentes demonstram também a presença de uma maior diversidade genética do parasito indicando que a recombinação sexual ocorre com mais frequência do que se esperava (Ferreira et al. 2006).

Os genótipos recombinantes ou genótipos com alelos atípicos representam de 5 a 10% da coleção de isolados obtidos na Europa e EUA (Howe & Sibley 1995). Esses genótipos são mais frequentes entre amostras isoladas de espécies hospedeiras exóticas, de áreas geograficamente remotas ou de pacientes com formas clínicas incomuns (Dardé 2004).

Velmurugan et al. (2008) genotiparam 19 isolados de *T. gondii* na África encontrando cepas clonais do tipo II e tipo III. Esses autores sugerem que a mesma estrutura clonal encontrada da Europa e na América do Norte se repete na África. Entretanto, em 2010, outro estudo com isolados de *T. gondii* obtidos de pacientes humanos africanos foi realizado, observando resultados que não corroboram com o estudo anterior. Dos 14 isolados analisados, apenas 1 foi

considerado clonal (tipo I), 10 isolados foram classificados como recombinantes e 3 provenientes de infecções mistas (Boughattas et al. 2010).

Na América do Sul a população de *T. gondii* é diferente daquelas observadas na Europa e América do Norte. Estudos realizados na Guiana Francesa e no Brasil demonstram grande variabilidade genética sendo que a maior diversidade é encontrada da região amazônica (Ajzenberg et al. 2004; Carme et al. 2009).

Em nosso laboratório e no laboratório de biologia de *Leishmania* da UFMG, Ferreira et al. (2006) realizaram PCR-RFLP para oito *loci* independentes (*SAG1*, *SAG2*, *SAG3*, *B1*, *cB21-4*, *cS10-A6*, *GRA6* e *L363*) visando identificar os genótipos de *T. gondii* isolados no Brasil. A análise multiloco permitiu caracterizar todas as cepas como recombinantes naturais (I/III), fato ainda não registrado em outros locais do mundo.

Estes achados foram confirmados posteriormente em isolados de *T. gondii* obtidos em Erechim, no estado do Rio Grande do Sul (Khan et al. 2006), em isolados provenientes de pacientes HIV positivos com toxoplasmose cerebral (Ferreira et al. 2008) e em pacientes com toxoplasmose ocular (Ferreira et al. 2010) que apresentaram uma alta taxa de polimorfismo genético. Neste último estudo, as características genéticas de 10 amostras clínicas (sangue) provenientes de pacientes com toxoplasmose ocular do estado de São Paulo foram analisadas. Todos os pacientes albergavam cepas polimórficas, embora duas delas apresentassem um único genótipo em 9 *loci* genéticos.

Além desses trabalhos realizados com amostras humanas no Brasil, vários estudos de genotipagem tem sido feitos em isolados de origem animal, como em galinhas (Brandão et al. 2006; Dubey et al. 2008; Dubey et al. 2010; Soares et al. 2011), gatos (Pena et al. 2008), porcos (Frazão-Teixeira et al. 2011), cabras (Cavalcante et al. 2007; Ragozo et al. 2010), ovelhas (Ragozo et al. 2010; Silva et al. 2011;), capivaras (Yai et al. 2009) e até mesmo em animais silvestres (Pena et al. 2011). Todos os trabalhos apresentam resultados semelhantes sendo que a genotipagem revela alta diversidade genotípica dos isolados brasileiros.

Pena et al. (2008) caracterizaram geneticamente amostras de DNA provenientes de isolados de *T. gondii* obtidos de gatos de São Paulo. A genotipagem foi realizada através da PCR-RFLP, utilizando os marcadores (SAG1, 5'+3'SAG2, SAG3, SAG2 alt, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico) propostos por Su et al. (2006) além do marcador CS3, utilizado para verificar a sua associação com a virulência em camundongos. Os autores observaram alta diversidade genética entre as amostras analisadas e identificaram quatro genótipos comumente encontrados no Brasil. Essas linhagens foram denominadas como tipos BrI, BrII, BrIII e BrIV. Segundo Pena et al. (2008) a população de *T. gondii* no Brasil é altamente diversificada, na qual a troca genética frequente tem gerado uma série de recombinantes e algumas linhagens clonais bem sucedidas expandiram-se para grandes áreas geográficas.

Isolados de *T. gondii* de capivaras provenientes do estado de São Paulo foram genotipados pela PCR-RFLP pelos mesmos marcadores genéticos. Não foram encontrados isolados arquetipos do tipos I e II porém alguns isolados foram agrupados em três linhagens clonais comuns no Brasil (tipos BrI, BrII e BrIII) (Yai et al. 2009). Ragozo et al. (2010) realizaram a tipagem de isolados de ovinos e também identificaram os genótipos BrI e BrIII além de novos genótipos não descritos na literatura.

Apesar de já terem sido descritas no Chile, cepas tipo II são bastante raras na região sul americana. Recentemente, Silva et al. (2011) realizaram a PCR-RFLP *multilocus* (SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, L358, c22-8, c29-6, Apico, PK1 e CS3) em isolados de *T. gondii* provenientes de ovinos. Dois dos 13 isolados estudados pertenciam à linhagem clonal do tipo II, com o tipo I apenas no locus Apico. Estes achados comprovam pela primeira vez a presença de cepa clonal do tipo II no Brasil.

Um estudo realizado em galinhas provenientes de Fernando de Noronha demonstrou mais uma vez a presença do tipo clonal II em nosso país. O arquetipo tipo III e várias amostras recombinantes também foram verificadas indicando que o *T. gondii* presente na ilha de Fernando de Noronha é constituído de genótipos originais, bem como genótipos clonais que são dominantes na Europa e América do Norte (Dubey et al. 2010).

A análise *multilocus* por RFLP-PCR realizada em isolados de porcos provenientes do Rio de Janeiro mostrou uma grande variabilidade de genótipos

recombinantes sendo que os autores sugerem que diferentes amostras de *T. gondii* circulam em suínos destinados ao consumo humano, distintas daquelas previamente isoladas de gatos e galinhas no Brasil (Frazão-Teixeira et al. 2011).

Acredita-se que a amplitude geográfica e a grande biodiversidade da fauna do Brasil possam contribuir para essa maior variabilidade genética das cepas brasileiras de *T. gondii* (Ferreira et al. 2006). Outros estudos com isolados de toda a América do Sul confirmam as divergências destes com as populações de *T. gondii* da Europa e América do Norte. Foram encontrados polimorfismos únicos nessas cepas e até mesmo novos alelos (Dardé 2008).

Dubey & Su (2009) estudando populações diferentes de *T. gondii* percebem que a estrutura populacional dos parasitos presentes na América do Norte é clonal sendo que no Brasil a variabilidade genética do parasito foi mais uma vez evidenciada. Os autores citam três observações importantes sobre os isolados de *T. gondii* obtidos no Brasil: a ausência de isolados do tipo II em nosso país (já contestada em publicações de 2010 e 2011); isolados do tipo I são raros; e a maioria dos isolados em nosso meio não são clonais, sugerindo recombinação e transmissão eficiente por oocistos. Discutem ainda que as diferenças estruturais entre as populações do *T. gondii* se deve principalmente a diferenças na rota de infecção.

A circulação de múltiplos genótipos na América do Sul permite a ocorrência de infecção mista (mais de uma cepa no mesmo hospedeiro) e a presença de hospedeiros intermediários com infecções mistas poderá levar a maior

diversidade genética entre diferentes linhagens do parasito, uma vez que esses hospedeiros são presas para os hospedeiros definitivos (Pena et al. 2008; Dardé 2008; Khan et al. 2009).

Segundo, Sibley & Ajioka (2008), combinando as cepas de diferentes regiões é possível obter ao invés das três linhagens clonais, 11 diferentes haplótipos definidos por polimorfismos presentes nos íntrons. Para outros autores, no Brasil, existem linhagens clonais, porém diferentes dos três tipos clássicos (Pena et al. 2008 e Dubey & Su 2009). Recentemente, Khan et al. (2011) através de análises de cepas atípicas da América do Norte, revelam uma quarta linhagem clonal (tipo 12, além das tradicionais, tipo I, II e III) circulante nessa região.

Em relação ao curso clínico da toxoplasmose, alguns estudos demonstram uma maior gravidade da doença na América do Sul quando comparado a outras regiões do mundo (Gilbert et al. 2009). Acredita-se que o polimorfismo genético detectado entre cepas brasileiras de *T. gondii* poderia ser uma possível explicação para as diferenças observadas na apresentação clínica da doença (Cristina et al. 1995). Em contrapartida, Ajzenberg et al. (2009) através da associação entre os genótipos de 88 isolados de indivíduos imunocomprometidos e os aspectos clínicos desses paciente, sugerem que para os casos de imunossupressão, os fatores do hospedeiros estão mais envolvidos à resistência ou susceptibilidade à infecção do *T. gondii* do que as características genéticas do parasito.

1.3.2. VIRULÊNCIA

A virulência do *T. gondii* é usualmente definida em modelo animal. Sabe-se que algumas espécies de hospedeiros são parcialmente susceptíveis enquanto outras sucumbem à infecção com o *T. gondii* e que até mesmo o sexo pode interferir na evolução da infecção. A virulência de isolados de *T. gondii* está bem caracterizada no modelo murino. Os principais critérios para sua avaliação são a taxa de mortalidade e o tempo até a morte de camundongos infectados com inóculos graduais de parasitos (Kaufman et al. 1958).

O modelo padronizado para a virulência do *T. gondii* são camundongos fêmeas BALB/c. Embora estudos *in vitro* demonstrem propriedades intrínsecas diferentes entre as cepas, a expressão da virulência em dado modelo é complexa e depende de várias características tanto do parasito quanto do hospedeiro (Dardé 2008). A maioria dos isolados de *T. gondii* tem sido definida como virulenta, não virulenta ou de virulência intermediária, dependendo da sua morbidade e mortalidade em camundongos infectados (Howe & Sibley 1995).

Sibley et al. (2002), através de seus experimentos *in vitro*, revelaram que a patogênese de determinado isolado parece ocorrer devido à presença ou indução de mediadores inflamatórios solúveis. Segundo esses mesmos autores, a infecção de camundongos com cepas virulentas induz uma produção exacerbada de citocinas TH1. As diferentes cepas de *T. gondii* possuem capacidade diferente de induzir a IL-12 podendo determinar as diferenças nas virulências (Saeij et al. 2005). Estudos recentes sugerem a indução precoce de

altos níveis de IL12 por macrófagos infectados com parasitos de cepas do tipo II (Robben et al. 2004)

Classicamente, cepas tipo I são associadas ao fenótipo virulento em camundongos, causando alta parasitemia, aumento do risco de transmissão transplacentária e gravidade de infecção fetal. Em contrapartida, as cepas tipo II e III são consideradas avirulentas levando à infecção crônica e produção de cistos teciduais em camundongos (Howe & Sibley 1995).

Essas associações ainda não são claras quando se trata de genótipos recombinantes. Pena et al. (2008) associaram a PCR-RFLP do marcador CS3 com a virulência em camundongos ao isolamento. Através da análise da taxa de mortalidade de camundongos infectados, esses autores associaram o genótipo BrI como altamente virulento, genótipos BrII e BrIV de virulência intermediária e o BrIII como avirulento.

Sibley et al. (2002), ao cruzarem uma cepa altamente virulenta (GT-1) com uma avirulenta (CEP), mostraram através da análise do genótipo e do fenótipo de virulência da progênie que a virulência era um traço herdável. Além dos fenótipos virulento e avirulento (parentais), alguns descendentes apresentavam fenótipos intermediários indicando que a virulência pode ser uma característica multigênica (Saeij et al. 2005). Ainda em 2002, Su et al. realizaram um cruzamento genético entre essa mesma cepa altamente virulenta (GT-1) e uma menos virulenta (CTG) e identificaram vários *locus* de traço quantitativo (QTLs) associados com a virulência de *T. gondii* no modelo murino.

Usualmente observa-se uma virulência mais elevada nas cepas recombinantes, o que é sustentado por experimentos de cruzamento das linhagens clonais avirulentas tipo II e tipo III, onde a progênie demonstra elevação da virulência quando comparada aos parentais (Saeij et al. 2005). Nosso grupo tem mostrado que os isolados da América do Sul são mais virulentos para camundongos do que os isolados oriundos da América do Norte e Europa (Ferreira et al. 2001; Brandão et al. 2006; Cavalcante et al. 2007).

A aplicação da genética clássica na análise da virulência aguda provocada por cepas tipo I revelou que esta característica é estável, herdável e determinada por relativamente poucos loci. Cruzamentos genéticos entre cepas tipo I e tipo III foram utilizados para identificar genes responsáveis por essa característica, chegando à conclusão de que mais de 90% da elevada virulência dos isolados do tipo I é devido a um alelo único no locus ROP18 (Taylor et al. 2006; Khan et al. 2009).

A associação entre a virulência do *T. gondii* em camundongos em comparação com a virulência em outras espécies ainda não é clara, principalmente a associação com as manifestações da doença em humanos.

2. JUSTIFICATIVA

A identificação do *T. gondii* por PCR no sangue de recém nascidos com suspeita de toxoplasmose congênita pode ser uma excelente ferramenta para auxiliar o diagnóstico da toxoplasmose. O sangue de crianças identificadas como infectadas no inquérito sorológico para toxoplasmose, realizado em 2006/2007 no Estado de Minas Gerais, apresenta-se como um material adequado para esse estudo.

A genotipagem de cepas do *T. gondii* bem como o estudo da estrutura populacional desse parasito se justifica na área da saúde e clínica médica, uma vez que a associação entre o genótipo do parasito e a manifestação da doença pode fornecer marcadores que definam o seu prognóstico, levando ao tratamento apropriado dos pacientes com infecção por *T. gondii* além de possíveis associações com diversos potenciais biológicos à espécie, como, por exemplo, virulência, infectividade, crescimento, diferenciação e susceptibilidade a drogas e vacinas.

A hipótese a ser testada neste projeto é sobre o papel de características fenotípica e genotípica do parasito no desenvolvimento de lesões. Segundo Gilbert et al. (2009), existem evidências de que o curso clínico da toxoplasmose congênita difere em países da Europa e EUA, quando comparado com regiões da América do Sul: a doença ocular é cinco vezes mais comum em crianças com toxoplasmose congênita, identificadas pela triagem neonatal no Brasil do

que em crianças identificadas por triagem pré-natal ou neonatal na Europa. Ferreira et al. (2010) encontraram elevada taxa de recombinação entre os arquétipos I, II e III em amostras de pacientes com toxoplasmose ocular provenientes de São Paulo. Esses autores sugerem que esta variabilidade pode estar associada com a gravidade da doença observada em pacientes brasileiros. É provável que a maior frequência e gravidade da toxoplasmose congênita no Brasil estejam associadas ao predomínio de cepas recombinantes observado em nosso país.

3. OBJETIVOS:

3.1. OBJETIVO GERAL

- Analisar a virulência e o genótipo de isolados de *T. gondii* associadas com a toxoplasmose congênita humana em recém nascidos no Estado de Minas Gerais.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar o *T. gondii* no sangue de recém nascidos através da PCR;
- Isolar o *T. gondii* a partir do sangue de crianças recém nascidas no estado de Minas Gerais.
- Avaliar a virulência dos novos isolados de *T. gondii*;
- Determinar, através da PCR-RFLP, qual tipo genético do *T. gondii* prevalece nos casos congênitos no Brasil;
- Comparar o perfil genotípico dos isolados obtidos dos recém nascidos com os genótipos já isolados no Brasil.
- Associar o tipo genético de *T. gondii* responsável pela infecção do recém nascido com as formas clínicas desenvolvidas pela criança: comprometimento oftalmológico, déficit auditivo e sinais neurológicos (calcificações cerebrais).

4. MATERIAL E MÉTODOS:

4.1. PACIENTES

O presente estudo faz parte de um projeto multidisciplinar: “TRIAGEM NEONATAL PARA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA NO ESTADO DE MINAS GERAIS” coordenado pela Dra. Gláucia Manzan Queiroz de Andrade (Faculdade de Medicina da UFMG - Grupo Brasileiro de Toxoplasmose Congênita, GBTC-UFMG). Trata-se de um estudo transversal, realizado durante um período de sete meses (1º de Novembro de 2006 a 31 de Maio de 2007) em Minas Gerais e baseia-se na detecção de IgM específica contra *T. gondii* em amostras de sangue seco em papel filtro que rotineiramente são colhidas de recém nascidos para triagem de doenças metabólicas e genéticas.

Foi realizado um inquérito sorológico para toxoplasmose em 146.307 recém-nascidos atendidos no programa de triagem neonatal para fenilcetonúria, hipotireoidismo e hemoglobinopatias (TESTE DO PEZINHO) no Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico (NUPAD/UFMG). A triagem neonatal foi realizada através da detecção de IgM anti-*T. gondii* utilizando-se o kit TOXO IgM Q-Preven®, Symbiosis, Leme, Brasil.

Os recém nascidos que tiveram resultado positivo ou duvidoso no exame realizado em sangue eram classificados como suspeitos de toxoplasmose congênita e foram submetidos a testes confirmatórios: IgA, IgG e IgM anti-*T.*

gondii no soro/plasma da mãe e do bebê. Todas as crianças suspeitas de toxoplasmose congênita foram também submetidas a exames para avaliação de possíveis comprometimentos oftalmológico (fundoscopia), neurológico (Ultra-som transfontanela, Radiografia de crânio e, se necessário, Tomografia Computadorizada de Crânio), auditivo (avaliação comportamental, Emissões Otoacústicas e PEATE) e sistêmico (avaliação clínica por infectologista pediátrico). Quando necessário os recém nascidos eram encaminhadas para atendimento neurológico e neurocirúrgico. Os exames clínicos foram realizados no Hospital das Clínicas (HC) da UFMG.

Todas as crianças infectadas foram tratadas com uma combinação de sulfadiazina + pirimetamina + ácido folínico durante o primeiro ano de vida, e serão acompanhadas por um período mínimo de cinco anos. Este estudo tem o apoio da Secretaria Estadual de Saúde de Minas Gerais e foi aprovado pelo COEP-UFMG, parecer nº 0298/06, apresentado em anexo ao termo de consentimento para participação no projeto.

Após aproximadamente 12 meses foi realizada nova coleta de sangue periférico das crianças, com o intuito de confirmar o diagnóstico pela persistência de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, metodologia que é considerada o teste referência para o diagnóstico da toxoplasmose congênita.

➤ DEFINIÇÃO DE CASOS DE TOXOPLASMOSE CONGÊNITA

Foram definidos como casos de toxoplasmose congênita as crianças com persistência de IgG anti-*T. gondii* ao final de 12 meses de vida.

➤ EXCLUSÃO DO DIAGNÓSTICO DE TOXOPLASMOSE CONGÊNITA

Nos recém nascidos inicialmente selecionados como positivos para toxoplasmose congênita, o diagnóstico foi excluído quando a criança, nos testes confirmatórios, apresentava sorologia (IgM, IgA e IgG) negativa para *T. gondii* na ausência de tratamento específico ou sorologia persistentemente negativa após um a três meses da interrupção do tratamento.

O Programa Estadual de Triagem Neonatal em Minas Gerais, no período de 1º de Novembro de 2006 a 31 de Maio de 2007, apresentou uma cobertura de 95% dos nascidos vivos do Estado, sendo que das 146.307 crianças triadas, 235 apresentaram resultado positivo ou duvidoso na pesquisa de IgM anti-*T. gondii* através do kit *Q-Preven*®. Dentre as crianças com resultado positivo/duvidoso para IgM e que realizaram consulta médica e exames sorológicos confirmatórios, 190 tiveram o diagnóstico de toxoplasmose congênita confirmado e 45 crianças apresentaram IgG negativa após 12 meses de vida (Vasconcelos-Santos et al. 2009).

Levando-se em consideração as 190 crianças com diagnóstico confirmado, Minas Gerais apresenta uma taxa de prevalência da toxoplasmose congênita de aproximadamente um bebê com toxoplasmose congênita para cada 770 nascidos vivos (Vasconcelos-Santos et al., 2009).

A figura 1 foi retirada do relatório Técnico-Científico intitulado “TRIAGEM NEONATAL PARA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA EM MINAS GERAIS” elaborado por nosso grupo (GBTC - UFMG) e encaminhado à Secretaria de

Estado da Saúde de Minas Gerais em 2008. Esta figura apresenta a distribuição das proporções de crianças com toxoplasmose congênita (1 para 770 nascidos vivos) em Minas Gerais de acordo com a divisão por macrorregião de UBS (Unidade Básica de Saúde). Observa-se uma maior proporção de crianças infectadas por nascidos vivos nas regiões Jequitinhonha (1/361), Nordeste e Triângulo do sul (ambos com prevalência de aproximadamente 1/490). As regiões do Centro e Centro Sul por sua vez possuem as menores taxas de positividade do Estado, 1:1286 e 1:1276 respectivamente.

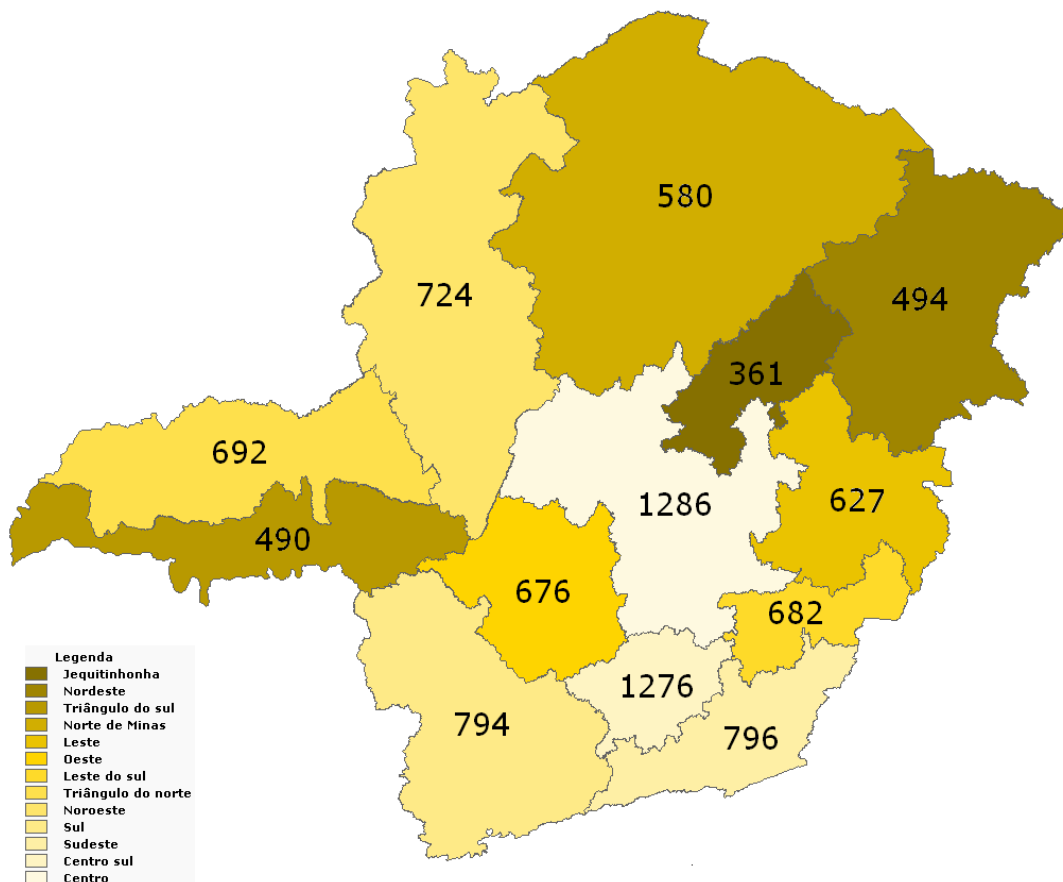


Figura 1. Proporção de crianças com toxoplasmose congênita identificadas no período de novembro de 2006 a maio de 2007 pela triagem neonatal, de acordo com a divisão por macrorregião de UBS (Unidade Básica de Saúde), em Minas Gerais (1 para X nascidos vivos).

Da amostra inicial de 235 crianças selecionadas pela triagem, 227 foram submetidas aos exames confirmatórios. Destas, 220 foram selecionadas para este estudo por terem sido submetidas a pesquisa de IgG após 12 meses de vida. O restante só possuía a primeira amostra de sangue por motivos diversos (óbito, desistência dos pais em participar do estudo, mudança de endereço) e não foram incluídas neste estudo (Fluxograma 1). A informação da persistência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* ao final de 12 meses é fundamental para a determinação do diagnóstico da toxoplasmose congênita.

As 220 crianças selecionadas foram divididas em 2 grupos:

Grupo TC (Toxoplasmose Congênita): 178 crianças com persistência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* ao final de 12 meses .

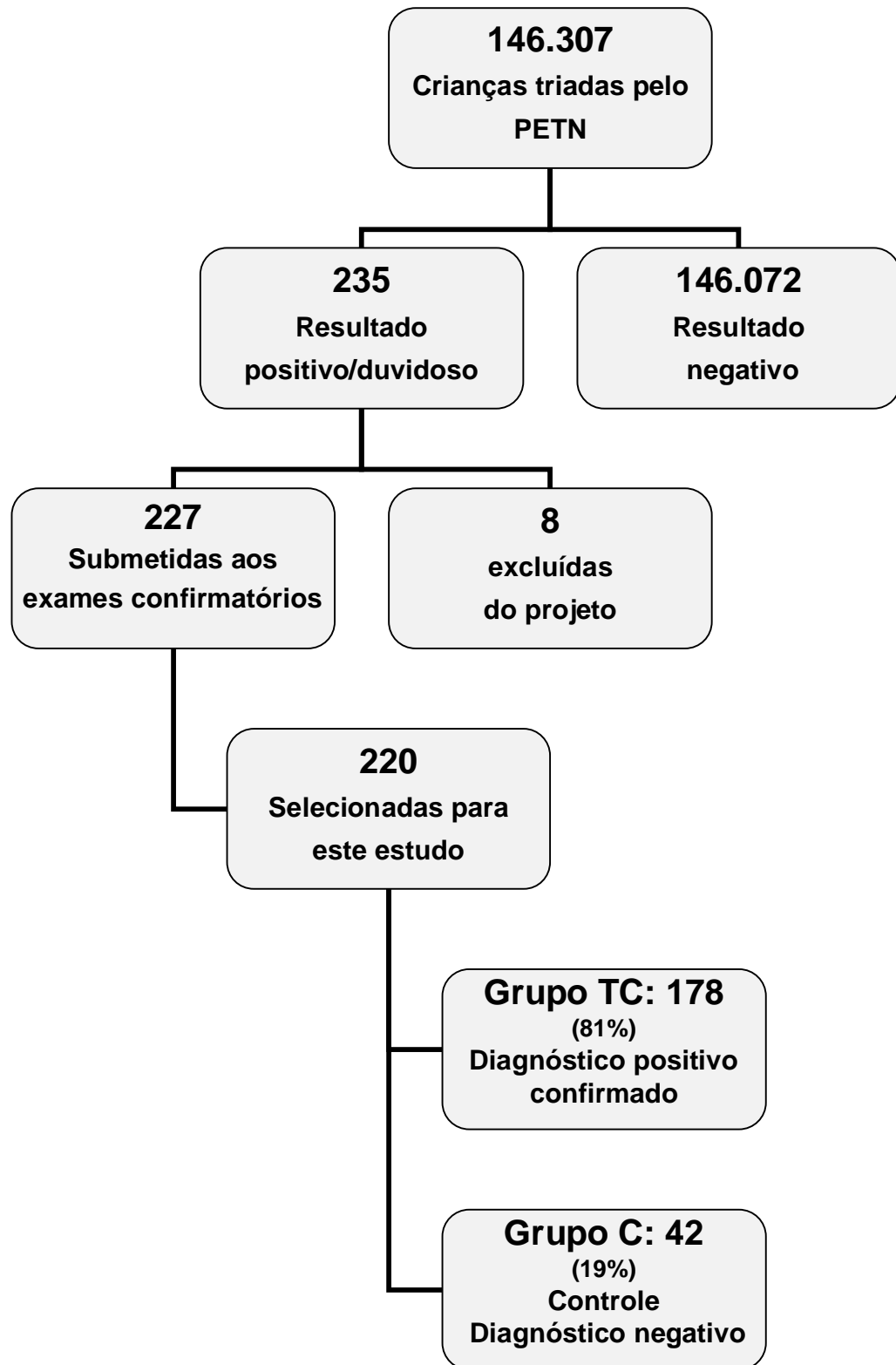
Grupo C (Controle): 42 crianças reativas na triagem neonatal, mas não infectadas, apresentando resultado negativo para anticorpos IgG anti-*T. gondii* ao final de 12 meses.

Das 220 crianças selecionadas para esse estudo, 121 foram do sexo masculino e 99 do sexo feminino. O sexo masculino também foi maioria (57,3%) entre os recém nascidos com diagnóstico confirmado com toxoplasmose congênita (grupo TC).

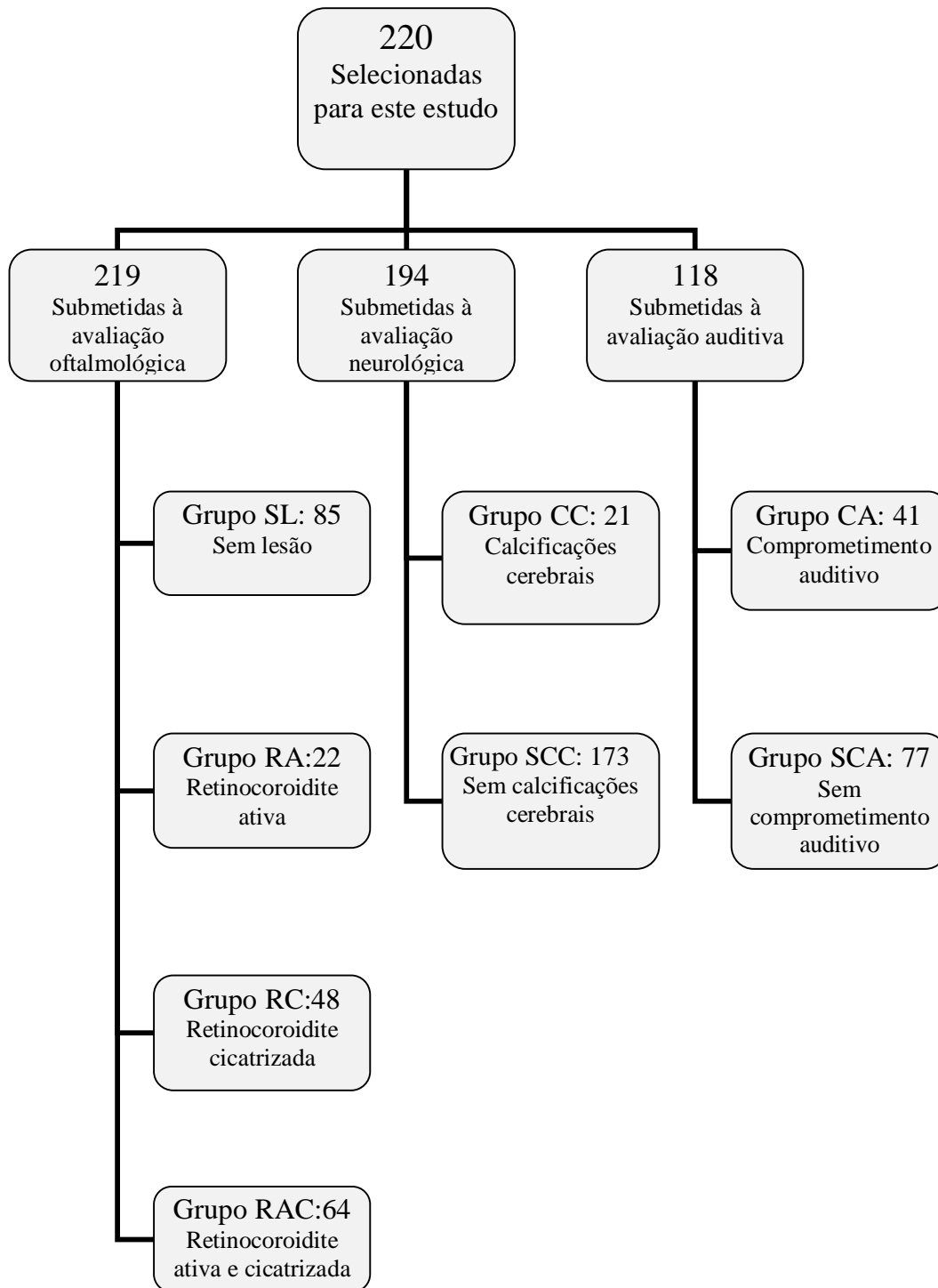
As 220 crianças selecionadas para este estudo foram avaliadas clinicamente. Os recém-nascidos suspeitos de toxoplasmose congênita foram submetidos a exames de fundoscopia para avaliação de integridade da retina e outros exames para observação de possíveis alterações neurológicas e auditivas no

Hospital das Clínicas (HC) da UFMG sob a responsabilidade dos médicos Drs. José Nélio Januário, Gláucia Manzan Queiroz de Andrade, Luciana Macedo e Daniel V. Vasconcelos-Santos.

Entre as 220 crianças selecionadas para este projeto, 219 passaram por avaliação oftalmológica. Oitenta e cinco crianças não apresentaram lesão ocular, 22 apresentaram lesão ocular ativa, 48 crianças tinham lesão ocular cicatrizada e 64 crianças apresentaram retinocoroidite com lesões ativas e cicatrizadas simultâneas, em pelo menos um olho. Cento e noventa e quatro crianças foram submetidas à avaliação neurológica, das quais 21 apresentaram calcificações cerebrais. Entre as 118 crianças avaliadas para déficit auditivo, 41 apresentavam déficit auditivo e 77 crianças não apresentavam comprometimento auditivo. Todas as 42 crianças do grupo C apresentaram exames clínicos normais (Fluxograma 2), exceto três crianças que apresentaram déficit auditivo.



Fluxograma 1. Identificação das 178 crianças infectadas (TC: toxoplasmose congênita) e 42 crianças controle (C) não infectadas pelo *T. gondii* participantes deste estudo.



Fluxograma 2. Exames clínicos nas 178 crianças infectadas (grupo TC) e em 42 crianças controle (grupo C). Avaliação oftalmológica, calcificações cranianas e déficit auditivo. Retinocoroidite ativa (grupo RA), cicatrizada (grupo RC) e ativa + cicatrizada (grupo RAC), calcificações cerebrais (grupo CC), sem calcificações cerebrais (grupo SCC), comprometimento auditivo (grupo CA), sem comprometimento auditivo (grupo SCA).

4.2. COLETA DE SANGUE

Além da avaliação clínica dos recém nascidos, foi realizada coleta de 2,0mL de sangue periférico imediatamente antes do início do tratamento com os seguintes propósitos:

- 1,5 mL (coletado em EDTA) para extração de DNA de *T. gondii* porventura existente junto aos elementos celulares sanguíneo para possível diagnóstico molecular (através de PCR do gene B1). Este sangue foi mantido a -20°C até o momento da extração do DNA;
- 0,5 mL (coletado em EDTA) para inoculação intraperitoneal em camundongos (bioensaio) na tentativa de isolar parasitos e analisar o perfil genético dos parasitos por PCR-RFLP, utilizando iniciadores específicos;

Ao final de 12 meses foi coletada nova amostra de sangue para pesquisa de IgG anti *T. gondii* e confirmação de toxoplasmose congênita por laboratório terceirizado pelo NUPAD.

4.3. DETECÇÃO DE *Toxoplasma gondii* EM SANGUE DE RECÉM NASCIDOS POR PCR DO GENE B1

A presença do *T. gondii* no sangue dos recém nascidos foi determinada pela amplificação por *nested* PCR do gene repetitivo e conservado *B1*, conforme descrito por Burg et al. (1989). A extração de DNA de sangue dos recém nascidos foi realizada utilizando-se o kit de purificação de DNA genômico

Wizard (Promega) seguindo o protocolo do fabricante. O DNA purificado foi ressuspendido em água e mantido sob refrigeração, a 4°C, até a utilização.

Os seguintes iniciadores foram utilizados (seqüências na orientação 5'-3'):

forward (F)_{ext} GGAAGTGCATCCGTTTCATGAG; F_{int}
TGCATAGGTTGCAGTCACTG; reverse (R)_{ext} TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC e
F_{int} GGCGACCAATCTGCGAATACACC.

Inicialmente, 1µL do DNA extraído do sangue dos recém nascidos foi submetido à amplificação pela PCR utilizando-se os iniciadores externos (ext). Em seguida, foi realizada a amplificação por *nested* PCR com os iniciadores internos (int), utilizando-se 1µL do produto da PCR inicial como molde. Um controle negativo, sem DNA, e dois controles positivos, um com DNA extraído de taquizoítos da cepa ME49 e um com DNA extraído de sangue normal adicionado de 100 taquizoítos/mL da cepa RH foram incluídos em cada reação.

Todas as reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 10µL, contendo 2µL de Tampão 5X green (Promega), 25mM de MgCl₂, 2,5mM de cada deoxinucleotídeo (dATP/dTTP/dGTP/dCTP, Invitrogen), 5u/µL de *Taq* DNA polimerase (Promega) e 5pmol de cada iniciador. As amplificações foram programadas segundo Lee et al. (2008) para 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 62°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. Os fragmentos amplificados foram visualizados após eletroforese em gel de poliacrilamida a 5% e por coloração com nitrato de prata, de acordo com Santos et al. (1993) e fotografados.

A reprodutibilidade da PCR-B1 foi avaliada em ensaio mascarado utilizando aproximadamente 10% da amostra.

Medidas para evitar a contaminação entre amostras foram utilizadas em todas as fases dos experimentos, desde a colheita das mesmas, pela utilização de materiais individuais e estéreis, bem como para as etapas características da PCR. Foram utilizadas salas diferentes para a extração de DNA, preparação de reagentes, amplificação e análise das amostras, troca freqüente de luvas, material plástico individual e descartável, e utilização de controles dos reagentes de extração e amplificação.

4.4. ISOLAMENTO DO *T. gondii* POR BIOENSAIO

Para isolamento do *T. gondii*, as amostras de sangue (0,5 mL) foram centrifugadas a 2000g e 0,2 mL do sedimento de células sanguíneas contendo eritrócitos e leucócitos foram inoculados pela via intraperitoneal (i.p.) em duas fêmeas de camundongos normais *Swiss* (0,1 mL por animal) de seis a oito semanas de idade, obtidos no Centro de Bioterismo do ICB/UFMG e mantidos no biotério do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG (bioensaio). Após 30 dias de inóculo do material, cada camundongo foi sangrado pelo plexo retro-orbital. O sangue foi centrifugado e o plasma usado para a realização de ELISA para pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii*. Animais que morreram antes de completar 30 dias de inóculo foram examinados para a pesquisa de taquizoítos no peritônio ou cistos no cérebro. Todos os camundongos sobreviventes foram sacrificados por deslocamento cervical. Os cérebros dos camundongos

soropositivos por ELISA foram retirados, macerados e em seguida adicionado 1 mL de solução salina tamponada com fosfatos (PBS) pH 7,2. Para cada cérebro retirado foram examinadas duas preparações entre lâmina e lamínula para a pesquisa de cistos. Os procedimentos com camundongos utilizados no presente projeto foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA-UFMG), parecer nº 013/2007, apresentado anexo.

4.4.1. MANUTENÇÃO DOS NOVOS ISOLADOS DE TOXOPLASMA GONDII

Para manutenção dos novos isolados de *T. gondii* foram utilizadas novas passagens em fêmeas de camundongos *Swiss* através da inoculação de cistos teciduais encontrados nos cérebros dos animais previamente infectados. Foram inoculados aproximadamente cinco a dez cistos presentes em cérebro dos camundongos infectados previamente, após homogeneização do órgão em PBS pH 7,2, a cada 4-6 meses, por via oral em camundongos *Swiss* normais.

Em caso de isolados virulentos, os camundongos eram tratados 48 horas após o inóculo com sulfadiazina (1g/L) na água oferecida aos animais, durante sete a dez dias. Todos isolados foram mantidos por congelamento de taquizoítos em nitrogênio líquido a - 196° C .

4.4.2. CRIOPRESERVAÇÃO DE TAQUIZOÍTOS DOS NOVOS ISOLADOS

Para obtenção de taquizoítos, foram inoculados cinco a dez camundongos com aproximadamente 200 a 600 cistos i.p. por camundongo. Os taquizoítos foram

coletados cinco a sete dias após o inóculo através de lavagem do peritônio com PBS pH 7,2.

Foi adicionado aos parasitos DMSO (concentração final de 10%) e estes foram estocados em criotubos (0,5ml) e armazenados em freezer a -70C por 18 horas. Após este período o material foi transferido para o nitrogênio líquido (Dubey & Beattie 1988).

Para o descongelamento dos parasitos, os criotubos foram aquecidos a 37°C por 1 minuto. O material foi lavado por centrifugação com PBS pH 7,2, homogeneizado com PBS e inoculado via intraperitoneal em camundongos *Swiss*.

4.4.3. OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DE TAQUIZOÍTOS DE TOXOPLASMA GONDII

Para os ensaios de virulência dos novos isolados do *T. gondii*, a obtenção dos taquizoítos foi realizada de acordo com Ferreira et al. (2001). Camundongos *Swiss* foram inoculados intraperitonealmente com cistos teciduais (200 a 600 cistos/camundongo), previamente digeridos com pepsina 2.6% em solução ácida por 10 minutos em banho-maria. A parede cística é rompida pela pepsina liberando os bradizoítos e otimizando assim a infecciosidade do inóculo intraperitoneal. A pepsina foi lavada do material por centrifugação com PBS pH 7,2 por três vezes a 2000g e o material contendo bradizoítos foi inoculado i.p. Após um período de cinco a sete dias foi coletado o exsudato peritoneal dos camundongos infectados. Esse exsudato foi centrifugado a 2.000g por 10

minutos e ressuspendido em 5 mL em PBS pH 7.2. Para romper a membrana das células do hospedeiro que estariam abrigando parasitos, o material foi submetido à forte pressão passando através de uma seringa com agulha de calibre 13x4,5, de três a cinco vezes.

O material recolhido foi filtrado em uma membrana de policarbonato de 3 µm de porosidade (*Milipore*) para que as células do hospedeiro fossem removidas. Após a filtração, os taquizoítos foram contados na câmara hemocitométrica e diluídos para concentrações apropriadas em PBS pH 7,2.

4.5. DETERMINAÇÃO DA VIRULÊNCIA DE ISOLADOS DE *TOXOPLASMA GONDII*

Para a determinação da virulência dos isolados de *T. gondii* foram utilizados os mesmos critérios adotados por Ferreira et al. (2001). Os taquizoítos após serem filtrados e contados em câmara hemocitométrica foram submetidos a uma diluição seriada de modo a obtermos concentrações finais crescentes de 10^0 , 10^1 , 10^2 e 10^3 taquizoítos por 0,1 mL. Para cada diluição específica, realizou-se o inóculo intraperitoneal de 0,1 mL em cinco camundongos fêmeas BALB/c possuindo de seis a oito semanas de vida obtidos do Centro de Bioterismo do ICB/UMG e mantidos no Biotério do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG. A mortalidade, assim como o tempo decorrido até a morte, foi observada por um período de 30 dias. O mesmo protocolo foi realizado com as cepas padrão RH (virulenta) e ME49 (avirulenta). Os camundongos que morreram tiveram a infecção pelo *T. gondii* confirmada através da busca por taquizoítos na cavidade peritoneal e/ou cistos teciduais

no cérebro. Nos camundongos sobreviventes foi realizado um ELISA com o plasma sanguíneo obtido através de sangria pelo plexo retro-orbital para detecção de IgG anti-*T. gondii* ao final do período de observação de 30 dias. Todos os camundongos sobreviventes foram sacrificados e analisados com os mesmos critérios de infectividade estabelecidos para os camundongos que morreram de modo a confirmar o resultado do teste sorológico. Aqueles que por ventura não haviam sido infectados (ELISA negativo) foram excluídos da análise de virulência do isolado. Como grupo controle negativo do experimento, realizamos o inóculo intraperitoneal de PBS pH 7.2 em cinco fêmeas BALB/c.

4.5.1. CRITÉRIOS DE CLASSIFICAÇÃO DA VIRULÊNCIA DOS ISOLADOS DE TOXOPLASMA GONDII

O critério clássico de determinação da virulência em camundongos é o percentual de mortalidade dos animais submetidos a inóculos graduados do parasito e o tempo decorrido até a morte destes. São classificadas como virulentos os isolados que possuem LD₁₀₀ (dose letal para 100% dos camundongos) igual a um parasito. Avirulentos são os isolados que possuem LD₅₀ maior que 10³ taquizoítos e isolados de virulência intermediária são aquelas que exibem um padrão intermediário entre os dois extremos (Sibley & Howe 1995).

4.5.2. ELISA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IGG ANTI- *T. GONDII* EM CAMUNDONGOS

4.5.2.1. OBTENÇÃO DO ANTÍGENO SOLÚVEL DE TOXOPLASMA GONDII (STAG)

Foi coletado o exsudato peritoneal de camundongos, previamente inoculados com a cepa RH de *T. gondii*. O material foi centrifugado por duas vezes em PBS pH 7,2 e adicionado 10mL de PBS pH 7,2 ao sedimento resultante. A contagem dos parasitos foi realizada em câmara hemocitométrica e a concentração final acertada para 1×10^9 taquizoítos por mL. A suspensão de parasitos foi então processada por ultrasom em 5 ciclos de 40 hertz (em banho de gelo), durante 1 minuto e com intervalos de 1 minuto entre cada ciclo, sendo o rompimento dos parasitos acompanhado em microscópio óptico. Em seguida o material foi centrifugado a 15000 g à 4°C durante 30 minutos. O sobrenadante (antígeno solúvel de *T. gondii* – STag) foi estocado a -20°C até o uso. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry (1951).

4.5.2.2. ELISA

O ELISA foi realizado de acordo com Brandão et al. (2009). Placas de 96 orifícios foram sensibilizadas previamente com 100µL do antígeno solúvel de *T. gondii* (STag) em cada orifício, na concentração de 0,5µg proteína/orifício diluído em tampão carbonato/bicarbonato (pH 9,6), e incubadas durante 18 horas a 4°C.

No momento do uso, o excesso de antígeno foi desprezado e a placa lavada quatro vezes com solução salina contendo Tween 20 a 0,05% (SST). Após secagem, os plasmas foram diluídos em PBS-T (Tween 20 a 0,05% em PBS pH 7,2), na diluição única de 1:100, e distribuídos nos orifícios da placa, seguida da incubação a 37°C por 45 minutos. Os plasmas foram ensaiados em duplicatas na mesma placa.

Após este período de incubação, foi realizada uma série de quatro lavagens com SST. Foram adicionados a cada orifício da placa, 100µL de PBS-T contendo anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (SIGMA) na diluição de 1:5000 em PBS-T. Após 45 minutos de incubação, as placas foram lavadas (série de quatro lavagens com SST), seguida da adição do 100µL do substrato (3µg 0-fenilenoldiamino em 15 ml de solução de ácido cítrico e 3µL de H₂O₂ - 30vol.).

A reação foi interrompida após 20 minutos com 30µL de H₂SO₄ 1:20 por orifício e a leitura realizada em leitor de ELISA "BIO RAD" Modelo 3550, com filtro de 490nm. O "cut off" para o ELISA foi considerado a média de absorbância de oito amostras de plasma de camundongos negativos para *T. gondii* mais três desvios padrão, testados em cada placa.

4.6. CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE *T. GONDII* ISOLADO DE RECÉM NASCIDOS COM TOXOPLASMOSE CONGÊNITA

4.6.1. EXTRAÇÃO DE DNA

Os taquizoítos de cada isolado foram obtidos conforme descrito no item "OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DE TAQUIZOÍTOS DE *TOXOPLASMA GONDII*". Quando a presença de hemácias era abundante no exsudato peritoneal, era adicionado solução de cloreto de amônia (0,83g de NH_4Cl + 0,1g de NaHCO_3 + 100ml de H_2O destilada) ao material, para lisar as hemácias, seguido de lavagem com PBS pH7,2. O sedimento contendo uma massa de taquizoítos foi estocado a -20°C até o momento da extração de DNA. A extração de DNA dos taquizoítos foi realizada utilizando-se o kit de purificação de DNA genômico *Wizard* (Promega) seguindo o protocolo do fabricante. O DNA purificado foi ressuspenso em água e mantido sob refrigeração, a 4°C, até a utilização.

4.6.2. ANÁLISE GENÉTICA POR POLIMORFISMO POR TAMANHO DE FRAGMENTO DE RESTRIÇÃO (PCR-RFLP)

A genotipagem dos isolados de *T. gondii* obtidos de recém nascidos com toxoplasmose congênita foi determinada pela análise de PCR-RFLP em onze segmentos de DNA: SAG1, SAG2 (3´SAG2 e 5´SAG2), SAG2-alt SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, e APICO (Tabela 1), segundo Su et al. (2009).

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 10µL, contendo 2µL de Tampão 5X green (Promega), 25mM de MgCl_2 , 2,5mM de

cada deoxinucleotídeo (dATP/dTTP/dGTP/dCTP, Invitrogen), 5u/μL de *Taq* DNA polimerase (Promega), 5pmol de cada iniciador e 1μL de DNA molde. Um controle negativo, sem DNA, foi incluído em cada reação. O primeiro passo da amplificação consistiu de quatro minutos de desnaturação a 95°C. Esse passo foi seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 60 segundos, e extensão a 72°C por 90 segundos. O passo de extensão no ciclo final foi estendido para cinco minutos. Os produtos da PCR foram visualizados em gel de poliacrilamida a 5%, corado com nitrato de prata.

Os produtos amplificados foram digeridos utilizando-se as endonucleases de restrição apropriadas segundo Su et al. (2009). As digestões foram realizadas em um volume final de 10μL, contendo 3μL do produto da PCR, 1μL do tampão correspondente e 2,5U (0,25μL) da enzima, a 37°C, por três horas, segundo o protocolo do fabricante. O DNA dos produtos digeridos foi purificado por extração com igual volume de fenol/clorofórmio (1:1), submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida a 5%, corado com nitrato de prata e fotografado. As cepas RH (tipo I), ME49 (tipo II) e VEG (tipo III) foram utilizadas como controle dos experimentos (Fux et al. 2003).

4.7. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Foi realizada a tabulação cruzada, por meio de uma tabela 2x2, entre os diferentes testes utilizados (nested PCR- B1, bioensaio) e determinação dos índices de sensibilidade relativa e especificidade relativa, razão de verossimilhança para o teste positivo, razão de verossimilhança para o teste negativo e o índice kappa. A persistência de IgG anti- *T. gondii* após 12 meses de vida foi utilizada como teste de referência.

Foi construído um banco de dados utilizando o *software* Microsoft Excel®, que foi utilizado como suporte ao estudo. No banco de dados foi possível consultar os resultados da sorologia, exames clínicos (oftalmológicos, neurológicos e auditivos) e dados pessoais (idade, local de nascimento) de cada criança visando análise estatística usando o programa OpenEpi 2.3. Para isto foram calculadas as frequências dos sinais clínicos nos recém nascidos e comparadas com os resultados dos testes de diagnóstico utilizando-se o teste de Fischer, teste G (Willians) e o teste do qui-quadrado com correção de Yates usando o valor de p bilateral.

Para a caracterização genotípica, foram analisados os perfis de bandas encontrados na digestão utilizando-se as endonucleases de restrição e comparados com os perfis de cepas de referência (Su et al. 2009).

Para a realização da análise filogenética, os padrões de bandas da eletroforese (dados genotípicos de polimorfismos de restrição) obtidas pelos cortes das

enzimas na RFLP-PCR dos isolados foram transformados em dados binários (“0”, ausência de banda; “1”, presença de banda) e tabulados, de acordo com o marcador, em programa específico de reconstrução filogenética, SplitsTree (Huson & Bryant, 2006), a fim de se obter a relação filogenética entre os genótipos obtidos no estudo e os já isolados no Brasil, descritos por Pena et al. (2008)

Tabela 1. Segmentos de DNA utilizados na análise de RFLP, com os iniciadores para amplificação e as endonucleases de restrição de polimorfismo.

Marcador	Cromossomo	Iniciadores	PCR (pb)	Endonucleases de restrição	Referência
SAG1	VIII	(F) CAATGTGCACCTGTAGGAAGC (R) GTGGTTCTCCGTCGGTGTGAG	390	<i>Sau96I</i> + <i>HaeIII</i>	Grigg et al. 2001
5'SAG2	VIII	(F) GAAATGTTTCAGGTTGCTGC (R) GCAAGAGCGAACTTGAACAC	242	<i>MboI</i>	Howe et al. 1997; Su et al. 2006
3'SAG2	VIII	(F) ATTCTCATGCCTCCGCTTC (R) AACGTTTCACGAAGGCACAC	222	<i>HhaI</i>	Howe et al. 1997
SAG3	XII	(F) TCTTGTCCGGGTGTTCACTCA (R) CACAAGGAGACCAGAAAGGA	225	<i>NciI</i>	Grigg et al. 2001
BTUB	IX	(F) GAGGTCATCTCGGACGAACA (R) TTGTAGGAACACCCGGACGC	411	<i>BsiEI</i> + <i>TaqI</i>	Khan et al. 2005b; Su et al. 2006
GRA6	X	(F) TTTCCGAGCAGGTGACCT (R) TCGCCGAAGAGTTGACATAG	344	<i>MseI</i>	Khan et al. 2005b; Su et al. 2006
C22-8	Ib	(F) TCTCTCTACGTGGACGCC (R) AGGTGCTTGGATATTCGC	521	<i>BsmAI</i> + <i>MbolI</i>	Khan et al. 2005b; Su et al. 2006
C29-2	III	(F) AGTTCTGCAGAGTGTCCG (R) TGTCTAGGAAAGAGGCGC	446	<i>HpyCH4IV</i> + <i>RsaI</i>	Khan et al. 2005b; Su et al. 2006
L358	V	(F) AGGAGGCGTAGCGCAAGT (R) CCCTCTGGCTGCAGTGCT	418	<i>HaeIII</i> + <i>NlaIII</i>	Khan et al. 2005b; Su et al. 2006
PK1	VI	(F) CGCAAAGGGAGACAATCAGT (R) TCATCGCTGAATCTCATTGC	903	<i>AvaI</i> + <i>RsaI</i>	Khan et al. 2005b; Su et al. 2006
SAG2-new	VIII	(F) TGCAAATCTTGAATTCTCAGTT (R) ATTTGACCCAGCGGGAGCAC	546	<i>HinfI</i> + <i>TaqI</i>	Khan et al. 2005b; Su et al. 2006
Apico	Plastid	(F) GCAAATCTTGAATTCTCAGTT (R) GGGATTGGAACCCCTTGATA	640	<i>AfIII</i> + <i>Ddel</i>	Su et al. 2006

Iniciadores *forward* (F) e *reverse* (R) indicam as extremidades 5' e 3', respectivamente.

5. RESULTADOS

5.1. DETECÇÃO DE *Toxoplasma gondii* EM SANGUE DE RECÉM NASCIDOS PELA PCR

A presença do *T. gondii* no sangue dos recém nascidos foi confirmada pela amplificação por *nested* PCR do gene repetitivo e conservado B1 (PCR – B1). Foi efetuada a tentativa de amplificação gênica do gene B1 nas 220 amostras verificando-se um total de 64 crianças (29,1%) positivas. A figura 2 apresenta resultados representativos obtidos através da Nested-PCR. Todos os resultados da Nested-PCR do gene B1 estão apresentados em ANEXOS.

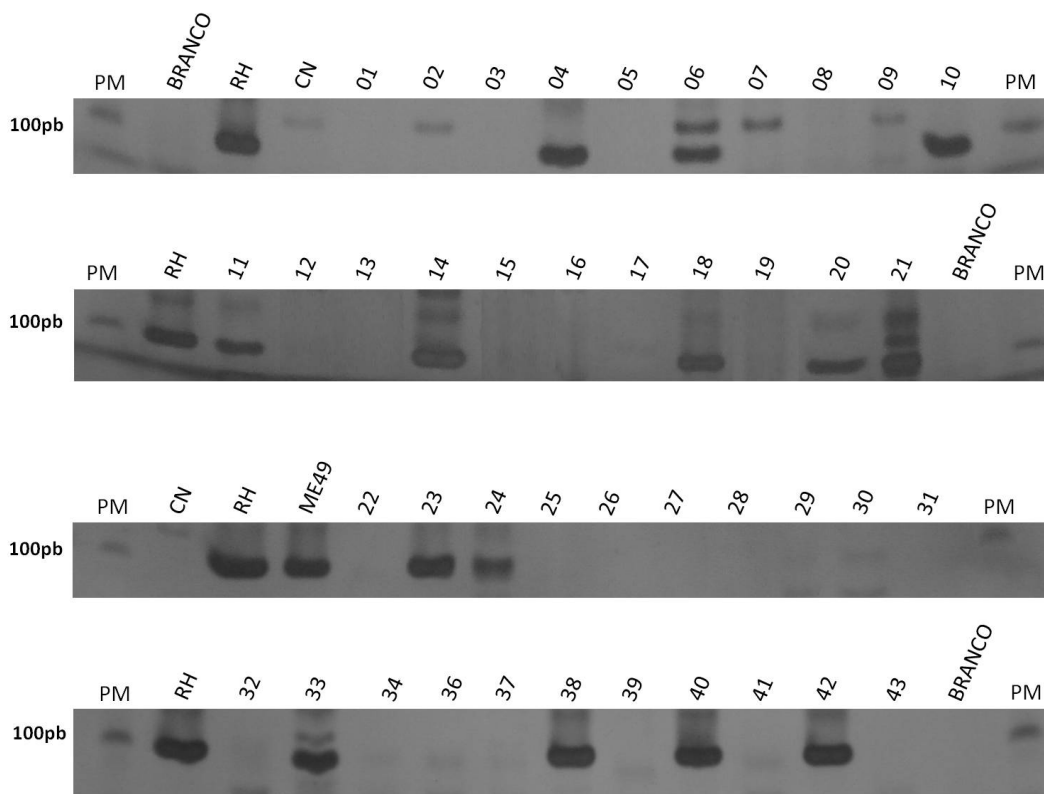


Figura 2. Nested PCR do gene B1. Pacientes 01 à 43. CN: controle negativo; DNA extraído de sangue de paciente não infectado com toxoplasmose. RH: controle positivo; DNA extraído de sangue negativo para a toxoplasmose adicionado de 100 taquizoítos/mL da cepa RH. ME49: controle positivo; DNA extraído de taquizoítos da cepa ME49.

A tabela 2 mostra os resultados da avaliação da sensibilidade, especificidade, razão de verossimilhança, e índice *Kappa* da PCR-B1 utilizando como teste referência a persistência de IgG anti – *T. gondii* após o 12° mês de vida.

A reprodutibilidade da PCR-B1 foi avaliada em ensaio mascarado. Aproximadamente 10% das amostras foram testadas observando-se uma boa reprodutibilidade (79,1%).

Tabela 2. Avaliação da sensibilidade, especificidade, razão de verossimilhança, e índice *Kappa* da PCR-B1 utilizando como teste referência a persistência de IgG anti – *T. gondii* após o 12° mês de vida.

		Teste Referência: IgG após 12 meses de vida		
		POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
PCR - B1	POSITIVO	56 (VP)	08 (FP)	64
	NEGATIVO	122 (FN)	34 (VN)	156
TOTAL		178	42	220

VP – verdadeiro positivo, FP – falso positivo, VN – verdadeiro negativo, FN – falso negativo

Sensibilidade relativa = 31,46 %

Especificidade relativa = 80,95 %

Razão de Verossimilhança para o Teste Positivo = 1,65

Razão de Verossimilhança para o Teste Negativo = 0,85

Kappa = 0,06 (concordância fraca)

As tabelas 3, 4 e 5 apresentam a distribuição dos casos positivos de acordo com o diagnóstico molecular para o gene B1 utilizando o sangue periférico dos recém nascidos considerados positivos pela persistência de IgG anti- *T. gondii* após 12 meses de vida. O resultado do diagnóstico molecular foi associado às

formas clínicas da doença: comprometimento oftalmológico, déficit auditivo e calcificações cerebrais.

Dentre as 177 crianças com persistência de IgG que passaram por avaliação oftalmológica, 132 apresentaram algum tipo de lesão ocular resultante da infecção transplacentária por *T. gondii*. Destas observa-se 39 casos (29,5%) com diagnóstico molecular positivo. Entre as 45 crianças sem lesão ocular, foram observados 11 casos (24,5%) com a PCR-B1 positiva, $p= 0,7723$ (Tabela 3).

Em relação à avaliação auditiva, 93 recém nascidos foram avaliados sendo que 32,3% (30) apresentaram déficit auditivo. Desses apenas 9 foram diagnosticados como positivos através das PCR –B1, $p=0,8140$ (Tabela 4).

A tabela 5 apresenta os resultados do diagnóstico molecular comparados com os obtidos pela avaliação neurológica das crianças consideradas positivas pela sorologia. Foram avaliadas 158 crianças e 20 demonstraram ter calcificações cerebrais. De acordo com a PCR-B1, em 4 desses pacientes com alterações, o DNA do *T. gondii* foi detectado no sangue circulante ($p= 0,3467$).

Nenhuma relação entre os resultados do diagnóstico molecular e aspectos clínicos da toxoplasmose congênita demonstrou ser significativa.

Tabela 3. Associação entre o resultado da PCR-B1 (diagnóstico molecular) e presença ou ausência de lesão ocular ($p= 0,7725$).

		LESÃO OFTALMOLÓGICA		
		SL	RA+RC+RAC	TOTAL
PCR-B1	POSITIVO	15	39	54
	NEGATIVO	30	93	123
TOTAL		45	132	177

SL - Sem lesão ocular, **RA** – retinocoroidite com lesão ativa, **RC** - retinocoroidite com lesão cicatrizada, **RAC** - retinocoroidite com lesão ativa e cicatrizada.

Tabela 4. Associação entre o resultado da PCR-B1 (diagnóstico molecular) e presença ou ausência de déficit auditivo ($p=0,8140$).

		DÉFICIT AUDITIVO		
		PRESENTE	AUSENTE	TOTAL
PCR-B1	POSITIVO	9	22	31
	NEGATIVO	21	41	62
TOTAL		30	63	93

Tabela 5. Associação entre o resultado da PCR-B1 (diagnóstico molecular) e presença ou ausência de calcificações cerebrais ($p= 0,3467$).

		CALCIFICAÇÕES CEREBRAIS		
		PRESENTE	AUSENTE	TOTAL
PCR-B1	POSITIVO	4	46	50
	NEGATIVO	16	92	108
TOTAL		20	138	158

5.2. ISOLAMENTO DO *T. gondii* POR BIOENSAIO

Através do bioensaio foram obtidos 27 isolados de *T. gondii*, o que evidenciou alta parasitemia em 12,3% das 220 crianças avaliadas. Se considerarmos apenas as 178 crianças com toxoplasmose congênita confirmada pela persistência de IgG anti-*T. gondii* após o 12º mês de vida, a parasitemia foi evidenciada em 15,2% das crianças infectadas. Os isolados foram nomeados, segundo normas definidas previamente no “Toxoplasma Centennial Congress” (Búzios, RJ, 2009) como TgCTBr 1 à 27 (TgCTBr = *T. gondii* - “Congenital Toxoplasmosis” - Brasil”) seguindo a ordem cronológica em que se efetuou o isolamento.

A tabela 6 mostra os resultados da avaliação da sensibilidade, especificidade, razão de verossimilhança, e índice *Kappa* do bioensaio utilizando como teste referência a persistência de IgG anti-*T. gondii* após o 12º mês de vida.

Quando é feita a combinação dos resultados do bioensaio com os do diagnóstico molecular (PCR-B1) a sensibilidade obtida aumenta para 41,6%, com especificidade próxima a 81% (Tabela 7). Entretanto a concordância entre os dois testes associados e a persistência de IgG após 12 meses de vida foi fraca (*Kappa*= 0,12).

Os 27 recém nascidos dos quais o *T. gondii* foi isolado são provenientes de diferentes mesorregiões do Estado de Minas Gerais. Esta distribuição dos isolados está apresentada na figura 3, sendo 1 criança procedente da Central

Mineira, 3 da Metropolitana de Belo Horizonte, 3 do Oeste de Minas, 3 do Sul/Sudoeste de Minas, 3 do Triângulo Mineiro e Alto do Paranaíba, 2 do Vale do Rio Doce, 3 da Zona da Mata, 3 do Jequitinhonha, 2 do Noroeste de Minas e 3 do Norte de Minas. Nas mesorregiões Vale do Mucuri e Campo das Vertentes não foram obtidos isolados.

Tabela 6. Avaliação da sensibilidade, especificidade, razão de verossimilhança, e índice *Kappa* do bioensaio utilizando como teste referência a persistência de IgG anti-*T. gondii* após o 12º mês de vida.

		Teste Referência: IgG após 12 meses de vida		
		POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
Bioensaio	POSITIVO	27 (VP)	0 (FP)	27
	NEGATIVO	151 (FN)	42 (VN)	193
TOTAL		178	42	220

VP – verdadeiro positivo, FP – falso positivo, VN – verdadeiro negativo, FN – falso negativo

Sensibilidade relativa = 15,17%

Especificidade relativa = 100%

Razão de Verossimilhança para o Teste Positivo = ∞

Razão de Verossimilhança para o Teste Negativo = 0,85%

Kappa = 0,06 (concordância fraca)

Tabela 7. Avaliação da sensibilidade, especificidade, razão de verossimilhança, e índice *Kappa* do bioensaio e/ou PCR-B1 utilizando como teste referência a persistência de IgG anti-*T. gondii* após o 12° mês de vida.

		Teste Referência: IgG após 12 meses de vida		
		POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
Bioensaio e/ou PCR B1	POSITIVO	74 (VP)	08 (FP)	82
	NEGATIVO	104 (FN)	34 (VN)	138
TOTAL		178	42	220

VP – verdadeiro positivo, FP – falso positivo, VN – verdadeiro negativo, FN – falso negativo

Sensibilidade relativa = 41,57%

Especificidade relativa = 80,95%

Razão de Verossimilhança para o Teste Positivo = 2,18

Razão de Verossimilhança para o Teste Negativo = 0,72

Kappa = 0,12 (concordância fraca)

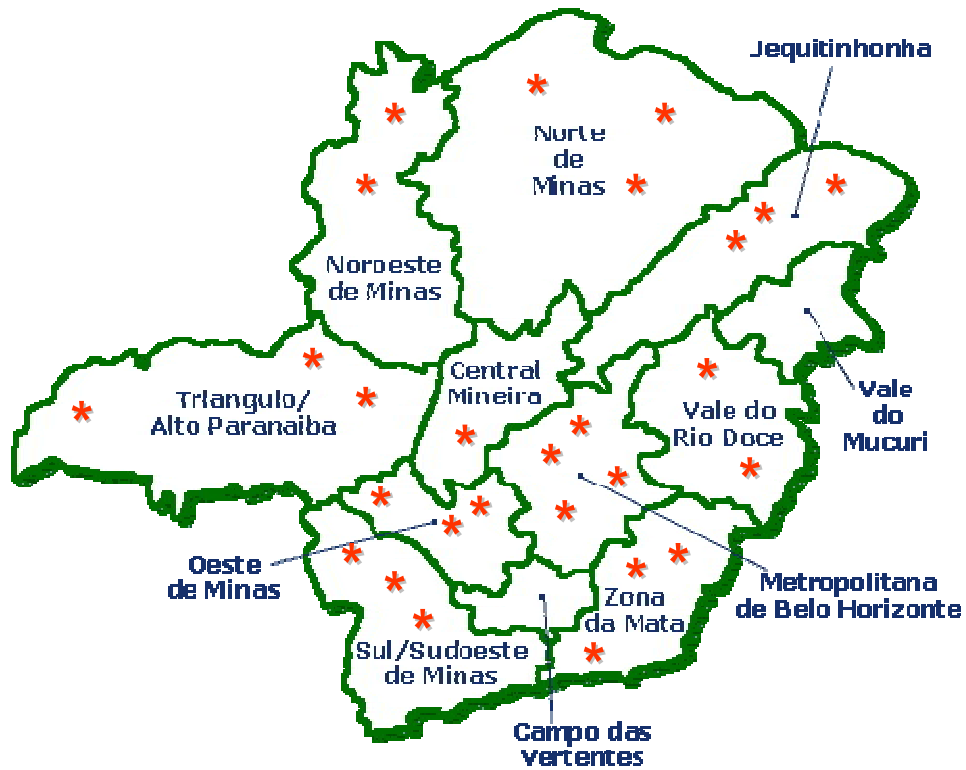


Figura 3. Localização da origem dos isolados de *T. gondii* provenientes de recém nascidos nas doze mesorregiões em Minas Gerais. * isolados de *T. gondii*

A tabela 8 apresenta a idade média das crianças ao realizar a coleta de sangue para o bioensaio, variando entre 31 e 86 dias, a média de idade foi de 59 (+/- 14) dias. Apresenta ainda a mesorregião de origem, sexo e presença de sinais clínicos compatíveis com toxoplasmose. Dos 27 isolados, 70,4% foram obtidos do sangue periférico de recém nascidos do sexo masculino.

Em relação aos aspectos clínicos, 7 isolados vieram de pacientes que não apresentavam retinocoroidite, 5 de pacientes com lesão cicatrizada, 2 de pacientes com lesão ativa e os demais 13 de pacientes com lesão ativa/cicatrizada concomitantemente.

A avaliação auditiva foi realizada em apenas 12 recém nascidos dos quais foram isolados o *T. gondii*. A metade dessas crianças avaliadas apresentava défict auditivo. Calcificações cerebrais foram identificadas em 3 das 26 crianças avaliadas.

Tabela 8. Isolados de *Toxoplasma gondii* de acordo com as características dos recém-nascidos de onde foram obtidos o sangue periférico para o isolamento.

ISOLADOS	SEXO DO PACIENTE	IDADE DO PACIENTE	MESORREGIÃO	LESÃO OFTAMOLÓGICA	DÉFICIT AUDITIVO	CALCIFICAÇÕES CEREBRAIS
TgCTBr 1	Masculino	45 dias	Zona da Mata	RC	-	-
TgCTBr 2	Masculino	62 dias	Norte de Minas	RAC	NR	-
TgCTBr 3	Masculino	52 dias	Vale do Jequitinhonha	SL	-	-
TgCTBr 4	Masculino	31 dias	Central Mineira	RAC	-	-
TgCTBr 5	Feminino	31 dias	Oeste de Minas	SL	-	-
TgCTBr 6	Feminino	40 dias	Noroeste de Minas	SL	+	-
TgCTBr 7	Feminino	43 dias	Triângulo Mineiro / Alto do Paranaíba	RAC	+	-
TgCTBr 8	Masculino	41 dias	Triângulo Mineiro / Alto do Paranaíba	RAC	+	-
TgCTBr 9	Feminino	51 dias	Vale do Rio Doce	RAC	NR	+
TgCTBr 10	Masculino	44 dias	Vale do Rio Doce	RA	NR	-
TgCTBr 11	Masculino	78 dias	Metropolitana de Belo Horizonte	RA	NR	NR
TgCTBr 12	Masculino	61 dias	Metropolitana de Belo Horizonte	RAC	NR	+
TgCTBr 13	Feminino	64 dias	Sul/ Sudoeste de Minas	SL	NR	-
TgCTBr 14	Masculino	63 dias	Noroeste de Minas	RAC	NR	-
TgCTBr 15	Masculino	86 dias	Oeste de Minas	RC	NR	-
TgCTBr 16	Masculino	60 dias	Norte de Minas	RC	NR	-
TgCTBr 17	Masculino	73 dias	Zona da Mata	RAC	NR	-
TgCTBr 18	Masculino	61 dias	Vale do Jequitinhonha	SL	NR	-
TgCTBr 19	Feminino	56 dias	Metropolitana de Belo Horizonte	SL	NR	-
TgCTBr 20	Feminino	73 dias	Sul/ Sudoeste de Minas	RC	+	-
TgCTBr 21	Masculino	63 dias	Metropolitana de Belo Horizonte	RAC	-	+
TgCTBr 22	Feminino	69 dias	Vale do Jequitinhonha	RAC	+	-
TgCTBr 23	Masculino	65 dias	Norte de Minas	RAC	+	-
TgCTBr 24	Masculino	73 dias	Oeste de Minas	RC	-	-
TgCTBr 25	Masculino	64 dias	Zona da Mata	RAC	NR	-
TgCTBr 26	Masculino	67 dias	Sul/ Sudoeste de Minas	RAC	NR	-
TgCTBr 27	Masculino	80 dias	Triângulo Mineiro / Alto do Paranaíba	*SL	NR	-

SL – sem lesão oftalmológica, RA – retinocoroidite com lesão ativa, RC - retinocoroidite com lesão cicatrizada, RAC - retinocoroidite com lesão ativa e cicatrizada, * tem lesão ocular grave, mas não Retinocoroidite; +: presente; -: ausente; NR: não realizado

A tabela 9 apresenta a distribuição dos casos de isolamento positivo em relação à ocorrência ou não de lesão ocular nas 178 crianças com toxoplasmose congênita. Entre as 132 crianças com lesão ocular, foram observados 20 casos (14,5%) com bioensaio positivo. Entre 46 crianças sem lesão ocular, foram observados sete casos (15,2%) com bioensaio positivo ($p=0.4099$).

Em relação ao déficit auditivo, apenas 93 recém nascidos infectados foram avaliados. Os 12 isolados obtidos são provenientes de 6 pacientes com audição normal e 6 que apresentaram algum tipo de perda auditiva. Em vinte quatro pacientes que apresentaram déficit auditivo, o bioensaio em camundongos foi negativo, $p=0,1411$ (Tabela 10).

Cento e cinquenta e oito pacientes com toxoplasmose congênita foram submetidos a avaliações neurológicas (calcificações cerebrais). O isolamento do *T. gondii* foi obtido em 24 destas crianças sendo que a quase a totalidade dos isolados (23) são provenientes de crianças sem calcificações cerebrais. Dos 20 recém nascidos com calcificações cerebrais, apenas 1 teve resultado positivo na bioprova, $p=0,1513$ (Tabela 11).

Não foi observada nenhuma relação significativa entre os resultados do isolamento por bioensaio e sinais clínicos da toxoplasmose congênita.

Dentre 27 os isolados, apenas um foi obtido simultaneamente dos dois camundongos utilizados no experimento de bioensaio. Nos demais, apenas um

dos camundongos foi infectado. Durante a manutenção do isolado TgCTBr 6, os camundongos inoculados com cistos via oral não se infectaram e como os taquizoítos desse isolado ainda não haviam sido criopreservados, esse isolado foi perdido.

Tabela 9. Associação entre isolamento do *Toxoplasma gondii* por bioensaio e presença ou ausência de lesão oftalmológica (p= 0.4099)

		LESÃO OFTALMOLÓGICA		
		SL	RA+RC+RAC	TOTAL
ISOLAMENTO (Bioensaio)	POSITIVO	7	20	27
	NEGATIVO	39	112	151
TOTAL		46	132	178

SL - Sem lesão oftalmológica, **RA** – retinocoroidite com lesão ativa, **RC** - retinocoroidite com lesão cicatrizada, **RAC** - retinocoroidite com lesão ativa e cicatrizada

Tabela 10. Associação entre isolamento do *Toxoplasma gondii* por bioensaio e presença ou ausência de déficit auditivo (p=0,1411).

		DÉFICIT AUDITIVO		
		POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
ISOLAMENTO (Bioensaio)	POSITIVO	6	6	12
	NEGATIVO	24	57	81
TOTAL		30	63	93

Tabela 11. Associação entre isolamento do *Toxoplasma gondii* por bioensaio e presença ou ausência de calcificações cerebrais (p=0,1513).

		CALCIFICAÇÕES CEREBRAIS		
		POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
ISOLAMENTO (Bioensaio)	POSITIVO	1	23	24
	NEGATIVO	19	115	134
TOTAL		20	138	158

5.3. DETERMINAÇÃO DA VIRULÊNCIA DE ISOLADOS DE *TOXOPLASMA GONDII*

Inicialmente apresentamos os resultados de virulência com duas cepas padrão: RH e ME49. A cepa RH é virulenta para camundongos em todos os inóculos, com a morte dos animais ocorrendo 5-10 dias após a infecção. Como mostra a Figura 6, as infecções com a cepa RH resultaram em 100% de mortalidade dos animais. A cepa ME49 é considerada avirulenta para camundongos nos inóculos realizados, pois todos os animais sobreviveram após o período de 30 dias de observação (Figura 4) sendo que o exame do cérebro desses camundongos revelou a presença de cistos cerebrais, confirmando a infecção por *T. gondii*.

Os resultados de virulência dos novos isolados foram comparados com a mortalidade dose-dependente da cepa RH (virulenta) e da cepa ME49 (avirulenta). De acordo com os critérios estabelecidos no item Material e Métodos, foi possível agrupar os isolados em uma das três categorias pré estabelecidas: isolados avirulentos, isolados com virulência intermediária e isolados virulentos.

Os resultados revelaram uma predominância de isolados apresentando um fenótipo de virulência intermediário em relação aos fenótipos observados para as cepas referências (RH e ME49). Dos 26 isolados testados, 14 (TgCTBr2, TgCTBr7, TgCTBr12, TgCTBr14, TgCTBr15, TgCTBr16, TgCTBr18, TgCTBr19, TgCTBr20, TgCTBr21, TgCTBr22, TgCTBr24, TgCTBr26, TgCTBr27) foram caracterizados como de virulência intermediária sendo que a letalidade foi

dependente da carga parasitária do inóculo (Figura 5). Dez isolados (TgCTBr1, TgCTBr3, TgCTBr4, TgCTBr8, TgCTBr9, TgCTBr11, TgCTBr13, TgCTBr17, TgCTBr23, TgCTBr25) foram caracterizados como virulentos (Figura 6), pois apresentaram LD₁₀₀ igual a 1 taquizoíto resultando em 100% de mortalidade dos animais. Apenas 2 isolados (TgCTBr5, TgCTBr10), foram caracterizados como avirulentos por apresentaram um comportamento semelhante ao da cepa ME49 (Figura 4). Esses isolados não foram virulentas para camundongos nos inóculos avaliados, pois todos os animais sobreviveram após o período de 30 dias de observação. A classificação final de virulência dos isolados é apresentada na tabela 12.

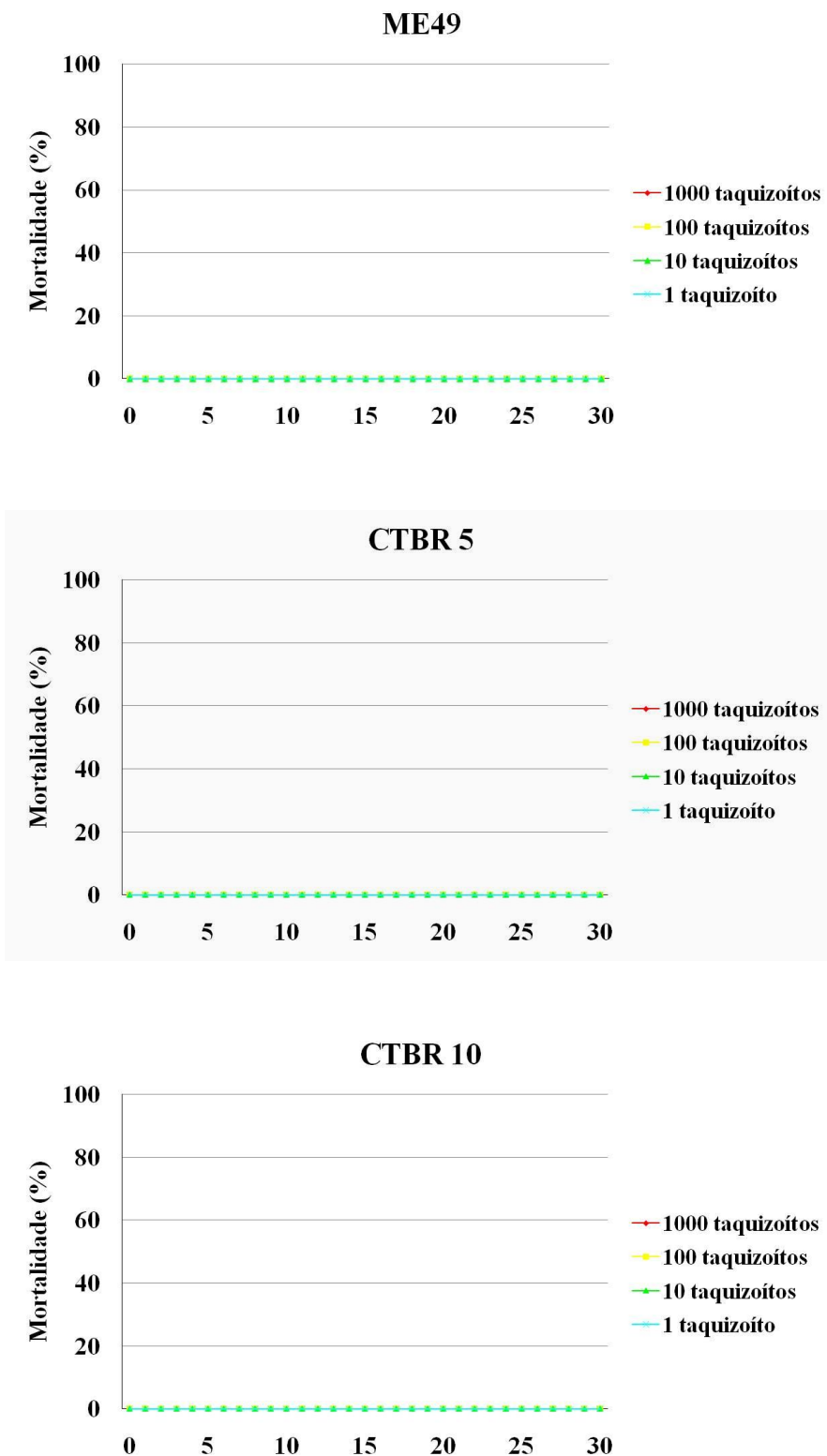
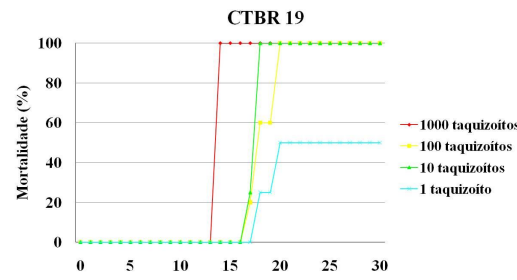
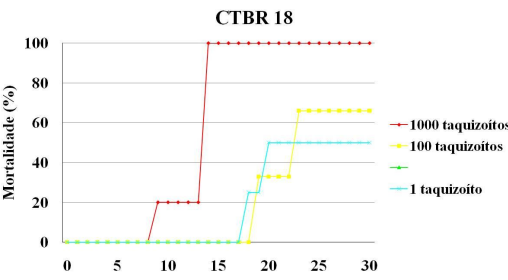
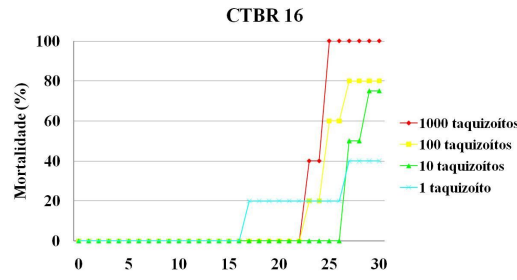
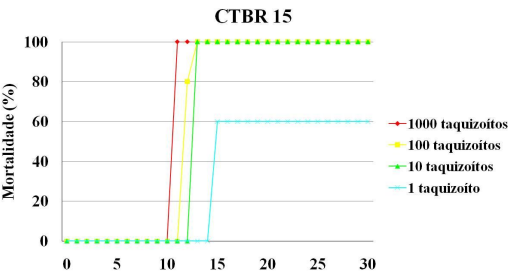
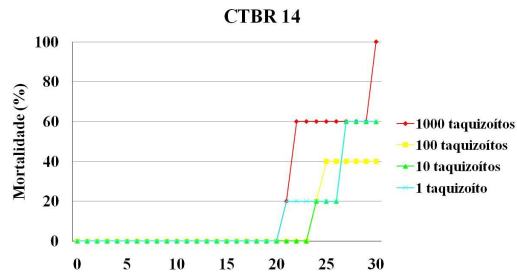
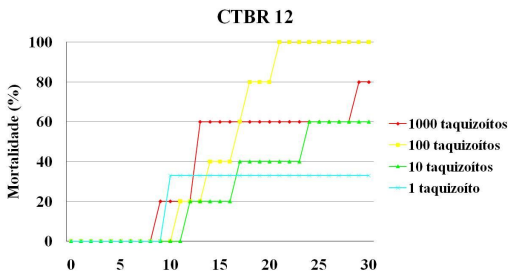
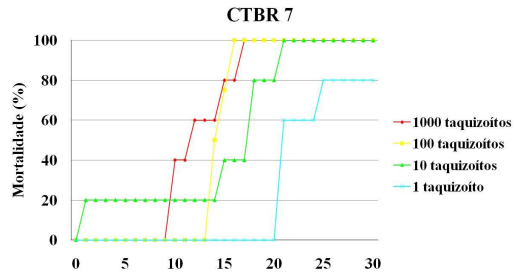
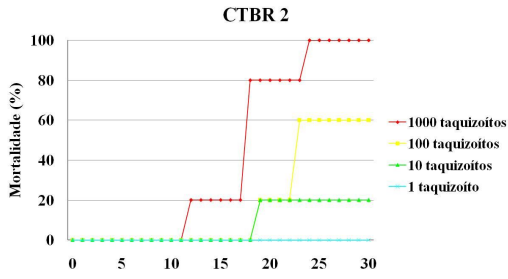


Figura 4. Mortalidade acumulativa em camundongos fêmeas BALB/c inoculados pela via intraperitoneal com diferentes doses de tachizoítos dos isolados classificados como avirulentos: ME49 (cepa padrão), TgCTBr5 e TgCTBr10 do *Toxoplasma gondii*.



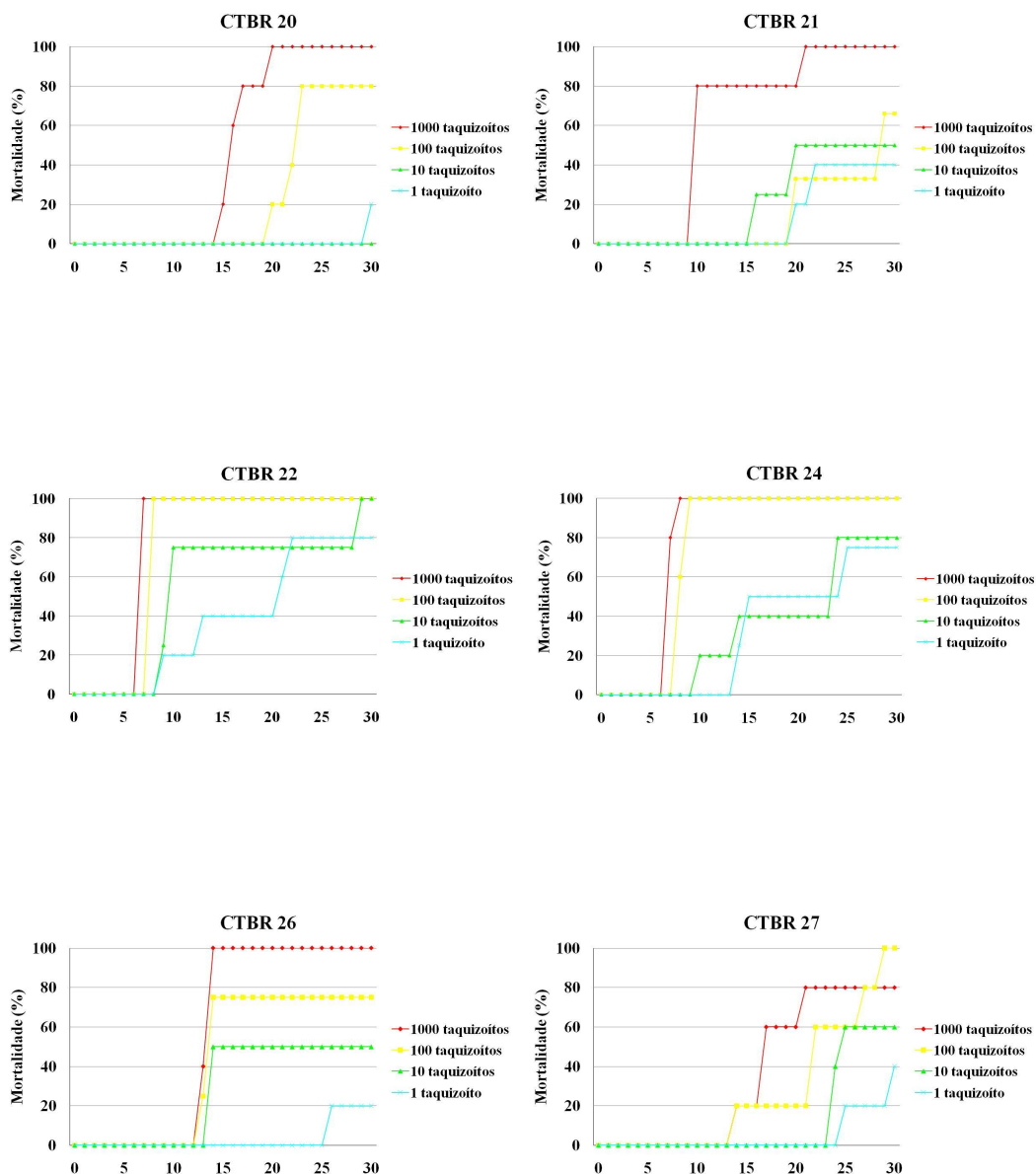
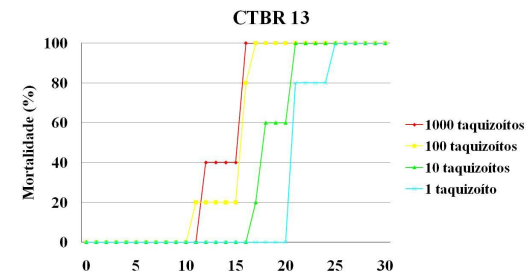
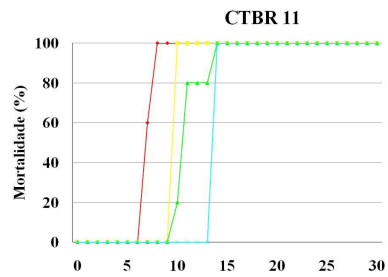
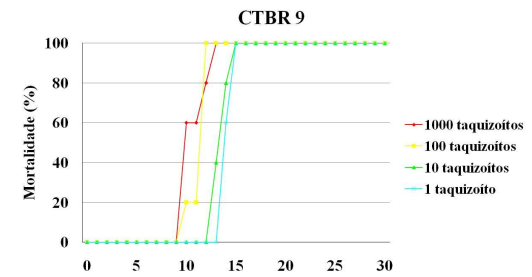
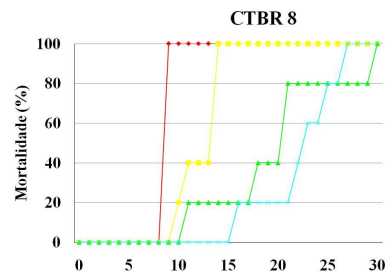
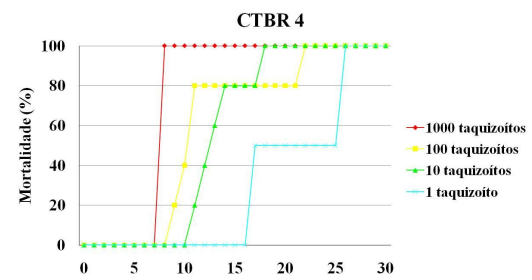
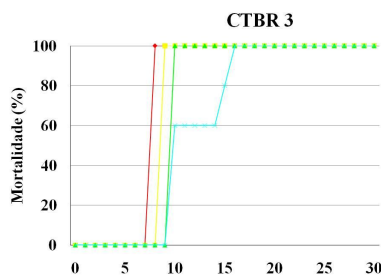
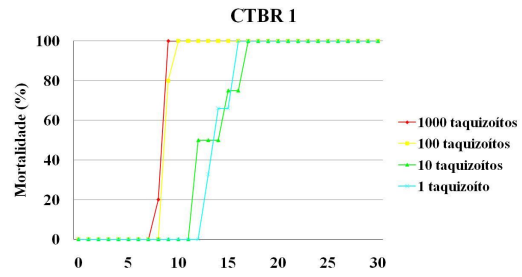
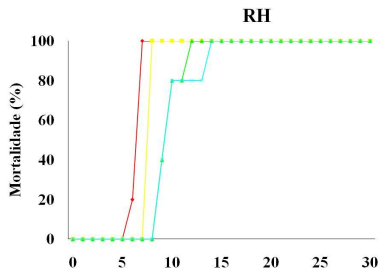


Figura 5. Mortalidade acumulativa em camundongos fêmeas BALB/c inoculados pela via intraperitoneal com diferentes doses de tachizoítos dos isolados classificados como de virulência intermediária: TgCTBr2, TgCTBr7, TgCTBr12, TgCTBr14, TgCTBr15, TgCTBr16, TgCTBr18, TgCTBr19, TgCTBr20, TgCTBr21, TgCTBr22, TgCTBr24, TgCTBr26, TgCTBr27 do *Toxoplasma gondii*.



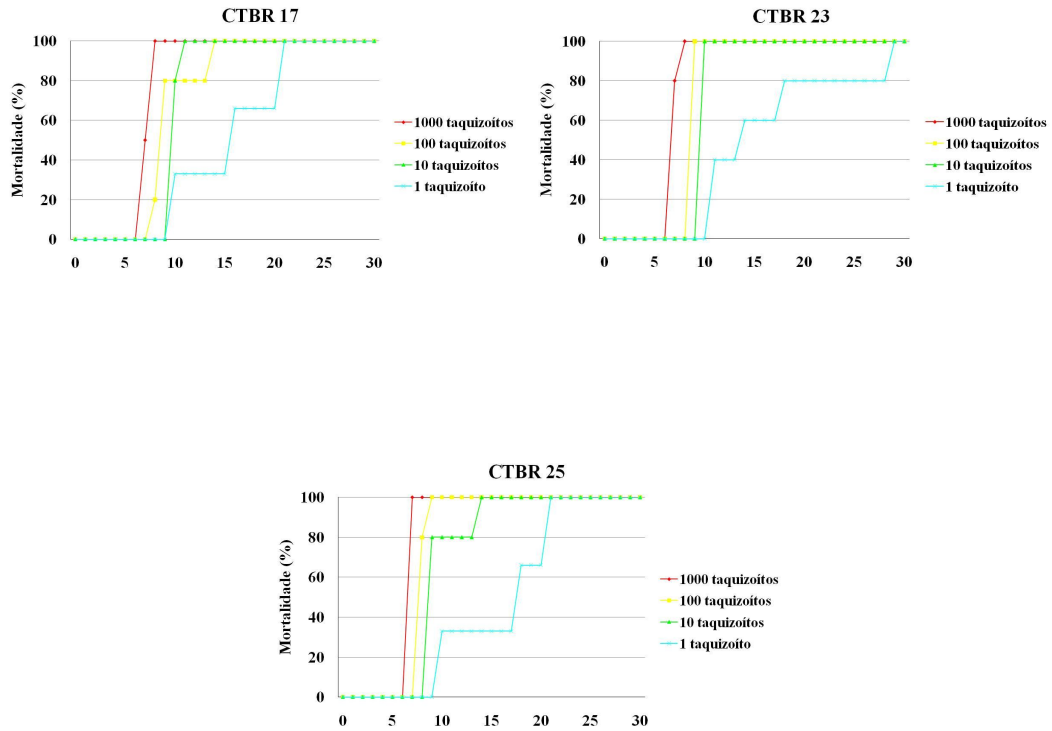


Figura 6. Mortalidade acumulativa em camundongos fêmeas BALB/c inoculados pela via intraperitoneal com diferentes doses de tachizoítos dos isolados classificados como virulentos: RH (cepa padrão), TgCTBr1, TgCTBr3, TgCTBr4, TgCTBr8, TgCTBr9, TgCTBr11, TgCTBr13, TgCTBr17, TgCTBr23, TgCTBr25 do *Toxoplasma gondii*.

Tabela 12. Classificação da virulência dos isolados de *T. gondii* em camundongos BALB/c.

Isolados	10³ taq.	10² taq.	10¹ taq.	10⁰ taq.	Classificação
RH	5 ^a /5 ^b	5/5	5/5	5/5	Virulento
ME49	0/4	0/5	0/5	0/5	Avirulento
TgCTBr1	5/5	5/5	4/4	3/3	Virulento
TgCTBr2	5/5	3/5	1/5	0/3	Virulência Intermediária
TgCTBr3	5/5	5/5	5/5	5/5	Virulento
TgCTBr4	5/5	5/5	5/5	2/2	Virulento
TgCTBr5	0/5	0/5	0/5	0/4	Avirulento
TgCTBr7	5/5	4/4	5/5	4/5	Virulência Intermediária
TgCTBr8	5/5	5/5	5/5	5/5	Virulento
TgCTBr9	5/5	5/5	5/5	5/5	Virulento
TgCTBr10	0/5	0/4	0/5	0/2	Avirulento
TgCTBr11	5/5	5/5	5/5	1/1	Virulento
TgCTBr12	4/5	5/5	3/5	1/3	Virulência Intermediária
TgCTBr13	5/5	5/5	5/5	5/5	Virulento
TgCTBr14	4/4	2/5	3/5	3/5	Virulência Intermediária
TgCTBr15	5/5	5/5	5/5	3/5	Virulência intermediária
TgCTBr16	5/5	4/5	3/4	2/5	Virulência Intermediária
TgCTBr17	4/4	5/5	5/5	3/3	Virulento
TgCTBr18	5/5	2/3	NR	2/4	Virulência Intermediária
TgCTBr19	5/5	5/5	4/4	2/4	Virulência Intermediária
TgCTBr20	5/5	4/5	0/5	1/5	Virulência Intermediária
TgCTBr21	5/5	2/3	2/4	2/5	Virulência Intermediária
TgCTBr22	5/5	5/5	4/4	4/5	Virulência Intermediária
TgCTBr23	5/5	4/4	5/5	5/5	Virulento
TgCTBr24	5/5	5/5	4/5	3/4	Virulência Intermediária
TgCTBr25	5/5	5/5	5/5	3/3	Virulento
TgCTBr26	5/5	¾	2/4	1/5	Virulência Intermediária
TgCTBr27	4/5	5/5	3/5	2/5	Virulência Intermediária

^aNúmero de camundongos fêmeas BALB/c que morreram. ^b número total de camundongos infectados para cada inóculo. NR: não realizado.

A tabela 13 correlaciona a caracterização da virulência dos isolados de *T. gondii* com a presença ou ausência de lesão ocular no recém nascido do qual ele foi obtido. Dos dez isolados caracterizados como virulentos, oito (80%) foram obtidos de recém nascidos apresentando retinocoroidite. No caso dos 14 isolados de virulência intermediária, onze (79%) foram obtidos de recém nascidos com retinocoroidite. Um isolado avirulento foi obtido de um recém nascido que apresentava retinocoroidite e o outro de um recém nascido sem lesão.

A associação da virulência dos isolados com a presença de déficit auditivo está demonstrada na tabela 14. Dos cinco isolados obtidos de crianças diagnosticadas com algum tipo de déficit auditivo, nenhum foi classificado como avirulento, dois foram considerados virulentos e três de virulência intermediária. Os 6 isolados originários de crianças com audição normal demonstraram diferentes graus de virulência, sendo que 84% desses foram classificados como virulentos ou de virulência intermediária.

A associação entre a virulência e presença de calcificações cerebrais nos pacientes de onde foi isolado o *T. gondii* está demonstrada na tabela 15. A maioria dos isolados (22/25 - 88%) foram encontrados em crianças que não apresentaram calcificações cerebrais. Não foram observadas associações significativas entre os sinais clínicos da toxoplasmose congênita e a virulência dos isolados.

Tabela 13. Associação entre a virulência dos isolados de *T. gondii* em camundongos e presença ou ausência de lesão oftalmológica em crianças com toxoplasmose congênita (G= 0,6121; p = 0,7363).

		LESÃO OFTALMOLÓGICA		
		SL	RA+RC+RAC	TOTAL
VIRULÊNCIA DO ISOLADO	VIRULENTO	2	8	10
	VIRULÊNCIA INTERMEDIÁRIA	3	11	14
	AVIRULENTO	1	1	2
TOTAL		6	20	26

SL - Sem lesão oftalmológica, **RA** – retinocoroidite com lesão ativa, **RC** - retinocoroidite com lesão cicatrizada, **RAC** - retinocoroidite com lesão ativa e cicatrizada

Tabela 14. Associação entre a virulência dos isolados de *T. gondii* em camundongos e presença ou ausência de déficit auditivo em crianças com toxoplasmose congênita (G= 1,2758; p = 0,5284)

		DÉFICIT AUDITIVO		
		PRESENTE	AUSENTE	TOTAL
VIRULÊNCIA DO ISOLADO	VIRULENTO	2	3	5
	VIRULÊNCIA INTERMEDIÁRIA	3	2	5
	AVIRULENTO	0	1	1
TOTAL		5	6	11

Tabela 15. Associação entre a virulência dos isolados de *T. gondii* em camundongos e presença ou ausência de calcificações cerebrais em crianças com toxoplasmose congênita (G= 0,1444; p = 0,9304)

		CALCIFICAÇÕES CEREBRAIS		
		PRESENTE	AUSENTE	TOTAL
VIRULÊNCIA DO ISOLADO	VIRULENTO	1	7	8
	VIRULÊNCIA INTERMEDIÁRIA	2	14	16
	AVIRULENTO	0	1	1
TOTAL		3	22	25

5.4. CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE ISOLADOS DE *T. GONDII* OBTIDOS DE RECÉM NASCIDOS COM TOXOPLASMOSE CONGÊNITA POR POLIMORFISMO POR TAMANHO DE FRAGMENTO DE RESTRIÇÃO (PCR-RFLP)

Dos 27 isolados obtidos por bioensaio realizado com sangue periférico de recém nascidos, 25 foram genotipados. Não foi possível realizar a genotipagem completa em uma amostra (TgCTBr16) pela ocorrência de produtos de digestão extremamente polimórficos além da não amplificação para alguns marcadores. O isolado TgCTBr6 foi perdido antes da obtenção de DNA.

Os resultados obtidos pela genotipagem dos 25 isolados de *T. gondii* com os 11 marcadores - SAG1, SAG2 (3'SAG2 e 5'SAG2), SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, SAG2-alt e APICO – estão apresentados nas figuras 1 a 12 do anexo 4 e sumarizados na tabela 16.

A tabela 17 apresenta os isolados agrupados de acordo com os genótipos identificados, além de apresentar a mesorregião de origem, a apresentação clínica no recém nascido e a virulência em camundongos. Não foi observada nenhuma associação entre os genótipos e as localidades de origem dos isolados. Em relação à virulência em camundongos, mesmos genótipos apresentaram graus semelhantes de virulência.

Observou-se uma alta variabilidade genotípica nos isolados obtidos dos recém nascidos, sendo identificados quatorze genótipos diferentes (#1-14) e um isolado (TgCTBr19) com infecção mista onde foi observada uma mistura de 2

alelos em quatro loci: 5' + 3' SAG2 (genótipos I e III), SAG2 new (genótipos I e III), BTUB (genótipos I e III) e c29-2 (genótipos I e III).

Não foi encontrado nenhum genótipo clonal (Tipo I, II ou III) nos isolados estudados. Dos quatorze genótipos encontrados, doze (#3-14) são considerados atípicos, e outros dois (#1 e #2) comuns no Brasil. Identificamos a presença dos genótipos BrII (1 amostra) e BrIII (7 amostras) nos nossos isolados.

Dos 25 genótipos identificados pela PCR-RFLP, treze são caracterizados por dois ou mais isolados (#1-5) enquanto os outros doze genótipos tiveram apenas um isolado de cada (#6-18).

O genótipo #1 (tipo BrII) corresponde a 7 isolados provenientes de diferentes mesorregiões do Estado (Triângulo Mineiro e Alto do Paranaíba: TgTCBr 8 e TgTCBr27, Metropolitana de Belo Horizonte: TgCTBr11, Noroeste de Minas: TgCTBr13, Norte de Minas: TgCTBr2, Sul/ Sudoeste de Minas: TgCTBr20, Vale do Rio Doce: TgCTBr9) (Tabela 17). Em relação à virulência em camundongos, 3 isolados tipo BrII foram classificados como virulentos e 4 de virulência intermediária.

O genótipo #2 (tipo BrIII) foi identificado em apenas um isolado originário do Oeste de Minas. Esse isolado (TgCTBr5) se mostrou avirulento pois não foi observada nenhuma morte nos camundongos infectados. Este isolado foi obtido de criança sem nenhum dos três sinais clínicos analisados.

O genótipo #3 corresponde a três isolados, sendo dois da Zona da Mata (TgCTBr1 e TgCTBr25) e um (TgCTBr3) do Vale do Jequitinhonha. Todos os isolados foram considerados virulentos para camundongos.

Dois isolados (TgCTBr15 e TgCTBr23) identificados como genótipos #4 foram isolados de pacientes de Oeste e Norte de Minas respectivamente. Mesmo com o mesmo genótipo, estes isolados demonstraram ter diferentes graus de virulência para camundongos, sendo um de virulência intermediária e outro virulento.

O genótipo #5 também foi identificado em dois isolados de diferentes mesorregiões do Estado. TgCTBr4 e TgCTBr17 foram isolados de recém nascidos da Central Mineira e Zona da Mata respectivamente. Apesar de origens diferentes, o comportamento desses isolados em camundongos foi semelhante. Ambos obtiveram 100% de mortalidade em camundongos infectados demonstrando que este genótipo pode ser considerado virulento para camundongos.

Tabela 16. Perfil genotípico e de virulência das amostras de *T. gondii* isolados em sangue periférico de recém nascidos de MG.

ISOLADOS	MARCADORES GENÉTICOS											VIRULÊNCIA	TIPO BR*	SEMELHANTE	
	CEPAS	SAG1	5'-3'SAG2	SAG2New	SAG3	BTUB	GRA6	c22-8	c29-2	L358	PK1				Apico
RH88	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	Virulento	-	-
ME49	II ou III	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	Avirulento	-	-
VEG	II ou III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	Avirulento	-	-
TgCTBr 1	u-1	I	II	III	III	III	II	III	I	III	I	III	Virulento	-	Único
TgCTBr 2	I	I	II	III	III	III	I	III	I	II	III	III	Intermediária	BR II	TgCatBr1
TgCTBr 3	u-1	I	II	III	III	III	II	III	I	III	I	III	Virulento	-	Único
TgCTBr 4	I	I	II	III	III	III	II	I	I	III	I	III	Virulento	-	Único
TgCTBr 5	I	III	III	III	III	III	II	III	III	III	III	III	Avirulento	BR III	TgCatBr3
TgCTBr 7	I	III	III	III	I	III	I	III	III	u-1	III	III	Intermediária	-	Único
TgCTBr 8	I	I	II	III	III	III	I	III	I	II	III	III	Virulento	BR II	TgCatBr1
TgCTBr 9	I	I	II	III	III	III	I	III	I	II	III	III	Virulento	BR II	TgCatBr1
TgCTBr 10	I	I	u-1	III	I	II	II	I	I	I	I	I	Avirulento	-	Único
TgCTBr 11	I	I	II	III	III	III	I	III	I	II	III	III	Virulento	BR II	TgCatBr1
TgCTBr 12	I	III	III	III	III	III	II	I	I	III	I	III	Intermediária	-	Único
TgCTBr 13	I	I	II	III	III	III	III	I	I	III	I	III	Virulento	-	Único
TgCTBr 14	I	I	II	III	III	III	I	III	I	II	III	III	Intermediária	BR II	TgCatBr1
TgCTBr 15	I	I	I	III	I	II	I	I	I	I	I	I	Intermediária	-	Único
TgCTBr 16	I	Nd	III	nd	III	III	II	nd	nd	nd	nd	III			
TgCTBr 17	I	I	II	III	III	III	II	I	I	III	I	III	Virulento	-	Único
TgCTBr 18	I	I	I	III	I	III	II	I	III	I	III	III	Intermediária	-	Único
TgCTBr 19	I	mix I/III	mix I/III	III	mix I/III	III	II	mix I/III	III	I	III	III	Intermediária	-	MISTA
TgCTBr 20	I	I	II	III	III	III	I	III	I	II	III	III	Intermediária	-	Único
TgCTBr 21	u-1	I	II	I	III	II	I	I	I	I	III	III	Intermediária	BR II	TgCatBr1
TgCTBr 22	u-1	I	II	III	III	III	II	III	I	III	III	III	Intermediária	-	Único
TgCTBr 23	I	I	I	III	I	II	I	I	I	I	I	I	Virulento	-	Único
TgCTBr 24	I	I	I	III	I	III	I	III	III	I	III	III	Intermediária	-	Único
TgCTBr 25	u-1	I	II	III	III	III	II	III	I	III	I	III	Virulento	-	Único
TgCTBr 26	I	I	I	III	III	III	I	III	I	II	III	III	Intermediária	-	Único
TgCTBr 27	I	I	II	III	III	III	I	III	I	II	III	III	Intermediária	BR II	TgCatBr1

Nd – não determinado; * Conforme classificação proposta por Pena et al. (2008).

Tabela 17. Associação entre os genótipos de isolados de *Toxoplasma gondii* com a mesorregião de origem, apresentação clínica no recém nascido e virulência em camundongos.

ISOLADOS	MESORREGIÃO	LESÃO OFTAMOLÓGICA	DÉFICIT AUDITIVO	CALCIFICAÇÕES CEREBRAIS	VIRULÊNCIA	GENÓTIPO
TgCTBr 02	Norte de Minas	RAC	NR	-	Virulência intermediária	
TgCTBr 08	Triângulo Mineiro / Ato do Paranaíba	RAC	+	-	Virulenta	
TgCTBr 09	Vale do Rio Doce	RAC	NR	+	Virulenta	#1 (BR II)
TgCTBr 11	Metropolitana de Belo Horizonte	RA	NR	NR	Virulenta	
TgCTBr 14	Noroeste de Minas	RAC	NR	-	Virulência intermediária	
TgCTBr 20	Sul/ Sudoeste de Minas	RC	+	-	Virulência intermediária	
TgCTBr 27	Triângulo Mineiro / Ato do Paranaíba	SL	NR	-	Virulência intermediária	
TgCTBr 05	Oeste de Minas	SL	-	-	Avirulenta	#2 (BR III)
TgCTBr 01	Zona da Mata	RC	-	-	Virulenta	
TgCTBr 03	Vale do Jequitinhonha	SL	-	-	Virulenta	#3 (Único)
TgCTBr 25	Zona da Mata	RAC	NR	-	Virulenta	
TgCTBr 15	Oeste de Minas	RC	NR	-	Virulência intermediária	# 4 (Único)
TgCTBr 23	Norte de Minas	RAC	+	-	Virulenta	
TgCTBr 04	Central Mineira	RAC	-	-	Virulenta	#5 (Único)
TgCTBr 17	Zona da Mata	RAC	NR	-	Virulenta	
TgCTBr 07	Triângulo Mineiro / Ato do Paranaíba	RAC	+	-	Virulência intermediária	#6 (Único)
TgCTBr 10	Vale do Rio Doce	RA	NR	-	Avirulenta	#7 (Único)
TgCTBr 12	Metropolitana de Belo Horizonte	RAC	NR	+	Virulência intermediária	#8 (Único)

TgCTBr 13	Sul/ Sudoeste de Minas	SL	NR	-	Virulenta	#9 (Único)
TgCTBr 18	Vale do Jequitinhonha	SL	NR	-	Virulência intermediária	#10 (Único)
TgCTBr 21	Metropolitana de Belo Horizonte	RAC	-	+	Virulência intermediária	# 11 (Único)
TgCTBr 22	Vale do Jequitinhonha	RAC	+	-	Virulência intermediária	# 12 (Único)
TgCTBr 24	Oeste de Minas	RC	-	-	Virulência intermediária	# 13 (Único)
TgCTBr 26	Sul/ Sudoeste de Minas	RAC	NR	-	Virulência intermediária	# 14 (Único)
TgCTBr 19	Metropolitana de Belo Horizonte	SL	NR	-	Virulência intermediária	Mista

Os genótipos que apresentaram apenas um isolado em cada (#6 - #16) são originários de seis mesorregiões do Estado (Triângulo Mineiro/ Alto do Paranaíba: TgCTBr07; Sul/ Sudoeste de Minas: TgCTBr13 e TgCTBr26; Vale do Jequitinhonha: TgCTBr18 e TgCTBr22; Metropolitana de Belo Horizonte: TgCTBr12 e TgCTBr21; Vale do Rio Doce: TgCTBr10; Oeste de Minas: TgCTBr24). Todos esses genótipos únicos estavam associados ou à isolados virulentos ou de virulência intermediária.

Através de uma análise descritiva, não foi observada nenhuma associação entre o genótipo dos isolados e a forma clínica da doença (Tabela 17). A associação dos genótipos dos isolados com a presença de retinocoroidite nos recém nascidos de onde o *T. gondii* foi obtido demonstra uma grande variação genotípica dos parasitos. O genótipo #1 (BrII) foi identificado em isolados de pacientes que não apresentavam lesões oculares bem como nos que apresentavam retinocoroidite ativa e/ ou cicatrizada.

Os genótipos encontrados nos pacientes sem lesão foram #1, #2, #3, #9 e #10. Nos recém nascidos que apresentavam retinocoroidite ativa observou-se dois genótipos #1 e #7, já quando os isolados eram provenientes de pacientes com lesão cicatrizada, quatro genótipos foram identificados (#1, #3, #4 e #13) (Tabela 17).

Através da análise genotípica dos isolados de recém nascidos diagnosticados com lesões ativas e cicatrizadas simultaneamente, observou-se o maior

número de genótipos envolvidos. Os dez genótipos encontrados foram #1, #3, #4, #5, #6, #8, #11, #12, #14.

A relação filogenética dos 24 isolados de *T. gondii* provenientes de recém nascidos (excluindo o isolado TgCTBr19 por ser proveniente de infecção mista) foi analisada utilizando o software SplitsTree4 (Huson, 1998; Huson & Bryant, 2006). O resultado mostra mais uma vez a alta diversidade genética do *T. gondii* no Brasil em casos congênitos humanos (Figura 7). A mesma diversidade é observada ao se comparar os isolados obtido de recém nascidos com os isolados associados a diferentes hospedeiros como gatos, cães, suínos, caprinos, ovinos e galinhas de diferentes regiões do território brasileiro descritos por outros pesquisadores (Figura 8).

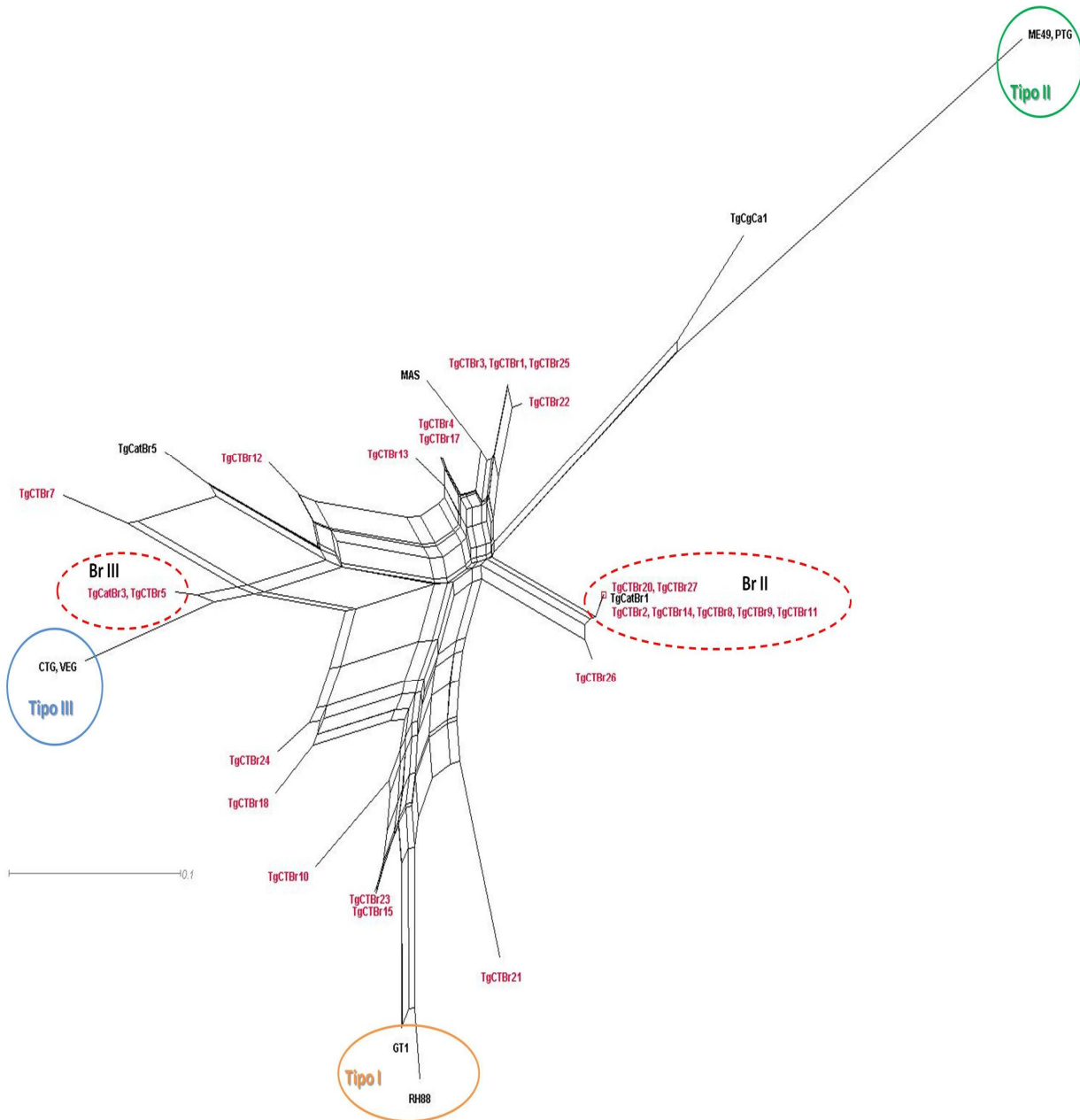


Figura 7: Análise filogenética dos isolados de *T. gondii* em sangue de recém nascidos de MG, com base em 11 marcadores genéticos. Isolados obtidos neste estudo em destaque em vermelho.

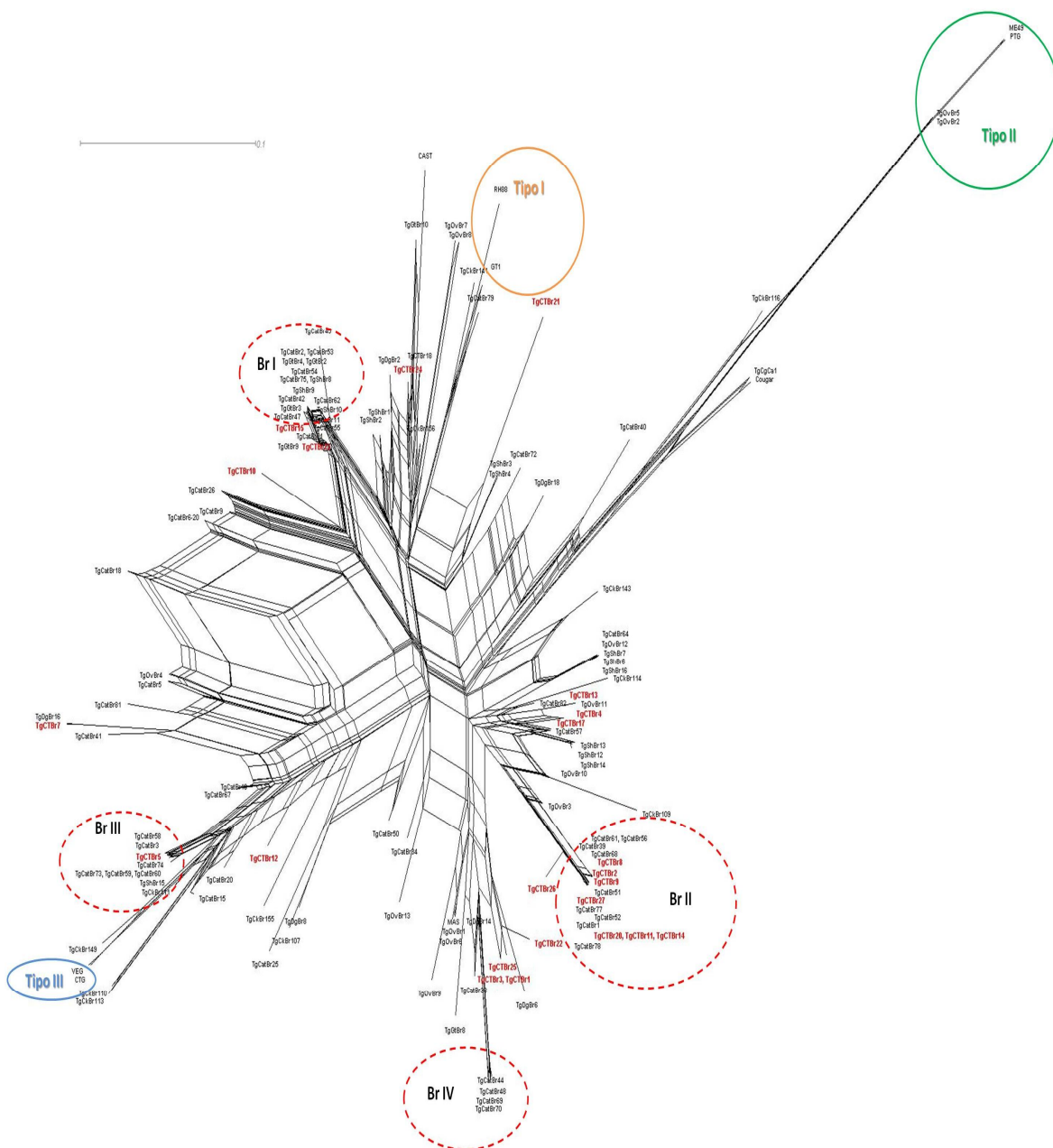


Figura 8: Análise filogenética dos isolados de *T. gondii* obtidos no presente estudo, juntamente com os descritos por Dubey et al (2007), Pena et al (2008), Dubey et al (2008), Silva et al (2011) e Frazão-Teixeira et al (2011). Isolados obtidos neste estudo em destaque em vermelho.

6. DISCUSSÃO

6.1. DIAGNÓSTICO MOLECULAR DO TOXOPLASMA GONDII (NESTED PCR DO GENE B1) EM SANGUE DE RECÉM NASCIDOS

Embora o diagnóstico laboratorial convencional da toxoplasmose ainda se baseie em parâmetros sorológicos como a presença de IgM, IgA e IgG anti-*T. gondii* e isolamento do parasito em camundongos ou cultura celular, a reação em cadeia de polimerase (PCR) tem sido realizada desde a década de 90 com o objetivo de melhorar a sensibilidade do diagnóstico, além de torná-lo mais rápido e menos laborioso (Okay et al. 2009; Alfonso et al. 2009; Abdul-Ghani 2011).

A confirmação da fase aguda da toxoplasmose é de extrema importância para a definição do tipo de tratamento que o paciente receberá. Porém, apesar do uso freqüente de testes imunológicos para esta finalidade, a confirmação sorológica está longe de ser conclusiva. Em hospedeiros imunocompetentes com toxoplasmose, a resposta de anticorpos IgM anti- *T. gondii* pode persistir por vários anos (Bobic et al. 1991). Além disso, observa-se em alguns recém nascidos e indivíduos imunossuprimidos, ausência da produção dessa imunoglobulina graças à imaturidade do sistema imune e queda da produção de células CD4+, respectivamente (Guy & Joynson 1995; Kompalic-Cristo et al. 2007). A sorologia positiva em casos de imunossupressão ou de imaturidade imunológica (casos congênitos) se torna apenas um indicativo da infecção (Spalding et al. 2002).

Atualmente, um dos métodos convencionais mais utilizados para a confirmação da toxoplasmose congênita é a pesquisa continuada de anticorpos IgG anti-*T. gondii* até 12 meses de vida (Pinon et al. 2001; Kompalic-Cristo et al, 2004; Kompalic-Cristo et al, 2007; Andrade et al. 2008; Vasconcelos-Santos et al. 2009; Machado et al. 2010). Entretanto, alguns autores relatam que algumas crianças tratadas continuamente com sulfadiazina e pirimetamina podem ter a síntese desses anticorpos suprimida temporariamente possibilitando assim possíveis resultados falso-negativos (Carvalho et al. 2005; Petersen 2007).

A detecção direta do *T. gondii* no sangue ou em outras amostras clínicas confirmam a presença do parasito que conduz ao diagnóstico conclusivo da toxoplasmose. A PCR realizada em fluidos corporais como sangue e líquido amniótico representa uma alternativa pouco invasiva de diagnóstico da infecção (Kompalic-Cristo et al. 2007; Wahab et al. 2010). A possibilidade de se detectar o *T. gondii* em sangue humano através do diagnóstico molecular já foi descrita por Ho-Yen et al. (1992).

No presente estudo a presença do *T. gondii* no sangue periférico dos recém nascidos foi confirmada pela amplificação por *nested* PCR do gene repetitivo e conservado B1 (PCR - B1). A positividade encontrada através do diagnóstico molecular nas crianças foi de 29,1% sendo esse valor inferior aos 81% (178/220) considerados positivos pela persistência de IgG ant-*T. gondii* após o 12º mês de vida. A PCR-B1 teve uma boa reprodutibilidade (79,1%) em 10% das amostras testadas em duplicata, embora tenha apresentado fraca concordância com os resultados sorológicos ($Kappa=0,06$).

A técnica molecular utilizada demonstrou ser parcialmente específica (80,95%) e pouco sensível (31,46%). Cento e vinte e dois recém nascidos com persistência de IgG após um ano de vida tiveram resultado negativo pela *nested*-PCR. Outros pesquisadores também têm identificado resultados falso-negativos e apresentam prováveis explicações para os resultados discordantes. De acordo com Castro et al (2001) a sensibilidade da técnica em amostras clínicas pode ser influenciada pela grande quantidade de células e de DNA humano que podem interferir na reação. Os mesmos autores chamam a atenção para as porfirinas presentes em amostras que contenham sangue, como fator inibitório da *Taq* polimerase.

Diversos autores demonstram alta sensibilidade e especificidade para marcadores que amplificam diferentes regiões do gene B1 em diversos tipos de amostras clínicas (Khalifa et al. 1994; Jones et al. 2000; Chabbert et al. 2004; Colombo et al. 2005; Alfonso et al. 2009; Mesquita et al. 2010; Wahab et al. 2010).

Outros trabalhos associam a especificidade, sensibilidade e exatidão do diagnóstico ao tamanho e à condição das amostras biológicas estudadas. A quantidade de amostra analisada pode influenciar o resultado do diagnóstico molecular. Quanto menor a amostra, menor a carga parasitária. Segundo Montoya et al. (2009), uma possível explicação para o baixo número de resultados positivos pela *nested* PCR seria o pequeno volume da amostra analisada. No presente estudo, a extração de DNA foi realizada em aproximadamente 300 µl de sangue periférico de cada recém nascido,

conforme sugerido no kit *Wizard* (PROMEGA). Esta amostra pode não ter sido suficiente para conter a quantidade mínima de taquizoítos detectável devido ao baixo número ou ausência de parasitos circulantes nessas crianças.

O modo de extração do DNA também pode interferir na sensibilidade da reação (Alfonso et al. 2009). No presente estudo, a extração de DNA aconteceu em amostras de sangue, preservadas por congelamento, sendo que essa condição pode ter alterado a sensibilidade da técnica utilizada. Segundo Colombo et al. (2005) e Mesquita et al. (2010), para melhorar a sensibilidade da PCR, as amostras de sangue devem ser processadas rapidamente (até 48 horas do momento da coleta) com o objetivo de prevenir a inibição da *Taq* polimerase.

Além da presença de inibidores da *Taq* polimerase, outros autores sugerem que os resultados falso-negativos podem ser explicados pela fase da coleta da amostra, início do tratamento antes da coleta e a curta parasitemia (Spalding et al. 2002). Em relação aos nossos resultados, as amostras clínicas utilizadas foram coletadas antes do tratamento das crianças, descartando, portanto a possibilidade de eliminação de possíveis parasitos presentes no sangue dos bebês por esse motivo. Mesquita et al. (2010) sugerem que algumas amostras clínicas podem apresentar baixos níveis de parasitos e estar associadas a resultados falso-negativos. Além disso, segundo Ho-Yen et al. (1992), a infecção por *T. gondii* em indivíduos imunocompetentes pode originar uma parasitemia transitória.

A possibilidade dos iniciadores utilizados não terem capacidade de amplificar o gene B1 contido na amostra foi levantada por Castro et al. (2001). Entretanto as sequências-alvo utilizadas neste estudo se baseiam nos resultados de Burg et al. (1989) que demonstram alta sensibilidade da técnica sendo que a amplificação do gene B1 permite identificar 1 parasito na presença de 100000 leucócitos humanos.

Outra hipótese possível para explicar os resultados falso-negativos seria a ausência do gene B1 nos isolados de *T. gondii* avaliados (Castro et al. 2001). Porém, mais uma vez, Burg et al. (1989) mostram alta especificidade do gene B1 do *T. gondii* sendo uma região conservada em todas as cepas testadas por esses autores.

O resultado positivo da PCR pode ser um importante indicador da toxoplasmose aguda, entretanto o resultado negativo, como os do presente estudo, não exclui a infecção recente. Nossos resultados corroboram com aqueles encontrados por Guy & Johnson (1995) e Romand et al. (2001) que também concluem que a PCR negativa não pode ser utilizada para descartar a infecção congênita

Das 42 crianças comprovadamente negativas pela ausência de IgG anti-*T. gondii* após o primeiro ano de vida, oito apresentaram PCR positiva (especificidade de 80,95%). Corroborando com nossos resultados, estudos anteriores demonstram que a amplificação do gene B1 pode gerar resultados falsos positivos (Kompalic-Cristo et al, 2004). Essa alta frequência de

resultados falso-positivos reflete a moderada taxa de especificidade encontrada na técnica sendo que já foi demonstrado que a amplificação do gene B1 utilizando os iniciadores propostos por Burg et al. (1989) podem co-amplificar seqüências humanas (Kompalic-Cristo et al. 2004). Esses autores demonstraram que seqüências humanas dos cromossomos 2 e 10 podem ser co-amplificadas durante a PCR e que a homologia do gene B1 com esses cromossomos humanos variam de 88% a 89%, respectivamente.

Em um trabalho mais recente, o mesmo grupo (Kompalic-Cristo et al. 2007) através da *real-time* PCR encontraram novamente resultados positivos em indivíduos considerados negativos pela sorologia tradicional. Os autores dessa vez levantam a possibilidade da presença de taquizoítos circulantes sem a presença de anticorpos. Isso poderia ocorrer em indivíduos imunossuprimidos ou em casos de infecções recentes sendo que através da sorologia a produção de imunoglobulinas não chega a ser detectada. As oito crianças deste estudo diagnosticadas como negativas pela ausência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* após 12 meses de vida e positivas pela PCR-B1 podem apresentar comportamento semelhante aos pacientes estudados por Kompalic-Cristo et al. (2007), apresentando taquizoítos circulantes sem serem capaz de produzir anticorpos. Outros autores (Carvalho et al. 2005; Petersen 2007) sugerem uma possível falha do teste referência usado no presente estudo (persistência de IgG). Esses estudos demonstram que algumas crianças consideradas soronegativas aos 12 meses de idade tiveram um aumento brusco nos títulos de IgG anti-*T. gondii* após o término do tratamento. Um fato importante

observado nas amostras foi a presença de déficit auditivo em três dessas oito crianças consideradas negativas pela sorologia e positivas pela PCR.

Outra hipótese que explicaria a elevada taxa de falso-positivos seria a contaminação da reação em alguma etapa do processo. Alguns autores ressaltam o alto grau de contaminação da técnica de *nested* PCR (Castro et al. 2001; Kompalic-Cristo et al. 2007). Porém, no presente estudo, medidas para evitar a contaminação entre amostras foram utilizadas em todas as fases dos experimentos como a utilização de ambientes diferentes para a extração de DNA, preparação de reagentes, amplificação e análise das amostras.

Em contrapartida, outros estudos como o de Mesquita et al. (2010) não demonstram a presença de nenhum resultado falso-positivo, mostrando alta especificidade nas reações realizadas com diferentes marcadores para o gene B1 (B22-B23 e Tg1-Tg2) e para um fragmento de 200-300 repetições (Tox4-Tox5). É válido ressaltar que o gene alvo utilizado por Mesquita et al. (2010) é o mesmo utilizado em nosso estudo (B1), porém as seqüências dos iniciadores não são semelhantes. Segundo Kompalic-Cristo et al. (2005), a sensibilidade e a especificidade da PCR depende não só da seqüência-alvo no DNA do *T. gondii*, mas também dos pares de iniciadores de amplificação.

De modo contrário aos resultados encontrados no presente estudo, vários autores (Burg et al. 1989; Guy & Joynson 1995; Fuentes et al. 1996; Jones et al. 2000; Okay et al. 2009; Abdul-Ghani. 2011) afirmam que a detecção do *T. gondii* através da amplificação do gene B1 é um método promissor para o

diagnóstico da toxoplasmose congênita sendo considerada uma técnica específica e sensível. Nossos resultados de baixa sensibilidade e especificidade indicam que novas seqüências alvo e técnicas precisam ser estudadas.

O diagnóstico molecular da toxoplasmose em sangue utiliza técnicas que se baseiam na parasitemia do hospedeiro, sendo esta pouco conhecida no caso da toxoplasmose humana (Kompalic-Cristo et al. 2005). O resultado positivo no diagnóstico molecular pode estar associado apenas com a presença do DNA do *T. gondii* e não necessariamente com a presença do parasito viável. Portanto o resultado positivo indica apenas uma parasitemia aparente.

O benefício da detecção molecular de *T. gondii* não está tão estabelecido como nos casos de outras protozooses como leishmaniose visceral e Doença de Chagas onde se consegue 100% de sensibilidade usando amostras de sangue periférico (Kompalic-Cristo et al. 2004). Sabe-se que na leishmaniose visceral, por exemplo, a persistência do DNA do parasito no sangue depois do tratamento não necessariamente confirma a presença de parasitos viáveis na circulação sanguínea. No caso da toxoplasmose, por ausência de dados nesse sentido, a detecção de DNA do *T. gondii* em sangue periférico justifica a continuidade do tratamento e acompanhamento por PCR (Menotti et al. 2009). A importância de um diagnóstico com alta especificidade deve ser enfatizada, pois pode-se evitar tratamentos potencialmente tóxicos sem necessidade (Romand et al. 2001).

De acordo com os resultados encontrados neste estudo utilizando a *nested* PCR do gene B1 em recém nascidos, podemos concluir que esta técnica não é a ideal para a realização do diagnóstico molecular da toxoplasmose congênita usando sangue periférico congelado. Perspectivas futuras se abrem no sentido de se testar, utilizando as mesmas amostras, novos alvos mais específicos e sensíveis como, por exemplo, o AF146527. Além disso, o aperfeiçoamento de diferentes técnicas como a *real time* PCR que é uma metodologia rápida, sensível e quantitativa de detecção do *T. gondii*, deve ser realizado para a obtenção de um método de diagnóstico molecular seguro e eficiente para a toxoplasmose congênita. O diagnóstico molecular da toxoplasmose em sangue periférico de recém-nascidos necessita, portanto de estudos adicionais na tentativa de diminuir seus resultados discordantes e melhorar a sua eficácia.

Quando foram realizadas as associações dos resultados do diagnóstico molecular com os aspectos clínicos da toxoplasmose congênita (presença de retinocoroidite, calcificações cerebrais e déficit auditivo) não foi observado nenhum tipo de relação estatisticamente significativa. Uma possível explicação para essa ausência de associações seriam os baixos valores de sensibilidade e especificidade encontrados. O grande número de resultados falso-positivos ou falso-negativos pode ter sido um importante viés nas análises de associações.

6.2. ISOLAMENTO DO *T. GONDII* EM SANGUE PERIFÉRICO

Foi observada uma positividade de aproximadamente 15% nos experimentos de bioensaio. Esses resultados evidenciam a existência de taquizoítos viáveis na circulação sanguínea desses bebês infectados pela via transplacentária, mesmo após um período aproximado de dois meses de vida.

Sabe-se que a fase aguda da toxoplasmose se caracteriza pela presença de taquizoítos circulantes em sangue e linfa. Esse período de parasitemia normalmente possui curta duração e cessa com o desenvolvimento da resposta imune do hospedeiro (Tenter et al. 2000) configurando o início da fase crônica com a presença dos bradizoítos no interior de cistos teciduais. Os fetos e os recém nascidos possuem um sistema imune imaturo, permitindo provavelmente que a parasitemia se prolongue por um período de tempo maior.

Menotti et al. (2009) sugerem que a presença prolongada de *T. gondii* no sangue dos pacientes pode estar relacionada com a forma disseminada da infecção com picos de parasitemia. Já Kompalic-Cristo et al. (2007) chamam a atenção para o fato de que a parasitemia na fase crônica pode ser mais prevalente do que se imagina. De acordo com os resultados encontrados por esses autores, pacientes em fase crônica podem apresentar resultado positivo no bioensaio, pois sabe-se que esses pacientes podem apresentar parasitemia intermitente com baixa carga parasitária.

Outro resultado interessante encontrado foi o fato de que, em 26 dos 27 isolados, apenas um dos dois camundongos utilizados para o bioensaio se

infectou. Esse dado pode ser explicado pela baixa parasitemia e o pequeno volume de sangue amostrado (0,5 ml) o qual poderia conter poucos taquizoítos viáveis.

As 27 crianças dos quais o *T. gondii* foi isolado apresentaram persistência de IgG anti-*T. gondii* após 12 meses de vida sendo o resultado positivo do bioensaio concordante com a sorologia. Em relação ao diagnóstico molecular, a concordância com o isolamento em camundongos foi considerada fraca ($Kappa = 0,03$). Dos 27 recém nascidos dos quais foram obtidos isolados, apenas 9 apresentaram resultado positivo pela PCR. Estes resultados demonstram mais uma vez a baixa sensibilidade da *nested*-PCR do gene B1 em sangue periférico como diagnóstico da toxoplasmose congênita.

Romand et al. (2001) realizando a PCR em líquido amniótico para o diagnóstico pré-natal da toxoplasmose também encontraram falhas na sensibilidade da reação molecular sendo que amostras que obtiveram resultados positivos no bioensaio, apresentaram resultados negativos pela PCR. Os autores recomendam a inoculação de líquido amniótico em camundongos como teste de rotina para detectar possíveis casos de falso-negativos pela PCR.

Quando se compara as taxas de sensibilidade das técnicas utilizadas, nossos resultados demonstram que a PCR em amostras de sangue (31,46%) é mais sensível que a inoculação em camundongos (15,17%). A maior sensibilidade da PCR comparada com o bioensaio pode ser explicada pela viabilidade do parasito fora do hospedeiro que pode ser alterada diminuindo a taxa de

transmissão ou a carga parasitária (Foulon et al. 1999). Outra hipótese seria a possível presença de fatores inibitórios que poderiam ser inoculados nos animais juntamente com as células sanguíneas (Spalding et al. 2002). Além disso, é válido chamar a atenção que nem toda detecção de DNA do parasito pode ser proveniente de formas viáveis capazes de proliferar em camundongos (Spalding et al. 2002). A PCR é capaz de detectar o DNA do parasito enquanto o bioensaio só detecta parasitos viáveis (Montoya et al. 2009).

Vários trabalhos corroboram com nossos resultados demonstrando baixa detecção do *T. gondii* em bioensaio quando comparado com a *nested* PCR. Segundo Burg et al. (1989) o diagnóstico através da amplificação de B1 é mais sensível que a bioprova. Spalding et al. (2002) demonstram que a PCR de amostras de sangue também é mais sensível que a inoculação em camundongos. Kompalic-Cristo et al. (2007) concluem que a pesquisa de parasitos em amostras clínicas pela *nested*- PCR supera os resultados do bioensaio. Foulon et al. (1999) encontraram alta sensibilidade da PCR em líquido amniótico (81%), comparado com 58% e 15% para o bioensaio e cultura celular respectivamente. A técnica molecular demonstrou também uma alta especificidade (96%). Hohlfeld et al. (1994) realizando o diagnóstico pré-natal da toxoplasmose congênita através da PCR em líquido amniótico não encontraram nenhum resultado falso-positivo e apenas um falso negativo. Os autores concluem que a PCR (sensibilidade 97,4%) é a melhor opção quando comparada com os métodos parasitológicos convencionais (sensibilidade 89,5%).

Antsaklis et al. (2002), também através da PCR do líquido amniótico, encontraram sensibilidade (83%) e especificidade (100%) mais altas quando comparadas com as taxas do bioensaio (61% e 92% respectivamente). Esse dados corroboram com os resultados de Bessieres et al. (2009) onde mais uma vez se observa sensibilidade e especificidade da técnica molecular maior do que a de inoculação em camundongos. Em outro estudo realizado na Noruega por Jenum et al. (1998), encontrou-se a mesma taxa de sensibilidade tanto para o bioensaio quanto para a PCR-B1. Os autores discutem a vantagem de se optar pela PCR para a detecção do *T. gondii* em infecções fetais durante a gravidez por ser um método mais rápido além de ser capaz de detectar parasitos não viáveis.

Quando se combina os resultados do isolamento com os resultados da PCR, a sensibilidade de detecção do parasito aumenta (41,57%). Esses resultados corroboram com os encontrados por Foulon et al. (1999), Antsaklis et al. (2002) e Montoya et al. (2009), que também observaram o aumento da sensibilidade do diagnóstico com uso simultâneo de bioensaio e nested PCR. Apesar do aumento da sensibilidade, a associação dos resultados levou a queda da especificidade.

Os 27 isolados foram obtidos de crianças provenientes de diferentes mesorregiões de Minas Gerais. Das 12 mesorregiões do Estado, apenas em duas (Vale do Mucuri e Campo das Vertentes) não foi isolado o *T. gondii* de sangue periférico dos recém nascidos. Esse resultado demonstra que este protozoário está amplamente distribuído em todo o estado de Minas Gerais.

Observou-se aproximadamente três isolados por mesorregião, sendo que esse número variou de apenas um isolado na Central Mineira a quatro isolados na região Metropolitana de Belo Horizonte.

No presente estudo não foi verificada associação entre a taxa de prevalência da toxoplasmose congênita nos recém nascidos do estado de Minas Gerais com a obtenção dos isolados do parasito. Segundo a triagem neonatal, a região metropolitana de Belo Horizonte apresentou a menor prevalência da infecção (1 recém nascido infectado para cada 1286 nascidos vivos) apesar de ser a localidade que mais se obteve isolados neste estudo. Por outro lado, foi constatado que apesar da região do Vale do Mucuri apresentar alta prevalência da toxoplasmose congênita (1 recém nascido infectado para cada 494 nascidos vivos), esta foi uma das duas mesorregiões do estado de Minas Gerais onde não se obteve isolados de *T. gondii*.

O bioensaio positivo revela a parasitemia nos recém nascidos. Sabe-se que a imaturidade fetal pode promover um maior desenvolvimento e disseminação do *T. gondii*, induzindo assim mais lesões no feto infectado durante a gravidez (McLeod & Dowel 2000). Apesar da presença de parasitemia sugerir um aumento no risco de lesões nos hospedeiros, não foi observada associação entre parasitemia (bioensaio positivo) e sinais clínicos da toxoplasmose congênita

Dos 27 isolados, 20 foram obtidos de crianças que apresentaram algum tipo de lesão oftalmológica associada à toxoplasmose congênita. Resultados

semelhantes foram encontrados em relação à presença de calcificações cerebrais. Levando em consideração os 25 isolados obtidos dos recém nascidos que passaram por avaliação neurológica, apenas 1 foi originado de criança que não apresentava calcificação cerebral. Apesar desses resultados sugestivos, não foi encontrada associação estatisticamente significativa. A obtenção de isolados do *T. gondii* em crianças com alteração ocular, neurológica e/ ou auditiva seguiu a distribuição esperada em relação ao total de crianças com toxoplasmose congênita.

6.3. VIRULÊNCIA DOS ISOLADOS

Apesar do *T. gondii* ser reconhecido como a única espécie do gênero, existe uma grande variação de virulência entre os diferentes isolados deste parasito (Guo & Johnson 1995; How & Sibley 1995).

A virulência de isolados de *T. gondii* para camundongos depende de vários fatores, incluindo o estágio do parasito utilizado para a infecção, rota de infecção, a dose inoculada, a via de inoculação, a linhagem do camundongo e características intrínsecas do isolado (Dubey et al. 2002). Existem dois critérios para a determinação de virulência dos isolados descritos na literatura. Um dos critérios avalia a virulência do *T. gondii* em camundongos BALB/c baseando-se na porcentagem de mortalidade e do tempo decorrido até a morte dos animais infectados com inóculos graduais de taquizoítos, por um período de 30 dias (Ferreira et al. 2001). O segundo critério avalia a mortalidade de camundongos utilizados durante o próprio isolamento primário (Dubey et al. 2002). Diferentes critérios podem gerar diferentes resultados. Seria interessante, portanto uma

padronização nos experimentos de virulência para melhor análise dos resultados e comparações futuras. Para a definição da virulência no presente estudo, os isolados foram avaliados a partir de inoculação com doses graduais de taquizoítos em camundongos isogênicos BALB/c (Ferreira et al. 2001).

Os resultados obtidos demonstram que 38% dos isolados foram caracterizados como virulentos e 54% como possuindo virulência intermediária. Vale ressaltar que em vários isolados caracterizados como de virulência intermediária, a sobrevivência de camundongos só foi observada nos inóculos com baixas concentrações de parasitos. Como exemplo, podemos citar os isolados TgCTBr7, TgCTBr15, TgCTBr19, TgCTBr22 e TgCTBr26, para os quais foi observada a sobrevivência de camundongos apenas em infecções com um taquizoíto. É possível perceber também através do fenótipo de virulência em camundongos, a reduzida proporção de amostras avirulentas em nosso meio. Apenas dois isolados foram considerados avirulentos para camundongo.

Isolados de virulência intermediária são consideradas de transição entre os fenótipos virulentos e avirulentos (Literák et al. 1998). De acordo com os registros realizados por Guo et al. (1997), isolados de virulência intermediária ocasionalmente ocorrem na natureza. Entretanto, no presente trabalho, a maioria dos isolados obtidos foram classificados como de virulência intermediária para camundongos BALB/c.

Brandão et al. (2006) em um estudo de caracterização de isolados do *T. gondii* obtidos de animais domésticos do estado de Minas Gérias, encontraram

também maior prevalência de amostras com virulência intermediária. A virulência de isolados obtidos de humanos e animais nos estados de Minas Gerais e São Paulo também foi avaliada por Ferreira et al. (2001). Mais uma vez foi demonstrada a maior frequência de amostras virulentas e de virulência intermediária no estado de Minas Gerais.

Howe & Sibley (1995) demonstram em seus estudos que as cepas virulentas correspondem a menos que 10% das cepas encontradas na natureza, sendo que destas, 27% estão associadas a casos congênitos. Segundo Gilbert et, al. (2008) no Brasil ocorre o predomínio de cepas mais virulentas para camundongos quando comparadas com as européias, dados que corroboram com nossos resultados.

Apesar dos poucos estudos com isolados de *T. gondii* derivados de casos de toxoplasmose congênita, sabe-se que, de maneira geral, os isolados obtidos no Brasil são virulentos (Ferreira et. al. 2006). Os isolados EGS, RAR e SAF foram obtidos de casos humanos de toxoplasmose congênita e todos foram considerados virulentos matando 100% dos animais (Ferreira et al. 2001).

Manifestações clínicas e a gravidade da infecção são afetadas por interações entre o parasito e o hospedeiro. Estudos *in vitro* sugerem que as cepas mais virulentas têm maior taxa de crescimento, uma notável habilidade de cruzar barreiras epiteliais e penetrar nos tecidos dos hospedeiros e ainda modular a interleucina 12 de maneira mais eficiente que cepas avirulentas e com isso prejudicar a resposta imune protetora nas crianças (Gilbert et al. 2008). Sabe-

se ainda que cepas mais virulentas expressam mais ROP18 que cepas avirulentas (Khan et al. 2009). Estudos de mapeamento genético sugerem que o marcador CS3 presente no cromossomo *VIIa* do *T. gondii* está associado com a virulência em camundongos (Khan et al. 2005). Vários autores estão utilizando a amplificação desse marcador para estabelecer a virulência dos isolados (Pena et al. 2008; Ragozo et al. 2010) .

Pouco se sabe sobre a associação entre a virulência do *T. gondii* para camundongos em comparação com a virulência na espécie humana. Segundo Dubey & Beattie (1988) a virulência em camundongos não apresenta associação com doença em humanos.

Apesar de grande parte dos isolados serem classificados como virulentos ou de virulência intermediária, não foi observada associação entre sinais clínicos oftalmológicos, calcificações cerebrais e/ ou déficit auditivos com a virulência em camundongos. Uma possível explicação para essa ausência de associação seria a limitação analítica dos resultados devido ao pequeno número amostral de isolados avaliados.

As diferenças biológicas encontradas nos isolados obtidos de sangue de recém nascidos de Minas Gerais sugerem diversidade entre as cepas que circulam no estado como já foi relatado por Ferreira et al. (2001) e Brandão et al. (2006). Estudos futuros, associando a tipagem genética do marcador CS3 (a partir do DNA de *T. gondii* extraído do sangue dos recém nascidos infectados) e as manifestações clínicas observadas nas crianças poderão esclarecer a

importância deste marcador na determinação da virulência do parasito em seres humanos.

6.4. GENOTIPAGEM DO *T. GONDII*

O objetivo inicial deste trabalho foi identificar o DNA de *T. gondii* em amostras de sangue dos recém nascidos provenientes de Minas Gerais através da *nested* PCR do gene B1. De acordo com os resultados obtidos, as amostras positivas seriam selecionadas. A amplificação por PCR para 11 marcadores e genotipagem com enzima de restrição aconteceriam a partir dessas amostras clínicas originais sem o uso prévio de amostras oriundas de isolados em camundongos. Por outro lado, de forma inesperada, obtivemos um número elevado de isolados de *T. gondii* por bioensaio com sangue dos recém nascidos. Como foi demonstrado em nossos resultados, a *nested* PCR do gene B1 em sangue periférico de recém nascidos não se mostrou uma boa técnica de diagnóstico. Apesar de uma reprodutibilidade razoável (79,1%), os valores de especificidade e sensibilidade se mostraram baixos, contra-indicando sua utilização para o diagnóstico da toxoplasmose congênita. Por esse motivo, a caracterização molecular foi realizada a partir dos isolados obtidos pelo bioensaio.

De acordo com a literatura, grande parte dos estudos sobre caracterização molecular de cepas de *T. gondii* é realizada com DNA extraído de taquizoítos obtidos da cavidade peritoneal de camundongos, pela facilidade de manutenção do parasito nesses animais (Ferreira et al. 2006; Cavalcante et al. 2007; Velmurugan et al. 2008; Frazão-Teixeira et al. 2011). Entretanto, outros

estudos demonstram resultados satisfatórios de genotipagem do *T. gondii* diretamente de amostras clínicas como sangue, líquido amniótico, placenta, líquido cefalorraquidiano e humor vítreo (Fuentes et al. 2001; Vallochi et al. 2005; Khan et al. 2006; Ferreira et al. 2008; Boughattas et al. 2011).

No presente estudo, a genotipagem foi realizada em DNA extraído de taquizoítos de 25 isolados de *T. gondii* provenientes de sangue periférico de recém nascidos do estado de Minas Gérias. A análise da PCR-RFLP multilocus revelou 14 genótipos sugerindo alta diversidade do parasito isolado da população humana em Minas Gerais, semelhante ao relatado por outros pesquisadores (Pena et al. 2008; Dubey et al. 2008; Soares et al. 2011).

Doze dos 14 genótipos encontrados são descritos pela primeira vez na literatura sendo que destes, 9 apresentaram apenas um isolado. Apesar de já existirem vários genótipos identificados (Su et al. 2006; Pena et al. 2008; Dubey et al. 2008; Yai et al. 2009; Ragozo et al. 2010; Silva et al. 2011; Soares et al. 2011; Pena et al. 2011) a partir de uma variedade de hospedeiros em diferentes regiões do Brasil, esse resultado indica a possibilidade de identificação de novos genótipos em estudos futuros reafirmando a alta diversidade de cepas do *T. gondii* em nosso país (Dubey et al. 2008, Ragozo et al. 2010; Soares et al. 2011).

Embora a população de *T. gondii* seja altamente diversificada em nosso país, alguns genótipos clonais circulam nos hospedeiros. Quatro genótipos identificados como BrI, BrII, BrIII e BrIV, foram considerados clonais no Brasil

(Pena et al. 2008). No presente estudo, os tipos clonais BrII (#1) e BrIII (#2) apresentaram 7 e 1 isolados, respectivamente. Esses genótipos já foram identificados em diversos hospedeiros como em ovelhas, galinhas e gatos (Pena et al. 2008; Dubey et al. 2008; Ragozo et al. 2010) entretanto, este é o primeiro registro de identificação destes isolados em humanos.

Três novos genótipos, #3, #4 e #5, foram identificados em três, três e dois isolados, respectivamente. O aparecimento de isolados com mesmo genótipos sugere que estes possam ser linhagens de circulação comum em Minas Gerais.

Nenhum tipo clonal dos arquétipos I, II e III foi encontrado neste estudo. Esse resultado corrobora com outros estudos demonstrando que achados de isolados clonais são raros, principalmente os tipos I e II (Pena et al. 2008; Ragozo et al. 2010; Silva et al. 2011). O Tipo III já foi encontrado em galinhas no Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul (Dubey et al. 2008; Dubey et al. 2007b) e em cachorro (Dubey et al. 2007a) e capivaras (Yai et al. 2009) no estado de São Paulo. Já o tipo I foi observado em uma galinha do Rio Grande do Sul e também em capivaras de São Paulo (Dubey et al. 2007b; Yai et al. 2009). Recentemente, o tipo II foi encontrado pela primeira vez no Brasil em ovelhas, também do Estado de São Paulo (Silva et al. 2011).

No presente estudo, o isolado TgCTBr19 apresentou perfis mistos em quatro dos onze marcadores utilizados. Esta infecção mista pode ter ocorrido por infecções, sequenciais (reinfecções) ou simultâneas, com parasitos de

diferentes genótipos, adquiridas de oocistos diretamente do ambiente ou pela ingestão de cistos teciduais em carne de hospedeiros intermediários infectados com dois isolados distintos do parasito, possibilidades já descritas na literatura (Aspinall et al. 2003; Boughattas et al. 2010). Como os felinos apenas liberam oocistos nas fezes entre 1 e 3 semanas após a infecção (Tenter et al. 2000) e dados de epidemiologia sugerem que para um único animal, estes oocistos são de apenas um tipo genético (Grigg et al. 2001), a explicação mais provável seria então a ingestão de carne infectada com dois tipos genéticos distintos.

Um estudo realizado por Aspinall et al. (2003) mostra que cerca de 31% dos pacientes analisados na Espanha apresentam evidências de infecções mistas (I e II) principalmente associadas a casos congênitos. Os autores sugerem que alimentos que utilizam carne de mais de um tipo de animal, como salsichas e carnes processadas, têm grande possibilidade de apresentarem mais de um tipo genético de *T. gondii* oriundos de diferentes animais. A ingestão dessas carnes cruas ou mal cozidas podem então ter levado esta gestante a uma infecção mista. Essa hipótese é corroborada por resultados previamente encontrados pelo mesmo grupo (Aspinall et al. 2002) ao analisarem amostras provenientes de carnes suínas, ovinas e bovinas de vários mercados do País de Gales. Através da PCR-RFLP do SAG2 os autores classificaram cerca de 78% das amostras como tipo I e 22% com presença de infecções mistas (I e II.)

Um estudo recente realizado na Tunísia (Norte da África) demonstra a presença de infecções mistas em parasitos isolados de casos de toxoplasmose congênita. Os autores também sugerem a relação entre as carnes processadas

consumidas pelos habitantes com a presença de infecções mistas nessa região (Boughattas et al. 2010).

A alta diversidade encontrada em diferentes isolados brasileiros sugere que diversos genótipos de *T. gondii* devem estar amplamente difundidos e circulando simultaneamente. O encontro usual de genótipos mistos no Brasil corrobora essa hipótese (Dubey et al. 2008; Pena et al. 2008; Yai et al. 2009; Ragozo et al. 2010; Soares et al. 2011).

O fenótipo de virulência do *T. gondii* em camundongos está associado ao seu genótipo (Pena et al. 2008). Baseando-se em estudos realizados na América do Norte e Europa amostras do tipo I foram consideradas extremamente virulentas para camundongos enquanto amostras do tipo II e III foram classificadas como avirulentas para camundongos (Howe & Sibley 1995)

Sabe-se que isolados da América do Sul são geneticamente distintos dos isolados da América do Norte (Gallego et al. 2006). No Brasil, de maneira geral, os isolados são recombinantes e bastante virulentos (Ferreira et al. 2006; Pena et al. 2008; Dubey & Su. 2009). A associação entre o genótipo recombinante e um fenótipo de elevada virulência em modelos experimentais tem sido demonstrada pelos autores através da identificação de fatores de virulência com determinação genética (Pena et al. 2008; Sibley & Ajioka 2008; Khan et al. 2009).

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. Segundo esses autores a linhagem BrI seria a mais virulenta, a BrIII não virulenta e as demais (tipo BrII e BrIV) de virulência intermediária.

O isolado TgCTBr 05, único classificado como tipo BrIII, se mostrou avirulento para camundongos corroborando com os achados de Pena et al. (2008). Já os sete isolados identificados como BrII, mesmo apresentando o mesmo genótipo, demonstraram virulência variada. Apesar de Pena et al (2008) associarem o genótipo tipo BrII à isolados de virulência intermediária, dos sete isolados pertencentes a esse mesmo genótipo, apenas quatro (TgCTBr 2, TgCTBr 14, TgCTBr 20 e TgCTBr 27) demonstraram essa mesma associação. Os outros três (TgCTBr 8, TgCTBr 9, TgCTBr 11) foram classificados como virulentos para camundongos.

Quando se analisa o genótipo #4 do presente estudo, percebe-se novamente isolados de mesmo genótipo que apresentam virulências diferenciadas em camundongos. O isolado TgTCBr 23 foi classificado como virulento e o TgTCBr 15 como um isolado de virulência intermediária, apesar de ter sido observada a sobrevivência de camundongos apenas em infecções com um taquizoíto. Uma possível explicação para esses resultados seria os diferentes tipos de procedimentos e critérios utilizados em diversos estudos para a determinação da virulência em camundongos. Silva et al. (2011) também demonstraram resultados contrários aos observados por Pena et al. (2008) quanto à virulência

no *locus* CS3. De acordo com Soares et al. (2011), as diferenças biológicas entre isolados de um mesmo genótipo não devem ser negligenciadas. Segundo esses autores, o genótipo é o que realmente define a virulência, portanto outra explicação para os resultados encontrados seria que os marcadores utilizados neste estudo podem não ter sido capazes de identificar possíveis diferenças entre os isolados em questão.

Não foram observadas diferenças fenotípicas de virulência entre os isolados dos genótipos #3 e #5 sendo que todos foram considerados virulentos para os camundongos *BALB/c*.

Baseando-se nos resultados deste estudo, não foi possível associar os genótipos dos isolados de *T. gondii* encontrados no estado de Minas Gerais com a virulência em camundongos. Sabe-se que no Brasil, nenhuma evidência concreta existe de associação da virulência do *T. gondii* em camundongos e diferentes genótipos (Frazão-Teixeira et al. 2011).

A variabilidade genética entre os isolados de *T. gondii* provenientes de indivíduos com diferentes aspectos clínicos da infecção tem sido demonstrado. Alguns estudos conseguiram identificar a associação entre o genótipo do *T. gondii* e a manifestação da doença (Boothroyd & Grigg, 2002). Porém a maioria dos estudos de genotipagem realizados em isolados humanos se limita a poucos marcadores além da utilização de diferentes iniciadores, dificultando assim as comparações dos resultados na tentativa de se investigar a real associação entre o genótipo e a manifestação da doença. Associando o

genótipo do parasito e o hospedeiro, Howe & Sibley (1995) verificaram predominância de cepas tipo II na toxoplasmose humana na Europa e na América do Norte. Nessas regiões, as amostras do tipo I estavam associadas à toxoplasmose congênita enquanto as do tipo III estavam associadas à infecções em animais. Enquanto Howe et al. (1997) e Ajzenberg et al. (2002b) associaram isolados do tipo II à casos congênitos na França, Fuentes et al. (2001) encontraram na Espanha uma maior prevalência de amostras tipo I.

Gallego et al. (2006) realizaram genotipagem pelo *locus* SAG2 em amostras colombianas encontrando predominância do tipo I, inclusive nos casos congênitos, sendo este o primeiro estudo de tipagem de casos congênitos na América do Sul. Vale ressaltar que estudos genéticos baseados somente em um marcador como o SAG2 são limitados (Dardé 2004; Su et al. 2006). Mais recentemente, Boughattas et al. (2010) realizaram análise *multilocus* por RFLP em 6 marcadores (3'SAG2, 5'SAG2, SAG3, BTUB, GRA6 e APICO) em amostras de 14 casos congênitos na Tunísia (África do Norte). Os resultados indicam alta prevalência de cepas recombinantes associadas a casos de toxoplasmose congênita nesta região.

Ferreira et al. (2006) através de uma análise *multilocus* (SAG1, SAG2, SAG3, B1, cB21-4, cS10-A6, GRA6 and L363), demonstraram que os quatro isolados de casos de toxoplasmose congênita humana provenientes de Minas Gerais são recombinantes. Esses resultados corroboram com os encontrados no presente trabalho. Todos os isolados genotipados (excluindo o de infecção mista) provenientes de sangue periférico de recém nascidos do estado de

Minas Gerais foram considerados recombinantes. A presença de isolados recombinantes geralmente associados a fenótipo altamente virulento das cepas brasileiras pode refletir a maior frequência de formas mais graves da toxoplasmose congênita encontrada no Brasil.

Em relação a este estudo, a elevada prevalência (74,6%) de toxoplasmose ocular encontrada nos recém nascidos de Minas Gerais (Vasconcelos-Santos et al. 2009), poderia ser explicada pela composição genética das cepas de *T. gondii* circulantes no Brasil. Na França, os poucos isolados recombinantes encontrados são derivados de casos graves de toxoplasmose congênita (Ajzenberg et al. 2002b). Comparando as seqüelas oculares derivadas da transmissão congênita entre o Brasil e a Europa, Gilbert et al. (2008) ressaltam que as crianças brasileiras infectadas pela via vertical apresentam retinocoroidite mais frequentemente no primeiro ano de vida (50%) em comparação em as crianças européias (10%). Além disso, as diferenças com relação ao tamanho e multiplicidade das lesões oculares também são significativas.

Recentemente, Ferreira et al. (2010) investigaram as características genéticas do *T. gondii* presentes em 10 amostras clínicas (sangue) provenientes de pacientes com toxoplasmose ocular do estado de São Paulo. Todas as amostras foram consideradas polimórficas indicando uma elevada taxa de recombinação entre os arquétipos I, II e III. Os autores sugerem que tais características podem estar correlacionadas com a gravidade da doença observada em pacientes brasileiros. De acordo com resultados obtidos no

presente estudo não foi observada associação entre o genótipo e a apresentação clínica da toxoplasmose, seja ela ocular, auditiva ou neurológica. Esses resultados corroboram com diversos estudos como de Frazão-Teixeira et al. (2011) que relatam a ausência da associação das manifestações clínicas da infecção e genótipos de isolados de *T. gondii* em toda a América do Sul. Aspinall et al. (2003) também não verificaram nenhum tipo de associação entre os genótipos e as formas clínicas da toxoplasmose. Segundo Fuentes et al. (2001) o número de casos congênitos estudados não permitiu associação clara entre genótipo e sintomas observados. O mesmo fato deve ter ocorrido no presente estudo, pois o número de genótipos analisados foi restrito aos isolamentos.

Uma perspectiva do nosso grupo é aumentar o número de amostras analisadas através de um diagnóstico molecular mais específico e sensível. Desses modo a genotipagem seria realizada diretamente nas amostras clínicas (DNA extraído de sangue), aumentando assim o número de casos e conseqüentemente a chance de possíveis associações entre os resultados da genotipagem das amostras e aspectos clínicos da toxoplasmose encontradas nos recém nascidos avaliados.

Nenhuma associação aparente foi observada entre a variabilidade genética e a região geográfica de onde as cepas de *T. gondii* foram isoladas. Por exemplo, os isolados TgCTBr 1 e TgCTBr 3 apresentaram o mesmo genótipo, embora tenham sido isoladas de diferentes mesorregiões (Zona da Mata e Vale do Jequitinhonha, respectivamente). Outro exemplo seria o dos isolados TgCTBr

11, TgCTBr 12 e TgCTBr 21. Apesar de apresentarem genótipos distintos todos foram isolados da região Metropolitana de Belo Horizonte.

Outros estudos corroboram esses resultados. De acordo com Soares et al. (2011) não foi possível associar o padrão genotípico com a procedência da amostra. Alguns autores demonstram uma aparente associação entre o genótipo dos isolados e sua localização geográfica (Frazão-Teixeira et al. 2011). Outros apenas sugerem que regiões geográficas e diferentes hospedeiros contribuem para variações genotípicas (Grigg et al. 2001; Lehmann et al. 2006; Dubey & Su 2009). A comparação dos resultados de genotipagem de diferentes amostras de diversas localidades é difícil de ser realizada. Diversos protocolos e diferentes marcadores têm sido utilizados para a genotipagem por todo o mundo. Mais uma vez a padronização de um único protocolo de genotipagem, conforme proposto por Su et al. (2006) se mostra importante e fundamental para a realização de estudos que possam ser comparativos e mais elucidativos.

As redes filogenéticas apresentadas nas figuras 7 e 8 têm topologia semelhantes a de outras construídas com diferentes isolados de *T. gondii* (Pena et al. 2008; Dubey et al. 2008; Soares et al. 2011). A árvore filogenética (Figura 7) construída de acordo com a genotipagem dos isolados de *T. gondii* provenientes de sangue de recém nascidos é altamente reticulada sugerindo altas taxas de recombinação na população do parasito. Estes resultados corroboram com outros estudos que demonstram a alta frequência de cruzamentos genéticos no Brasil (Pena et al. 2008; Soares et al. 2011).

Ficam evidentes os agrupamentos de genótipos. A falta de isolados clonais dos tipos I, II e III também é claramente observada pela rede filogenética. A linhagem clonal tipo III está agrupada com o tipo BrIII. Embora vários genótipos identificados em Minas Gerais apresentem apenas um isolado, outros genótipos possuem múltiplos isolados como TgTCBr 2, TgTCBr 8, TgTCBr 9, TgTCBr 11, TgTCBr 14, TgTCBr 20, TgTCBr 27 sugerindo que isolados desse genótipo têm se expandido (Soares et al. 2011; Pena et al. 2008). O genótipo do isolado TgTCBr 26 difere em apenas um locus (SAG2 alt) do tipo BrII e a aproximação desses genótipos fica bem clara na árvore filogenética. Outras situações semelhantes ocorrem com os isolados com o genótipo #3 (TgTCBr 1, TgTCBr 3, TgTCBr 25) que estão no mesmo ramo do isolado TgTCBr 22 (que também difere destes por apenas pelo locus Apico), e entre os isolados do genótipo #5 (TgTCBr 4, TgTCBr 17) e o isolado TgTCBr 13 (diferem apenas pelo locus c22-8) que também estão agrupados.

As populações agrupadas e definidas na rede filogenética parecem diferenciadas entre si, o que sugere uma clonalidade da estrutura populacional do *T. gondii* em isolados de recém nascidos (Soares et al. 2011). Este isolamento populacional, como já foi discutido, não está relacionado ao isolamento geográfico entre os genótipos, pois as subpopulações são formadas por isolados provenientes de diferentes mesorregiões do estado. As diferenças de hospedeiros também não são relevantes.

Mesmo com alta diversidade genética observam-se agrupamentos de genótipos provenientes de diferentes espécies hospedeiras junto a isolados de

T. gondii obtidos de recém nascidos. Esse fato também reforça a evidência de clonalidade epidêmica na população de *T. gondii* no Brasil (Howe & Sibley 1995; Pena et al. 2008; Soares et al. 2011). A ocorrência dessa clonalidade epidêmica (Tibayrenc 1995) se dá pela rápida disseminação de determinadas configurações genotípicas por meio de reprodução assexuada do parasito em decorrência da transmissão entre hospedeiros através da ingestão de cistos teciduais. Apesar do *T. gondii* ser um organismo sexuado, que normalmente não possui estrutura populacional definida pelas recombinações ocorridas, este protozoário consegue se propagar por várias gerações apenas por reprodução assexuada, o que gera “períodos” de clonalidades freqüentes.

Compreender até onde a reprodução sexual e a expansão clonal do parasito alteram o perfil do *T. gondii* atual é o principal ponto para se entender a estrutura genética populacional global do parasito (Grigg & Sundar 2009). Durante muito tempo acreditou-se que o *T. gondii* apresentava uma estrutura populacional clonal com três linhagem predominantes (tipo I, II e III) (Howe & Sibley 1995). Estudos realizados com isolados de *T. gondii* de diversos hospedeiros do Brasil mostraram uma alta diversidade genética que difere dos isolados em países do hemisfério norte (Darde 2004; Ferreira et al. 2006). Essa alta frequência de genótipos recombinantes na América do Sul se caracteriza por novas e diferentes combinações dos alelos arquetípicos (I, II e III) em todos os locus estudados (Ferreira et al. 2006). Entretanto, segundo Frazão-Teixeira et al. (2011), os isolados brasileiros não devem ser classificados como recombinantes de cepas arquetípicas, como proposto anteriormente por Ferreira et al. (2006), e sim como atípicos por possuírem novas combinações

de alelos únicos além de alguns alelos arquetípicos. Já Pena et al. (2008) chamam a atenção para essa denominação de “isolados atípicos”. Segundo esses autores essa classificação pode ser errônea à medida que a população de *T. gondii* é única na América do Sul e os dados do RFLP não podem ser diretamente comparados com os da América do Norte e da Europa.

Marcadores *multilocus* para PCR-RFLP utilizados neste estudo podem subestimar a verdadeira diversidade da população parasita. Soares et al. (2011) sugerem que a análise *multilocus* por microsatélites é mais aconselhável que a PCR-RFLP. Esses autores sugerem que, mesmo isolados que apresentam genótipos idênticos pela PCR-RFLP, provavelmente apresentam diferenças genotípicas. Os marcadores de microsatélites são mais polimórficos, podendo mostrar a presença de alelos múltiplos.

Frazão-Teixeira et al. (2011) chamam a atenção para a importância de se realizar o sequenciamento do DNA de *T. gondii* em casos de estudos realizados em regiões com ampla diversidade genética do parasito, como acontece no Brasil. Segundo esses autores a PCR-RFLP pode ser falha para a realização da tipagem genética em locais com ampla diversidade. Para minimizar esse viés, o sequenciamento do DNA se torna uma boa opção para identificar os polimorfismos de DNA e inferir a real relação genética e estrutura populacional de cepas de *T. gondii* circulantes no Brasil (Pena et al. 2008). O sequenciamento de regiões críticas do genoma dos isolados de *T. gondii* aqui estudados será a próxima etapa realizada por nosso grupo com objetivo de

confirmar e comparar os dados gerados pela PCR-RFLP multilocus, bem como revelar a real diversidade entre os isolados.

Os resultados obtidos neste trabalho auxiliam o entendimento da estrutura populacional de *T. gondii* no Estado de Minas Gerais, além de demonstrar a importância da toxoplasmose congênita para a saúde pública nesta região. Este é o primeiro registro de genotipagem de isolados obtidos a partir de sangue de recém nascidos no Brasil e este estudo pode fornecer informações técnicas e científicas importantes para enriquecer as discussões e a compreensão sobre a epidemiologia da toxoplasmose congênita em nosso país.

7. CONCLUSÕES

- A PCR para o gene B1 do *T. gondii* é pouco sensível e específica no diagnóstico da toxoplasmose em sangue congelado de recém nascidos com toxoplasmose congênita.
- Não há associação entre resultados do diagnóstico molecular (PCR-B1) e sinais clínicos da toxoplasmose congênita.
- O bioensaio em camundongos evidencia parasitemia patente em pelo menos 15,2% de crianças com toxoplasmose congênita.
- Não há associação entre resultados de bioensaio e sinais clínicos da toxoplasmose congênita.
- Isolados de *T. gondii* obtidos de recém nascidos com toxoplasmose congênita podem apresentar baixa virulência, virulência intermediária ou alta virulência para camundongos.
- Não há associação entre a virulência dos isolados de *T. gondii* e sinais clínicos da toxoplasmose congênita.
- Não foram encontrados isolados de *T. gondii*, obtidos de crianças com toxoplasmose congênita no Estado de Minas Gerais, pertencentes aos tipos clonais clássicos: I, II e III.

- Os isolados de *T. gondii* obtidos de crianças com toxoplasmose congênita no Estado de Minas Gerais foram classificados em 14 genótipos diferentes.

- A obtenção de um isolado misto proveniente de um recém nascido sugere a presença de infecções mistas pelo *T. gondii* na população de Minas Gerais.

- O genótipo BrII predominou entre os genótipos observados.

- Não foi observada associação entre o genótipo dos isolados de *T. gondii* e a virulência do parasito em camundongos.

- Não foi observada associação entre o genótipo dos isolados de *T. gondii* e sinais clínicos da toxoplasmose congênita.

- As diferenças biológicas e genéticas de isolados de *T. gondii* obtidos de recém nascidos sugerem diversidade entre os parasitos que circulam no Estado de Minas Gerais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDUL-GHANI, R. Polymerase chain reaction in the diagnosis of congenital toxoplasmosis: more than two decades of development and evaluation. *Parasitol Res*, v. 108; p.505-512, 2011.
- ALFONSO, Y.; FRAGA, J.; JIMÉNEZ, N.; FONSECA, C.; DORTA-CONTRERAS, A.J.; COX, R.; CAPÓ, V.; BANDERA, F.; POMIER, O.; GINORIO, D. Detection of *Toxoplasma gondii* in cerebrospinal fluid from AIDS patients by nested PCR and rapid identification of type I allele at B1 gene by RFLP analysis. *Exp Parasitol*, v. 122; p. 203-207, 2009.
- AJZENBERG, D.; BAÑULS, A-L.; TIBAYRENC, M.; DARDÉ, M. L. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. *Int J Parasitol*, v. 32, p. 27-38, 2002a.
- AJZENBERG, D.; COGNÉ, N.; PARIS, L.; BESSIÈRES, M. H.; THULLIEZ, P.; FILISETTI, D.; PELLOUX, H.; MARTY, P.; DARDÉ, M. L. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis and correlation with clinical findings. *J Infect Dis*, v. 186; p. 684-689, 2002b.
- AJZENBERG, D.; BAÑULS, A.L.; SU, C.; DUMÈTRE, A.; DEMAR, M.; CARME, B.; DARDÉ, M.L. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.*, v.34, p.1185-1196, 2004.
- AJZENBERG, D.; DUMÈTRE, A.; DARDÉ, M.-L. Multiplex PCR for typing strains of *Toxoplasma gondii*. *J. Clin. Microbiol.*, v.43, p.1940-1943, 2005.
- AJZENBERG, D.; YERA, H.; MARTY, P.; PARIS, L.; DALLE, F.; MENOTTI, J.; AUBERT, D.; FRANCK, J.; BESSIÈRES, M.H.; QUINIO, D.; PELLOUX, H.; DELHAES, L.; DESBOIS, N.; THULLIEZ, P.; ROBERT-GANGNEUX, F.; KAUFFMANN-LACROIX, C.; PUJOL, S.; RABODONIRINA, M.; BOUGNOUX, M.E.; CUISENIER, B.; DUHAMEL, C.; DUONG, T.H.; FILISETTI, D.; FLORI, P.; GAY-ANDRIEU, F.; PRATLONG, F.; NEVEZ, G.; TOTET, A.; CARME, B.; BONNABAU, H.; DARDÉ, M.L.; VILLENA, I. Genotype of 88 *Toxoplasma gondii* Isolates Associated with Toxoplasmosis in Immunocompromised Patients and Correlation with Clinical Findings. *J Infect Dis* v. 199; p. 1155-1167, 2009.
- ASPINALL, T.V.; MARLEE, D.; HYDE, J.E.; SIMS, P. F. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in commercial meat products as monitored by polymerase chain reaction-food for thought?. *Int J Parasitol*, v. 32, p. 1193-1199, 2002.
- ASPINALL, T. V.; GUY, E. C.; ROBERTS, K. E.; JOYNSON, D. H. M. HYDE, J. E.; SIMS, P. F. G. Molecular evidence for multiple *Toxoplasma gondii*

- infections in individual patients in England and Wales, public health implications. *Int J Parasitol*, v. 33, p. 97-103, 2003.
- ALIBERTI, J. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. *Nature*, v. 5. p. 162-170, 2005.
- AMATO NV, MARCHI CR. Toxoplasmose. In: Cimerman B & Cimerman S, ed. *Parasitologia Humana e seus Fundamentos Gerais*. 2. ed. p.160-177, 2002.
- ANTSACLIS A, DASKALAKIS G, PAPANTONIOU N, MENTIS A, MICHALAS S. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Prenat Diagn*. v. 22, p. 1107-1111, 2002.
- ANDRADE, G. M. Q.; RESENDE, L. M.; GOULART, E. M. A.; SIQUEIRA, A. L.; VITOR, R. W. A.; JANUÁRIO, J. N. Deficiência auditiva na toxoplasmose congênita detectada pela triagem neonatal. *Rev Bras Otorrinolaringol*,v. 74, p. 21-28, 2008.
- BASTIEN, P. Molecular diagnosis of toxoplasmosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, .v. 141; p. 205-215, 2002.
- BESSIERES, M. H.; BERREBI, A.; CASSAING, S.; FILLAUX, F.; CAMBUS, J. P.; BERRY, A.; ASSOULINE, C.; AYOUBI, J. M.; MAGNAVAL, J. F. Diagnosis of congenital toxoplasmosis: prenatal and neonatal evaluation of methods used in Toulouse University Hospital and incidence of congenital toxoplasmosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 389-392, 2009.
- BENARD, A; PETERSEN, E; SALAMON, R; CHÊNE, G; GILBERT, Ruth; SALMI, LR. Survey os European Programmes for the epidemiological surveillance of congenital toxoplasmosis. *Eurosurveillance*., v.13, p.1-7, 2008.
- BHOPALE, G. M. Pathogenesis of toxoplasmosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, v.26, p.213-222, 2003.
- BOBIC B., SIBALIC D., DJURKOVIC-DJAKOVIC O. High levels of IgM antibodies specific for *Toxoplasma gondii* in pregnancy 12 years after primary *Toxoplasma* infection. *Gynecol Obstet Invest*,v. 31; p. 182-184, 1991.
- BOOTHROYD, J. C.; GRIGG, M. E. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection, do different strains cause different disease? *Curr Op Microbiol*, v. 5, p. 438-442, 2002.
- BOUGHATTAS, S.; BEN-ABDALLAH, R.Y.M.; SIALA, E.; SOUISSI, O.; AOUN, K.; BOURATBINE. Direct genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with congenital toxoplasmosis in Tunisia (North Africa). *Am J Trop Med Hyg*, v.82; p.1041-1046, 2010.

- BRANDÃO, G.P.; FERREIRA, A.M.; MELO, M.N.; VITOR, R.W.A. Characterization of *Toxoplasma gondii* from domestic animals from Minas Gerais. *Parasite*, v.13, p. 143-149, 2006.
- BRANDÃO, G.P.; MELO, M.N.; GAZZINELLI, R.T.; CAETANO, B.C.; FERREIRA, A.M.; SILVA, L.A.; VÍTOR, R. W. Experimental reinfection of Balb/c mice with different recombinant type I/III strains of *T. gondii*: involvement of IFN-gamma and IL-10. *Mem Ins. Oswaldo Cruz.*, v.104, p. 241-245, 2009.
- BURG, J.L.; PERELMAN D.; KASPER, L.H.; WARE, P.L.; BOOTHROYD J.C. Molecular analysis of de gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol*, v.141, p.3584-3591, 1988.
- BURG, J. L.; GROVER, C. M.; POULETTY, P.; BOOTHROYD, J. C. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, v. 27, p. 1787-1792, 1989.
- CARELLOS, E. V. M.; ANDRADE, G. M. Q.; AGUIAR, R. A. L. P. Evaluation of prenatal screening for toxoplasmosis in Belo Horizonte, Minas Gerais, State, Brazil: a cross-sectional study of postpartum women in two maternity hospitals. *Cad Saúde Pública*, v. 24, p. 391-401, 2008.
- CARME, B.; DEMAR, M.; AJZENBERG, D.; DARDÉ, M. L. Severe acquired Toxoplasmosis caused by wild cycle of *Toxoplasma gondii*, French Guiana. *Emerg Infect Dis*, v. 15, p. 656-658, 2009.
- CARRUTHERS, V.B. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Acta Trop*, v.81, p.111-122, 2002.
- CASTRO, F.C.; CASTRO, M.J.B.V.; CABRAL, A.C.V.; FILHO, G.B.; VITOR, R.W.A.; LANA, A.M.A.; ANDRADE, G.M.Q.A. A comparison between methods for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Rev Bras Ginecol Obstet*, v.23, p.5 277-82, 2001.
- CARVALHEIRO, C.G.; MUSSI-PINHATA, M.M.; YAMAMOTO, A.Y.; DE SOUZA, C.B.; MACIEL, L.M. Incidence of congenital toxoplasmosis estimated by neonatal screening: relevance of diagnostic confirmation in asymptomatic newborn infants. *Epidemiol Infect*, v.133, p. 485-491, 2005.
- CAVALCANTE, A.C.R.; FERREIRA, A.M.; MELO, M.N.; FUX, B., BRANDÃO, G.P.; VITOR, R.W.A. Virulence and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolated from goats in Ceará, Brazil. *Small Rum. Res.*, v.69, p.79-82, 2007.
- CAZENAVE,J.; FORESTIER, F.; BESSIERES, M.H.; BROUSSIN B.; BEGUERET, J. Contribution of a new PCR assay to the prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Prenat Diagn*.v. 12, p119-127, 1992.

- CHABBERT E.; LACHAUD L.; CROBU L. Comparison of two widely used pcr primer systems for detection of *Toxoplasma* in amniotic fluid, blood, and tissues. *J. Clin. Micro.* v. 42; p 1719–1722, 2004.
- CHIARI, C. de A.; NEVES.D.P. Toxoplasmose humana adquirida através da ingestão de leite de cabra. *Mem Ins. Oswaldo Cruz*, v.79, p.337-340, 1984.
- COLOMBO, F.A.; VIDAL, J.E. ; OLIVEIRA, A.C.P.D. ; HERNANDEZ, A.V. ; BONASSER-FILHO, F. ; NOGUEIRA, R.S. ; FOCACCIA, R. ; PEREIRA-CHIOCCOLA, V L. . Diagnosis of Cerebral Toxoplasmosis in AIDS Patients in Brazil: Importance of Molecular and Immunological Methods Using Peripheral Blood Samples. *J Clin Microbiol*, v. 43; p. 5044-5047, 2005.
- CORREA, D.; CAÑEDO-SOLARES, I.; ORTIZ-ALEGRÍA, L.B.; CABALLERO-ORTEGA, H.; RICO-TORRES, C.P. Congenital and acquired toxoplasmosis: diversity and role of antibodies in different compartments of the host. *Parasite Immunol*, v. 29, p. 651–660, 2007.
- CRISTINA, N.; DARDÉ, M.L.; BOUDIN, C.; TAVERNIER, G.; PESTRE ALEXANDRE, M.; AMBROISE-THOMAS, P. A DNA fingerprinting method for individual characterization of *Toxoplasma gondii* strains, combination with isoenzymatic characters for determination of linkage groups. *Parasitol Res*, v. 81, p. 32-37, 1995.
- DARDÉ, M. L. Biodiversity in *Toxoplasma gondii*. *Curr Top Microbiol Immunol*, v. 219, p. 27-41, 1996.
- DARDÉ, M.L. Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. *Ann. Ist. Super. Sanità*, v.40, p.57-63, 2004.
- DARDÉ, M.L. *Toxoplasma gondii*, “new” genotypes and virulence. *Parasite*. v. 15, p. 366-371, 2008.
- DENKERS, E.Y.; GAZZINELLI R.T. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Microbiol Rev*. v. 11, p. 569-588,1998.
- DESMONTS, G.; DAFFOS, F.; FORESTIER, F.; CAPELLA-PAVLOVSKY, M.; THULLIEZ, P.; CHARTIER, M. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Lancet*. v. 1, p. 500-504, 1985.
- DUBEY, J.P. Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and humans. *Vet Parasitol*, v.64, p.65-70, 1996.
- DUBEY, J. P.; BEATTIE, C.P. *Toxoplasmosis of animal and man*. Boca Raton. FL: CRC Press. 1988, 220p.
- DUBEY, J.P.; GRAHAM, D.H.; BLACKSTON, C.R.; LEHMANN, T.; GENNARI, S.M.; RAGOZO, A.M.A.; SHEN, S.K.; KWOK, O.C.H.; HILL, D.E.;

- THULLIEZ, P. Biological and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from São Paulo Brazil: unexpected findings, *Int J Parasitol*, v. 32, p. 99–105, 2002.
- DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M.; SUNDAR, N.; VIANNA, M.C.; BANDINI, L.M.; ; KWOK, C.H.; SUF, C. Diverse and atypical genotypes identified in *Toxoplasma gondii* from dogs in São Paulo, Brazil. *J Parasitol*. V. 93, p. 60-64, 2007a
- DUBEY, J.P.; SUNDAR, N.; GENNARI, S.M.; MINERVINO, A.H.H.; FARIAS, N.A.R.; RUAS, J.L.; DOS SANTOS, T.R.B.; CAVALCANTE, G.T.; KWOK, O.C.H.; 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.*, v.143, p.182-188, 2007b
- DUBEY, J.P.; SUNDAR, N.; HILL, D.; VELMURUGAN, G.V.; BANDINI, L.A.; KWOK, O.C.; MAJUMDAR, D.; SU, C. High prevalence and abundant atypical genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from lambs destined for human consumption in the USA. *Int J Parasitol*, v.38. p. 999-1006, 2008.
- DUBEY, J. P. & SU, C. Population biology of *Toxoplasma gondii*: what's out and where did they come from. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v. 104, p. 190-195, 2009.
- DUBEY, J.P.; RAJENDRAN, C.; COSTA, D.G.; FERREIRA, L.R.; KWOK, O.C.; QU, D.; SU, C.; MARVULO, M.F.; ALVES, L.C.; MOTA, R.A.; SILVA, J.C. New *Toxoplasma gondii* genotypes isolated from free-range chickens from the Fernando de Noronha, Brazil: unexpected findings. *J Parasitol*. v. 96, p.709-712, 2010.
- DUNN, D.; WALLON, M.; PEYRON, F.; PETERSEN, E.; PECKHAM, C.; GILBERT, R. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *Lancet*. v. 353, p.1829-1833, 1999.
- ELBEZ-RUBINSTEIN, A.; AJZENBERG, D.; DARDÉ, M.L.; COHEN, R.; DUMETRE, A.; YEAR, H.; GONDON, E.; JANAUD, J.C.; THULLIEZ, P. Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: case-report, strain characterization, experimental model of reinfection and review. *J Infect Dis*. v. 199, p. 280-285, 2009.
- ELSHEIKHA, H. M. Congenital toxoplasmosis: Priorities for further health promotion action. *Public Health*. v. 122, p. 335-353, 2008
- FATOOHI A.F., COZON G.J.N., WALLON M., KAHN S., GAY-ANDRIEU F., GREENLAND T., PEYRON F. Cellular Immunity to *Toxoplasma gondii* in Congenitally Infected Newborns and Immunocompetent Infected Hosts. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. v. 22, p.181–184, 2005.

- FERREIRA, A.M.; MARTINS, M.S.; VITOR, R.W.A. Virulence for BALB/c mice and antigenic diversity of eight *Toxoplasma gondii* strains isolated in Brazil. *Parasite*, v. 8, p. 99–105, 2001.
- FERREIRA, A.M.; VITOR, R.W.; CARNEIRO, A.C.A.V.; BRANDÃO, G.P.; MELO, M.N. Genetic variability of Brazilian *Toxoplasma gondii* strains detected by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR) and simple sequence repeat anchored-PCR (SSR-PCR). *Infect Genet Evol.* v.4, p.131-142, 2004.
- FERREIRA A. M. , VITOR R.W., GAZZINELLI R. T., MELO M. N. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. *Infect Genet Evol*, v.6, p. 22-31, 2006.
- FERREIRA, I.M.R.; VIDAL, J.E.; COSTA-SILVA, T.A.; MEIRA, C.S.; HIRAMOTO, R.M.; OLIVEIRA, A.C.P.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L. *Toxoplasma gondii*: Genotyping of strains from Brazilian AIDS patients with cerebral toxoplasmosis by multilocus PCR-RFLP markers. *Exp. Parasitol.*, v.118, p.221-227, 2008.
- FERREIRA, I.M.R.; BRANDÃO DE MATTOS, C.C.; FERREIRA, A.I.C.; FREDERICO, F.B.; ALMEIDA JR, G.C; MATTOS, L.C.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L. Genotipagem de isolados de *Toxoplasma gondii* provenientes de pacientes com toxoplasmose ocular residentes em São Jose do Rio Preto, São Paulo, BR. *Rev Saúde.* 4, (Esp. 1), 2010.
- FILISSETTI, 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 Microbiol.* v. 41; p. 4826-4828, 2003.
- FILISSETTI D., CANDOLFI E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. *Ann Ist Super Sanita*, v. 40, p. 71-80, 2004.
- FOULON, W. Congenital toxoplasmosis: is screening desirable? *Scandin J Infect Dis.* v.84, p. 11-17. 1992.
- FOULON, W.; VILLENA, I.; STRAY-PEDERSEN, B.; DECOSTER, A.; LAPPALAINEN, M.; PINON, J.M. Treatment of toxoplasmosis during pregnancy: a multicenter study of impact on fetal transmission and children's sequelae at age 1 year. *Am J Obstet Gynecol*, v. 180, p.410-415, 1999.
- FUENTES, I.; RODRIGUEZ, M.; DOMINGO, C.J.; CASTILLO, F.; JUNCOSA, T.; ALVAR, J. Urine sample used for congenital toxoplasmosis diagnosis by PCR. *J Clin Microbiol.* v. 34; p. 2368-2371, 1996.
- FUENTES, I.; RUBIO, J.M.; RAMÍREZ, C.; ALVAR, J. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human

- toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. *J. Clin. Microbiol.*, v.39, p.1566-1570, 2001.
- FRAZÃO-TEIXEIRA, E.; SUNDAR, N.; DUBEY, J.P.; GRIGG, M.E.; OLIVEIRA, F.C.R. . Multi-locus DNA sequencing of *Toxoplasma gondii* isolated from Brazilian pigs identifies genetically divergent strains. *Vet Parasitol*, v.175, p. 33-39, 2011.
- FUX, B.; RODRIGUES, C. V.; PORTELA, R. W.; SILVA, N. M.; SU, C.; SIBLEY, D.; VITOR, R. W. A.; GAZZINELLI, R. Role of cytokines and major histocompatibility complex restriction in mouse resistance to infection with a natural recombinant strain (type I-III) of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun*, v. 71, p. 6392-6401, 2003.
- GALLEGO, C; SAAVEDRA-MATIZ; GÓMEZ-MARÍN, J.E. Direct genotyping of animal and human isolates of *Toxoplasma gondii* from Colombia (South America). *Acta Tropica*. v.97. p. 161-167, 2006.
- GALISTEU, K.J.; MATTOS, C.B.; LELIS, A.G.L.; OLIVEIRA, M.P.; SPEJORIM, L.F.; JORDÃO, P.; ZAGO, A.P.; CURY, P.M.; MATTOS, L.C.; ROSSIT, A.R.B.;CAVASINI, C.E.; MACHADO, R.L.D. Prevalência e fatores de risco associados à toxoplasmose em grávidas e suas crianças no Noroeste Paulista, Brasil. *Rev.Panam. Infectol.*, v.9, p.24-29, 2007.
- GAVINET, M.F.; ROBERT, F.; FIRTION, G.; DELOUVRIER, E.; HENNEQUIN, C.; MAURIN, J.R.; TOURTE-SCHAEFER, C.; DUPOUY-CAMET, J. Congenital toxoplasmosis due to maternal reinfection during pregnancy. *J Clin Microbiol*. v. 35, p.1276-1277, 1997.
- GAZZINELLI, R.T.; HAKIM, F.T.; HIENY, S.; SHEARER, G.M. & SHER, A. Synergistic role CD4+ and CD8+ t lymphocytes in INF-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *J. Immunol.*, v. 146, p. 286-292, 1991.
- GAZZINELLI, R.; YUHUI, X.; HIENY, S.; CHEEVER, A. & SHER, A. Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.*, v. 149, p. 175-180, 1992.
- GILBERT, R.E.; PECKHAM, C.S. Congenital toxoplasmosis in United Kingdom: to screen or not to screen? *J Med Screen*, v. 9, p. 135-141, 2002.
- GILBERT, R.; FREEMAN, K.; LAGO, E.G.; BAHIA-OLIVEIRA, L.; TAN, H.K.; BUFFOLANO, W.; PETERSEN, E. Ocular Sequelae of Congenital Toxoplasmosis in Brazil Compared with Europe. *Negl Trop Dis*, v. 2, p. 8-14, 2008.
- GILBERT, R. Treatment for congenital toxoplasmosis: finding out what works *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Vol. 104: 305-311, 2009.

- GRIGG, M.E.; GANATRA, J.; BOOTHROYD; J.C. ANDMARGOLIS, T.P. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. *J Infect Dis*, v.184, p. 633–639, 2001.
- GRIGG, M.E.; SUNDAR, N. Sexual recombination punctuated by outbreaks and clonal expansions predicts *Toxoplasma gondii* population genetics. *Int. J. Parasitol.*, v.39, p.925-933, 2009.
- GROSS, U.; HOLPERT, M.; GOEBEL, S. Impact of stage differentiation on diagnosis of toxoplasmosis. . *Ann. Ist.Super. Sanità*, v.40, p.65-70, 2004
- GUERINA, N.G.; HSU, H.W.; MEISSNER, H.C.; MAGUIRE, J.H.; LYNFIELD, R.; STECHENBERG, B.; ABROMS, I.; PASTERNAK, M.S.; HOFF, R.; EATON, R.B.; GRADY, G.F.; CHEESEMAN, S.H.; MCINTOSH, K.; MEDEARIS, D.N.; ROBB, R.; WEIBLEN, B.J. Neonatal serologic screening and early treatment for congenital *Toxoplasma gondii* infection. *N Engl J Med*, v.330, p. 1858-1863, 1994.
- GUGLIETTA, S.; BEGHETTO, E.; SPADONI, A.; BUFFOLANO, W.; DEL PORTO, P.; GARGANO, N.; Age-dependent impairment of functional helper T cell responses to immunodominant epitopes of *Toxoplasma gondii* antigens in congenitally infected individuals. *Microbes Infect*, v. 9, p. 127-133, 2006.
- GUO, Z.G.; JOHNSON, A.M. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* strains by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. *Parasitol*, v. 111, p. 127-132, 1995.
- GUO, Z.G.; JOHNSON, A.M. DNA polymorphisms associated with murine virulence of *Toxoplasma gondii* identified by RAPD-PCR. *Curr Top Microbiol Immunol*, v. 219, p. 17-26, 1996.
- GUO, Z.G.; GROSS, U.; JOHNSON, A.M. *Toxoplasma gondii* virulence markers identified by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. *Parasitol Res*, v. 83, p. 458-463, 1997.
- GUY, E.C.; JOYNSON, H.M. Potential of the polymerase chain reaction in the diagnosis of active *Toxoplasma* infection by detection of parasite in blood. *J. Infect. Dis.* V. 172, p.319-322, 1995.
- HILL, D.; DUBEY, J.P. *Toxoplasma gondii*: transmissions, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect Dis*, v.8, p.634-640, 2002.
- HILL, D.; SREEKUMAR, C.; DUBEY, J.P. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Anim Health Res Rev*, v.6, p.41-62, 2005.
- HITT, J.Á.; FILICE, G.A. Detection of *Toxoplasma gondii* parasitemia by gene amplification, cell culture, and mouse inoculation. *J. Clin Microbiol*, v.30, p.3181-4, 1992.

- HOHLFELD, P.; DAFFOS, F.; COSTA, J.M.; THULLIEZ, P.; FORESTIER, F.; VIDAUD, M. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase-chain-reaction test on amniotic fluid. *N Engl J Med*, v.331, p.695-699, 1994.
- HOLLIMAN, R.E. Congenital toxoplasmosis: prevention, screening and treatment. *J Hosp Infect.*, v. 30, p.179-90. 1995.
- HOMAN, W.L.; VERCAMMEN, M.; DE BRAEKELEER, J.; VERSCHUEREN, H. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int J Parasitol*, v.30, p. 69-75, 2000.
- HOWE, D.K.; SIBLEY, L.D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages, correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis*, v. 172, p. 1561-1566, 1995.
- HOWE, D.K.; HONORE, S.; DEROUIN, F.; SIBLEY, L.D. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*, v. 35, p. 1411–1414, 1997.
- HO-YEN D.O.; JOSS, A.W.L.; BALFOUR, A.H.; SMYTH, E.T.M.; BAIRD, D.; CHATTERTON, J.M.W. Use of the polymerase chain reaction to detect *Toxoplasma gondii* in human blood samples. *J Clin Pathol*; v. 45, p. 910-913, 1992.
- HUSON, D.H. SplitsTree: analyzing and visualizing evolutionary data. *Bioinformatics*, v.14, p.68-73, 1998.
- HUSON, D.H.; BRYANT, D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol. Biol. Evol.*, v.23, p.254-267, 2006.
- JACOBSON, N. G.; SZABO, S. J.; WEBER-NORDT, R. M.; ZHONG, Z.; SCHREIBER, R. D.; DARNELL, J.E. & MURPHY, K. M. Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)³ and Stat⁴. *J. Exp. Med.*, v. 181, p. 1755 – 1762, 1995.
- JENUM, P.A.; STRAY-PEDERSEN, B.; MELBY, K.K.; KAPPERUD, G.; WHITELAW, A.; ESKIL, A. 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.
- JONES, C.D.; OKHRAVI, N.; ADAMSON, P.; TASKER, S.; LIGHTMAN, S. Comparison of PCR detection methods for B1, P30, and 18S rDNA genes of *T. gondii* in Aqueous Humor. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, v.41, p.634-644, 2000.

- JONES, J.; LOPEZ, A., WILSON, M. Congenital toxoplasmosis. *Am Fam Physician*, v. 67, p. 2131-2138, 2003
- KAHI, S.; COZON, G. J. N.; PEYRON, F. Early detection of cellular immunity in congenital *Toxoplasma gondii*-infected children. *Pediatr Infect Dis J.* v.18, p.846–847, 1998.
- KAUFMAN, H.E.; REMINGTON, J.S.; JACOBS, L. Toxoplasmosis: the nature of virulence. *Am J Ophthalmol*, v.46. p.255-261, 1958.
- KHALIFA, K.E.S.; ROTH, A.; ROTH, B.; ARASTEH, K.N.; JANITSCHKE, K. Value of PCR for evaluating occurrence of parasitemia in immunocompromised patients with cerebral and extracerebral toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.*; v. 32, p. 2813-2819, 1994.
- KHAN, A.; TAYLOR, S.; SU, C.; MACKEY, A. J.; BOYLE, J.; COLE, R.; GLOVER, D.; TANG, K.; PAULSEN, I. T.; BERRIMAN, M.; BOOTHROYD, J. C.; PFEFFERKORN, E. R.; DUBEY, J. P.; AJIOKA, J. W.; ROOS, D. S.; WOOTTON, J. C.; SIBLEY, L. D. Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. *Nucleic Acids Research*, v. 33, p. 2980–2992, 2005.
- KHAN, A.; JORDAN, C.; MUCCIOLI, C.; VALLOCHI, A. L.; RIZZO, L. V.; BELFORT J. R. R.; VITOR R. W. A.; SILVEIRA, C.; L. DAVID SIBLEY. Genetic Divergence of *Toxoplasma gondii* Strains Associated with Ocular Toxoplasmosis, Brazil. *Emer. Infec. Dis.*, v. 12 p.942-949, 2006.
- KHAN, A.; TAYLOR, S.; AJIOKA, J. W.; RESENTHAK, B.; SIBLEY, D. Selection at a single locus leads to widespread expansion of *Toxoplasma gondii* lineages that are virulent in mice. *PLOS Genetics*, v. 5, p.1-14, 2009.
- KHAN, A.; DUBEY, J.P.; SU, C.; AJIOKA, J.W.; ROSENTHAL, B.M.; SIBLEY, L.D. Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. *Int J Parasitol.* v. 41, p. 645-655, 2011.
- KIM, K.; WEISS, L.M.; *Toxoplasma*: the next 100 years. *Microbes Infect*, v. 10, p.978-984, 2008.
- KIM, S-K; FOUTS,A.E.; BOOTHROYD, J.C. *Toxoplasma gondii* Dysregulates IFN- γ -Inducible Gene Expression in Human Fibroblasts: Insights from a Genome-Wide Transcriptional Profiling. *J Immunol*, v.178, p.5154-5165, 2010.
- KOMPALIC-CRISTO, A.; NOGUEIRA, S.A.; GUEDES, A.L.; FROTA, C.; GONZÁLEZ, L.F.; BRANDÃO, A.; AMENDOEIRA, M.R.; BRITTO, C.; FERNANDES, O. Lack of technical specificity in the molecular diagnosis of Toxoplasmosis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.98, p.92-95, 2004.

- KOMPALIC-CRISTO, A.; BRITTO, C.; FERNANDES, O. Molecular diagnosis of toxoplasmosis: review. *J Bras Patol Med Lab*; v. 41, p. 229-235, 2005.
- KOMPALIC-CRISTO, A.; FROTTA, C.; SUAREZ-MUTIS, M.; FERNANDES, O.; BRITTO, C. Evolution of a real-time PCR assay based on the repetitive B1 gene for the detection of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood. *Parasitol Res*; v. 101, p. 619-625, 2007.
- KRAVETZ, J.D.; FEDERMAN, D.G. Prevention of toxoplasmosis in pregnancy: knowledge of risk factors. *Infect Dis Obstet Gynecol*; v.13, p.161-165. 2005.
- LALIBERTE, J.; CARRUTHERS, V.B.; Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. *Cell Mol. Life. Science*, v. 65, p.1900-1915, 2008.
- LEBECH M, ANDERSEN O, CHRISTENSEN NC, HERTEL J, NIELSEN HE, PEITERSEN B, RECHNITZER C, LARSEN SO, NOGAARD-PEDERSEN B, PETERSEN E. Feasibility of neonatal screening for *Toxoplasma* infection in the absence of prenatal treatment. *Lancet* 353: 1834-1837, 1999.
- LEE, J.Y.; LEE, S.E.; LEE, E.G.; SONG, K.H. Nested PCR-based detection of *Toxoplasma gondii* in German shepherd dogs and stray cats in South Korea. *Res Vet Sci*, v. 85, p. 125-127, 2008.
- LEHMANN, T.; BLACKSTON, C.R.; PARMLEY, S.F.; REMINGTON, J.S.; DUBEY, J.P. Strain typing of *Toxoplasma gondii*: comparison of antigen-coding and housekeeping genes. *J. Parasitol.*, v.86, p.960-971, 2000.
- LEHMANN, T.; MARCET, P.L.; GRAHAM, D.H.; DAHL, E.R.; DUBEY, J.P. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v.103, p.11423-11428, 2006.
- LEVINE, N.D.; CORLISS, J.O.; COX, F.E.G.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONIGBERG, B. M.; LEEDALE, G.F.; LOEBLICH, A.R.; LOM, J.; LYNN, D.; MERINFELD, E.G.; PAGE, F.C; POLJANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VAVRA, J. E WALLACE, F.G. A newly revised classification of the Protozoa. *J. Protozool*, v.27, p.37-58, 1980.
- LEVINE, Norman D. The protozoan phylum apicomplexa. Boca Raton, Florida: CRC Press, c1988. 2v. ISBN 0-8493-4652-5
- LITERÁK, I.; RYCHLÍK, I.; SVOBODOVÁ, V.; POSPÍŠIL, Z. Restriction fragment length polymorphism and virulence of Czech *Toxoplasma gondii* strains. *Int J Parasitol*, v. 28, p. 1367-1374, 1998.
- MACHADO, A.S.; ANDRADE, G.M.Q.; JANUÁRIO, J.N.; FERNANDES, M.D.; CARNEIRO, A.C.A.V.; CARNEIRO, M.; CARELLOS, E.V.M.; ROMANELLI, R.M.C.; VASCONCELOS-SANTOS, D.V.; VITOR, R.W.A.

- IgG and IgM western blot assay for diagnosis of congenital toxoplasmosis
Mem Inst Oswaldo Cruz, V. 105. P. 757-761, 2010
- McLEOD, R.; BEEM, O.M.; ESTES, R.G. Lymphocyte anergy specific to *Toxoplasma gondii* in a baby with congenital toxoplasmosis. *J. Clin. Lab. Immunol.*, v.17, p.149-153, 1985.
- McLEOD, R.; DOWEL, M. Basic immunology: the fetus and the newborn. In: Ambrose-Thomas, P.; Petersen, E. Congenital toxoplasmosis, p. 37-68, 2000
- MCLEOD, R.; BOYER, K.; KARRISON, T.; KASZA, K.; SWISHER, C.; ROIZEN, N.; JALBRZIKOWSKI, J.; REMINGTON, J.; HEYDEMANN, P.; NOBLE, A.G.; METS, M.; HOLFELS, E.; WITHERS, S.; LATKANY, P.; MEIER, P. Toxoplasmosis Study Group. Outcome of treatment for congenital toxoplasmosis, 1981-2004: The National Collaborative Chicagobased, Congenital Toxoplasmosis Study. *Clin Infect Dis*. v. 42, p. 1383-1394, 2006.
- McLEOD, R.; KIEFFER, F.; SAUTTER, M.; HOSTEN, T.; PELLOUX, H. Why prevent, diagnose and treat congenital toxoplasmosis? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. v.104, p.320-344, 2009.
- MENOTTI, J.; GARIN, Y.J.F.; THULLIEZ, P.; SERUGUE, M.C.; STANISLAWIAK, J.; RIBAUD, P.; CASTRO, N. HOUSE, S.; DEROUIN, F. Evolution of a new 5' nuclease real-time PCR assay targeting the *Toxoplasma gondii* AF146527 genomic repeat. *Clin Microbiol Infect*. v. 16; p. 363-368, 2010.
- MESQUITA, R.T.; VIDAL, J.E.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L. Molecular diagnosis of cerebral toxoplasmosis: comparing markers that determine *Toxoplasma gondii* by PCR in peripheral blood from HIV-infected patients. *Braz J Infect Dis*. v. 14; p. 346-350, 2010.
- MILLAR, C.M., BOULTER, N.R., IKIN, R.J., SMITH, N.C. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*, v. 39, p. 23-39, 2009.
- MONTOYA, J.G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. *Seminars*. v.363, p.1965-1976, 2004.
- MONTOYA, J.G.; ROSSO, F. Diagnosis and Management of Toxoplasmosis. *Clin Perinatol*. v.32, p.705-726, 2005
- MONTOYA, A.; MIRÓ, G.; MATEO, M.; RAMÍREZ, C.; FUENTES, I. Detection of *Toxoplasma gondii* in cats by comparing bioassay in mice and polymerase chain reaction (PCR). *Vet Parasitol*. V. 160, p.159-162, 2009.

- OKAY, T.S.; YAMAMOTO, L.; OLIVEIRA, L.C.; MANULI, E.R.; JUNIOR, H.F.A.; NEGRO, G.M.B. Significant performance variation among PCR systems in diagnosing congenital toxoplasmosis in São Paulo, Brazil: analysis of 467 amniotic fluid samples. *Clinics*, v. 64; p. 171-176, 2009.
- PFAFF, A.W., ABOU-BACAR, A., LETSCHER-BRU, V., VILLARD, O., SENEGAS, A., MOUSLI, M., CANDOLFI, E. Cellular and molecular physiopathology of congenital toxoplasmosis: The dual role of INF- σ . *Parasitol*, v. 134, p. 1895-1902, 2007.
- PAUL, M; PETERSEN, E; SZCZAPA, J. Prevalence of congenital *Toxoplasma gondii* infection among newborns from the Poznan region of Poland: validation of a new combined enzyme immunoassay for *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin A and immunoglobulin M antibodies. *J Clin Microbiol*. v.39. 1912-1916, 2001.
- PENA, H. F. J.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SU, C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol*. v.38, p. 561-569, 2008.
- PENA, H.F.J. ; MARVULO, M.F.V. ; HORTA, M.C. ; SILVA, M.A. ; SILVA, J.C.R.; SIQUEIRA, D.B. ; LIMA, P.-A.C.P. ; VITALIANO, S.N. ; GENNARI, S.M. . Isolation and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* from a red-handed howler monkey (*Alouatta belzebul*), a jaguarundi (*Puma yagouaroundi*), and a black-eared opossum (*Didelphis aurita*) from Brazil. *Vet Parasitol*. v. 175, p. 377-381, 2011.
- PETERSEN, E. Toxoplasmosis. *Semin Fetal Neonatal Med*. v.12, p. 1-10, 2007.
- PINARDI, J.A. LESLIE NS, IRVINE PJ . Maternal serologic screening for Toxoplasmosis. *J Midwifery Womens Health*. v.48, p.308-316, 2003.
- PINON, J.M.; 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.
- QUEIROZ, G.M.; JANUÁRIO, J.N.; GOULART, E.M.A.; SIQUEIRA, A.L.; VITOR, R.A.; GONÇALVES, R.M.; RESENDE, L.M. Triagem neonatal para toxoplasmose congênita – estratégia viável para diagnóstico precoce da infecção. XI Congresso Mineiro de Pediatria, Revista Médica de Minas Gerais v 15 (sup 1) p. 20, 2006.
- RAGOZO, A.M.A.; PENNA, H.F.J.; YAI, L.E.O.; SU, C.; GENNARI, S. M. Genetic diversity among *Toxoplasma gondii* isolates of small ruminants from Brazil: Novel genotypes revealed. *Vet Parasitol*, v. 170, p. 307-312, 2010.

- REMYINGTON, J.S.; THULLIEZ, P.; MONTOYA, J.G. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*, v. 42, p. 941-945, 2004
- REMYINGTON, J.S.; McLEOD, R.; THULLIEZ, P.; DESMONTS, G. *Toxoplasmosis. Infect dis fetus newborn infant*, p. 947-1091, 2005.
- ROBBEN, P.M.; MORDUE, D.G.; TRUSCOTT, S.M.; TAKEDA, K.; AKIRA, S.; SIBLEY, L.D. Production of IL-12 by Macrophages Infected with *Toxoplasma gondii* Depends on the Parasite Genotype. *J Immunol*, v. 172, p.3696-3694, 2004.
- ROMAND, S.; WALLON, M.; FRANCK, J.; THULLIEZ, P.; PEYRON, F.; DUMON, H. Prenatal diagnosis using polymerase chain reaction on amniotic fluid for congenital toxoplasmosis. *Obstet Gynecol*, v. 97, p. 296-300, 2001.
- RORMAM, E.; STEIN, C.; RILKS, BEM-DAVID, H. Congenital Toxoplasmosis – prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. *Reprod toxicol*, v.21, p.458-472, 2006.
- SAEIJ, J.P.J.; BOYLE, J.P.; GRIG, M.; ARRIZABALAGA, G.; BOOTHROYD, J. C. Bioluminescence Imaging of *Toxoplasma gondii* Infection in Living Mice Reveals Dramatic Differences between Strains. *Infect Immun*. v.73, p.695-702, 2005.
- SEGUNDO, G.R.S.; SILVA, D.A.O.; MINEO, J.R.; FERREIRA, M.S. A comparative study of congenital toxoplasmosis between public and private hospitals from Uberlândia, MG, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v. 99, p. 13-17, 2004
- SENSINI, A. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy: opportunities and pitfalls of serological diagnosis. *Clin Microbiol Infect*, v. 12, p. 504-512, 2006.
- SIBLEY, L. D.; HOWE, D. K. Genetic basis of pathogenicity in toxoplasmosis. *Curr Top Microbiol Immunol*, v. 219, p. 3-15, 1996.
- SIBLEY, L.D.; AJIOKA, J.W. Population structure of *Toxoplasma gondii*: clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps. *Annual Rev. microbiology*, v. 62, p. 329-351, 2008.
- SILVA, A. V. & LANGONI, H. . The detection of *Toxoplasma gondii* by comparing cytology, histopathology, bioassay in mice, and polymerase chain reaction (PCR). *Vet Parasitol*. v. 97, p. 191-197, 2001.
- SILVA, R. C. & LANGONI, H. *Toxoplasma gondii*: host–parasite interaction and behavior manipulation. *Parasitol Res*, v. 105, p. 893–898, 2009.

- SILVA, R.C.; LANGONI, H.; SU, C.; SILVA, A. V. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* in sheep from Brazilian slaughterhouses: new atypical genotypes and the clonal type II strain identified. *Vet Parasitol*, v.175, p. 173-177, 2011.
- SINGH, B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. *Int J Parasitol*, v. 27, p. 1135-1145, 1997.
- SOARES, R.M.; SILVEIRA, L.H; SILVA, A.V.; RAGOZO, A.; GALLI, S.; LOPES, E.G.; GENNARI, S.M.; PENA, H.F.J. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens in the Pantanal área of Brazil. *Vet Parasitol.*, 2011 (*in press*).
- SPALDING, S.M.; AMENDOEIRA, M.R.R.; COELHO, J.M.C.; ANGEL, S.O. Otimização da reação em Cadeia da Polimerase para Detecção de *Toxoplasma gondii* em Sangue Venoso e Placenta de Gestantes. *J Bras Patol Med Lab*. v. 38, p. 105-110, 2002
- STAGNI, L.; ROMANO, M.A.; ROMANO, A.; MAGLI, A.; BRIGANTI, F.; DEL PEZZO, M.A.; BUFFOLANO, W. Prenatal screening for congenital toxoplasmosis in Campania: preliminary report on activities and results. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 374-377, 2009
- SUBAUSTE, C.S.; KONIARIS, A.H. & REMINGTON, J.S. Murine CD8+ cytotoxic T Lymphocytes lyse *Toxoplasma gondii*-infected cells. *J. Immunol.*, v.147, p. 3955-3959, 1991.
- SU, C.; HOWE, D.K.; DUBEY, J.P.; AJIOKA, J.W.; SIBLEY, L.D. Identification of quantitative trait loci controlling acute virulence in *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 99, p. 10753-10758, 2002.
- SU, C.; ZHANG, X.; DUBEY, J. P. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: A high resolution and simple method for identification of parasites. *Int J Parasitol*, v. 36, p. 841-848, 2006.
- SU, C. and DUBEY, J. P. *Toxoplasma*. In *Molecular Detection of Foodborne Pathogens* (ed. Liu, D.), pp. 741–753. CRC Press, Boca Raton, FL, USA., 2009.
- SU, C.; SHWAB, E.K.; ZHOU, P.; ZHU, X. Q.; DUBEY, J. P. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol*, v. 137, p. 1-11, 2010.
- SUKTHANA, Y. Toxoplasmosis: beyon animals to humans. *TRENDS in Parasitol*, v.22, p.137-142. 2006
- SUZUKI, Y.; ORELLANA, M. A.; SCHREIBER, R. D. & REMINGTON, J. S. Interferon- γ : The major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science*, v.240, p. 516-518, 1988.

- TAIT, E. D. & HUNTER, C. A. Advances in understanding immunity to *Toxoplasma gondii*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.104, p.201-210, 2009.
- TAYLOR, S.; BARRAGAN, A.; SU, C.; FUX, B.; FENTRESS S.J.; TANG, K.; BEATTY, W.L.; HAJJ, H. EL.; JEROME, M.; BEHNKE, M.S.; WITH, M.; WOTTON, J.C.; SIBLEY, L.D. A Secreted Serine-Threonine Kinase Determines virulence in the Eukaryotic Pathogen *Toxoplasma gondii*. *Science*. v.314, p.1776-1780, 2006.
- TENTER, A. M.; HECKEROTH, A.R.; WEISS, M.L. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol*, v.30, p.1217-1258. 2000.
- TIBAYRENC, M. Population genetics and strain typing of microorganisms, how to detect departures from panmixia without individualizing alleles and loci. *C R Acad Sci Paris*, v. 318, p. 135-139, 1995.
- UNNO, A.; SUZUKI, K.; XUAN, X.; NISHIKAWA, Y.; KITO, K.; TAKASHIMA, Y.; Parasitology International Dissemination of extracellular and intracellular *Toxoplasma gondii* tachyzoites in the blood flow. *Parasitol Int*, v.57, p.515-518, 2008.
- VALLOCHI, A.L.; MUCCIOLI, C.; MARTINS, M.C.; SILVEIRA, C.; BELFORT, R.; RIZZO, L.V. The genotype of *Toxoplasma gondii* strains causing ocular toxoplasmosis in humans in Brazil. *Am J Ophthalmol*, v. 139, p. 350-351, 2005.
- VARELLA, I.S.; CANTI, I.C.T.; SANTOS, B.R.; COPPINI, A.Z.; ARGONDIZZO, L.C.; TONIN, C.; WAGNER, M.B. Prevalence of acute toxoplasmosis infection among 41,112 pregnant women and the mother-to-child transmission rate in a public hospital in South Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v. 104, p. 383-388, 2009.
- VASCONCELOS-SANTOS, D.V.; MACHADO, D.O.; CAMPOS, W.R.; ORÉFICE, F.; ANDRADE, G.M.Q.; CARELLOS, E.V.M.; ROMANELLI, R. M.; JANUARIO, J.N.; RESENDE, L.M.; MARTINS FILHO, O.; CARNEIRO, A.C.A.V.; VITOR, R.W.A.; CAIAFFA, W.T. Congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil: results of early ophthalmologic examination of a large cohort of neonates. *Ophthalmology (Rochester)*. v. 116, p. 2199-2205, 2009.
- VELMURUGAN, G.V.; DUBEY, J.P.; SU, C. Genotyping studies of *Toxoplasma gondii* isolates from Africa revealed that the archetypal clonal lineages predominate as in North America and Europe. *Vet Parasitol*, v. 155, p. 314–318, 2008.
- VITOR, R.W.A.; LIMA, PINTO, J.B.; CHIARI, C.A. Eliminação de *Toxoplasma gondii* através de urina, saliva e leite de caprinos experimentalmente infectados. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.43, p.147-54. 1991.

- WAHAB, T; EDVINSSON, B; PALM, D; LINDH, J. Comparison of the AF146527 and B1 repeat elements, two real-time PCR targets used for detection of *Toxoplasma gondii*. *J. Clin Microbiol* v. 48, p.591-592, 2010.
- WONG, S-Y.; REMINGTON, J.S. Toxoplasmosis in Pregnancy. *Clin Infect Dis*, v. 18, p. 853-862, 1994.
- YAI, L.E.O.; RAGOZO, A.M.A.; SOARES, R.M.; PENA, H.F.J.; SU, C.; GENNARI, S.M. Genetic diversity among capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) isolates of *Toxoplasma gondii* from Brazil. *Vet Parasitol.* v.162, p. 332-337, 2009.
- YAMAMOTO, J.H.; VALLOCHI, A.L.; SILVEIRA, C.; FILHO, J.K.; NUSSENBLATT, R.B.; CUNHA-NETO, E.; GAZZINELLI, R.T.; BELFORT, R.; RIZZO, L.V. Discrimination between patients with acquired toxoplasmosis and congenital toxoplasmosis on the basis of the immune response to parasite antigens. *J Infect Dis.* v. 181, p. 2018–2022, 2000.

9. ANEXOS

ANEXO A

CONSENTIMENTO PARA PARTICIPAR NA PESQUISA CLÍNICA: “Triagem neonatal para Toxoplasmose Congênita no Estado de Minas Gerais”

EQUIPE MÉDICA (ordem alfabética): Daniel Vitor Vasconcelos Santos, Gláucia Manzan Queiroz de Andrade (coordenadora), José Nélio Januário, Luciana Macedo de Resende, Roberto Martins Gonçalves, Wesley Ribeiro Campos

INTRODUÇÃO:

Antes de aceitar participar desta pesquisa clínica, é importante que você leia e compreenda a seguinte explicação sobre os procedimentos propostos. Esta declaração descreve o objetivo, procedimentos, benefícios, riscos, desconfortos e precauções do estudo. Também descreve os procedimentos alternativos que estão disponíveis a seu filho e o seu direito de sair do estudo a qualquer momento.

OBJETIVO:

O objetivo deste estudo é avaliar a ocorrência de Toxoplasmose Congênita em recém-nascidos no Estado de Minas Gerais e estudar se a triagem neonatal é uma estratégia adequada para o diagnóstico e tratamento precoces da infecção. Pretende-se ainda conhecer as características clínicas, auditivas e oculares, das crianças positivas e a evolução, nas crianças tratadas, das complicações tardias da doença.

RESUMO:

A toxoplasmose ocorre em todo o Brasil e estudo realizado em Belo Horizonte mostrou que a infecção é freqüente em recém-nascidos, na proporção de um recém-nascido infectado para cada 1590 nascidos vivos. Estima-se que em Minas Gerais a infecção também seja comum e que muitas crianças nasçam com a infecção, sem sintomas, apresentando manifestações tardias, principalmente oculares, na adolescência ou vida adulta, o que dificulta o tratamento.

As crianças que nascem com toxoplasmose congênita podem ser prematuras, ter baixo peso, podem nascer com sintomas de infecção, mas acredita-se que a maioria nasce a termo e sem sintomas, o que atraza o diagnóstico e tratamento

nestes casos. Atualmente todas as crianças com toxoplasmose congênita, com ou sem sintomas, são tratadas com anti-microbianos (sulfas, pirimetamina e ácido folínico) durante o primeiro ano de vida e, em todo o mundo, os resultados desse tratamento indicam que a toxoplasmose congênita tratada no primeiro ano de vida apresenta menor ocorrência de complicação ocular e de atrasos no desenvolvimento da criança. A possibilidade de se conhecer as áreas de maior ocorrência da infecção no estado e tratar as crianças infectadas, torna este estudo de fundamental importância.

PROCEDIMENTOS:

Os pacientes incluídos no estudo serão as crianças participantes do programa “Teste do Pezinho” residentes no estado de Minas Gerais.

Solicitamos a participação do seu filho/filha neste estudo porque o exame para toxoplasmose feito com o sangue colhido para o Teste do Pezinho foi positivo. Por esta razão, a senhora e seu filho/sua filha precisarão fazer outro exame de sangue que será colhido no Posto de Saúde perto de sua casa. Este material será encaminhado para Belo Horizonte, onde será examinado no Laboratório da Faculdade de Medicina da UFMG (NUPAD) para confirmar ou excluir o diagnóstico de toxoplasmose. Se esse exame de triagem para toxoplasmose for negativo, a senhora será informada de que seu filho não nasceu com a doença.

Se esse segundo exame for positivo, a senhora será orientada a levar seu filho no posto de saúde de referência ou no Hospital das Clínicas da UFMG, em Belo Horizonte, para outros exames (exame de fundo de olho e radiografia de crânio) e tratamento.

A realização dos testes será encerrada após seis meses de avaliação no Estado. Mas, o controle e tratamento das crianças com toxoplasmose congênita será garantido pelo sistema de saúde no local de referência mais próximo.

DESCONFORTOS:

A retirada do sangue poderá resultar em sensação de tontura, inflamação da veia ou dor, ferimento, ou sangramento no local da punção. Há também a remota possibilidade de ocorrer infecção.

DANOS:

No caso de seu filho apresentar algum sinal/sintoma anormal que possa estar associado ao uso da medicação para toxoplasmose, durante a realização do estudo, você deverá entrar imediatamente em contato com a Dra. Gláucia Queiroz, nos telefones: 3248 9547, 3277 4341 ou 9950-5155. Se ela não estiver disponível, peça para falar com a Dra Andrea Lucchesi no mesmo telefone: 3248 9547 ou 3277 4341.

Se seu filho vier a sofrer qualquer dano físico como resultado desse estudo, observadas as recomendações do protocolo, ele receberá todos os cuidados médicos providos pela Instituição na qual o estudo se realizou. Seu filho não abrirá mão de seus direitos legais após você assinar o termo de consentimento informado.

BENEFÍCIOS:

Um benefício da participação de seu filho neste estudo é a contribuição ao conhecimento médico. Ele também poderá se beneficiar do diagnóstico e tratamento da toxoplasmose congênita, com boas chances de evoluir sem complicações de acometimento ocular e danos neurológicos. Os exames e procedimentos exigidos durante sua participação no estudo são os realizados na rotina do atendimento das crianças com toxoplasmose congênita e serão custeados pelo convênio entre a Secretaria de Estado da Saúde e a Faculdade de Medicina da UFMG. A medicação será oferecida gratuitamente para os participantes desse projeto de pesquisa.

TRATAMENTO ALTERNATIVO:

Existe a alternativa de não participar do estudo. Você poderá discutir com o médico esta alternativa antes de permitir que seu filho participe do estudo. Até o momento, não existe outra proposta de tratamento, diferente da que está sendo oferecida nesse projeto, para a criança com toxoplasmose congênita.

Ainda não dispomos de um programa de triagem neonatal implantado para diagnóstico da toxoplasmose congênita. Como a maior parte das crianças portadoras dessa infecção nascem sem sintomas, geralmente o diagnóstico é feito tardiamente, a partir de queixas visuais ou atrasos no desenvolvimento observadas na vida escolar.

CONFIDENCIALIDADE:

Os registros da participação de seu filho neste estudo serão mantidos confidencialmente até onde é permitido por lei. No entanto, o Comitê de Ética em Pesquisa/UFMG poderá verificar e ter acesso aos dados confidenciais que o identificam pelo nome. Qualquer publicação dos dados não o identificará. Ao assinar este formulário de consentimento, você autoriza o pesquisador a fornecer os registros médicos do seu filho para o Comitê de Ética e Pesquisa da UFMG.

INTERRUPÇÃO DA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

A participação de seu filho neste estudo é voluntária e sua recusa em participar ou seu desligamento do estudo não significará perda de benefícios aos quais seu filho tem direito. Você poderá interromper a participação de seu filho a qualquer momento sem afetar seu acompanhamento médico e tratamento, que será mantido pelo tempo necessário.

Seu médico poderá finalizar sua participação neste programa de pesquisa por qualquer uma das seguintes razões:

- Incapacidade de tomar o medicamento conforme orientado;
- Incapacidade de comparecer às consultas agendadas;
- Se o programa for cancelado pelo patrocinador ou por questões administrativas.

COMPENSAÇÃO:

Você não receberá qualquer compensação financeira pela participação do seu filho no estudo.

CONTATO COM A COMISSÃO DE ÉTICA:

Durante o estudo, se você tiver qualquer dúvida sobre este estudo, por favor, contate o Comitê de Ética em Pesquisa-COEPE/UFMG, no telefone: 34994592.

CONSENTIMENTO:

Li e entendi todas as informações. Tive oportunidades de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas satisfatoriamente. Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim, representante legal desta criança, indicando meu consentimento para participar neste estudo, até que eu decida o contrário.

Assinatura do representante legal do paciente

Data

Assinatura da testemunha

Data

Assinatura do pesquisador


Data

Parecer nº. ETIC 0298/06

Interessada: Profa. Gláucia Manzan Queiroz de Andrade
Departamento de Pediatria
Faculdade de Medicina-UFMG

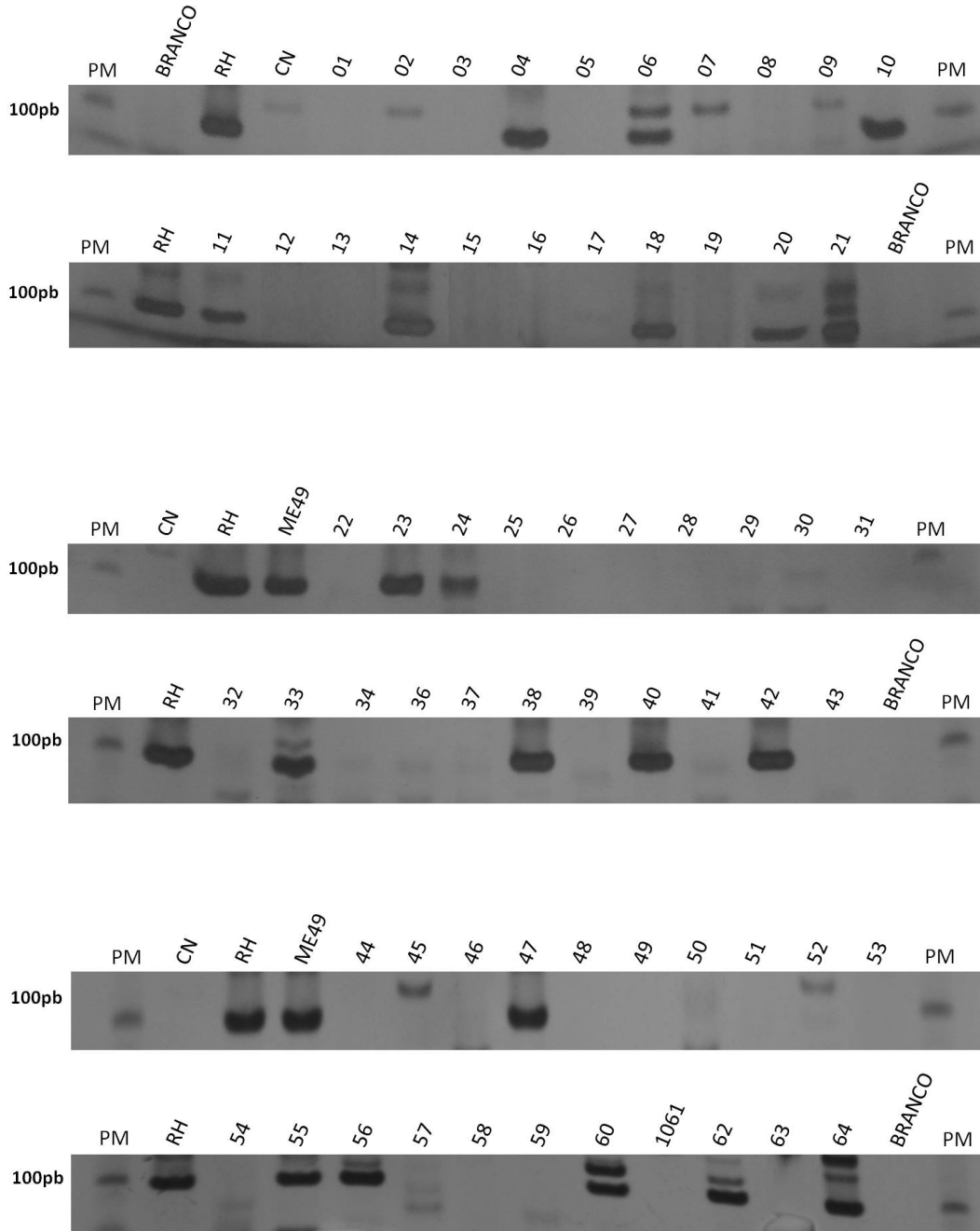
O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP, aprovou no dia 27 de setembro de 2006, o projeto de pesquisa intitulado "Triagem neonatal para toxoplasmose congênita no Estado de Minas Gerais" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do referido projeto.

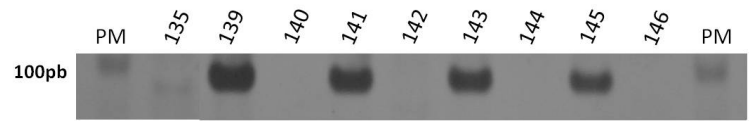
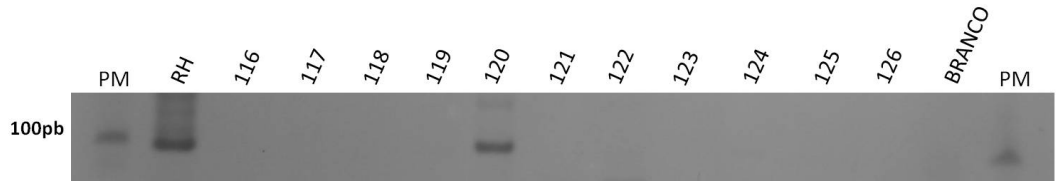
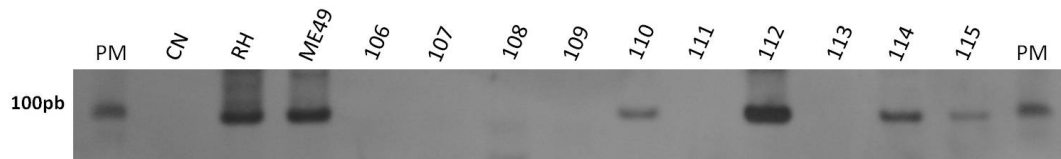
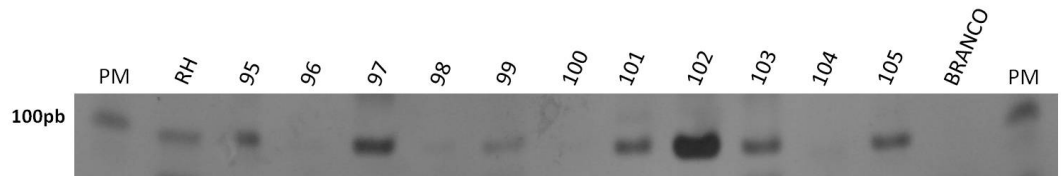
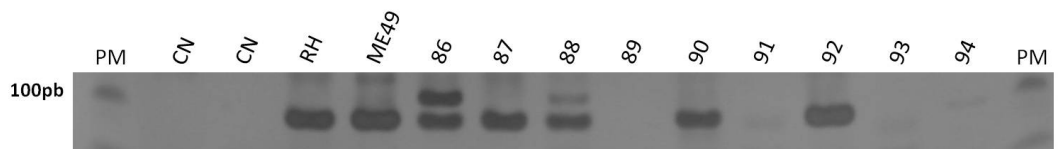
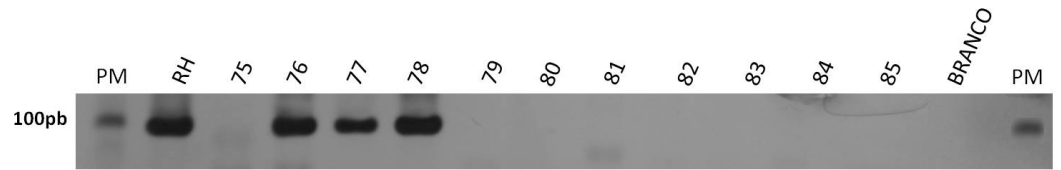
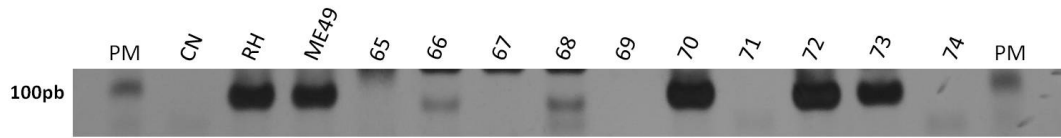
O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

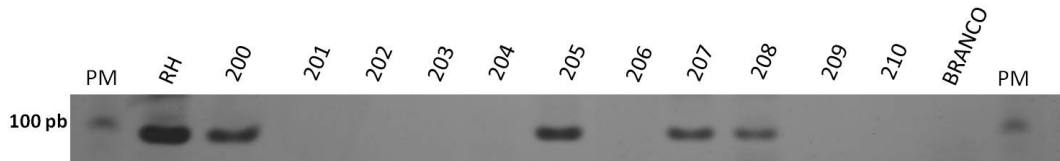
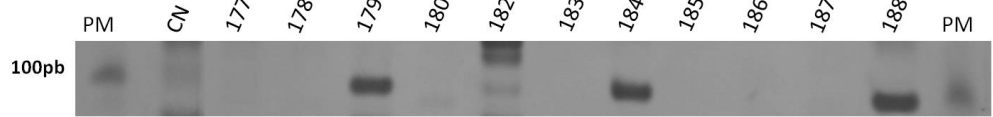
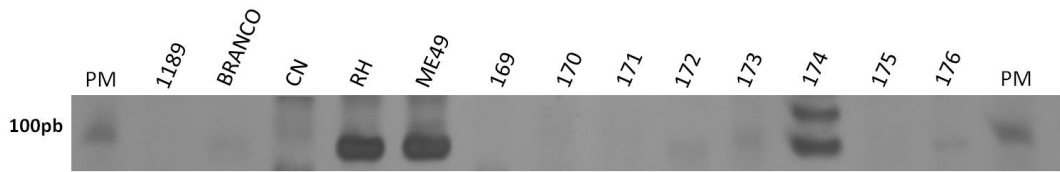
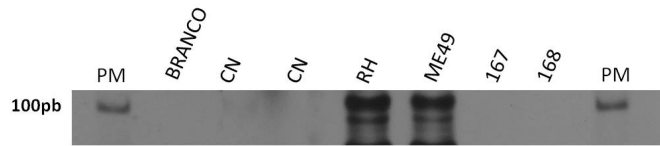
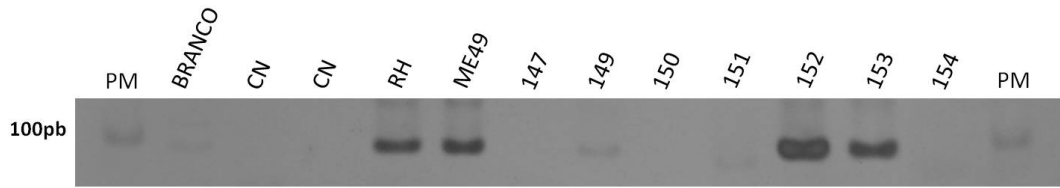

Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia
Presidente do COEP/UFMG

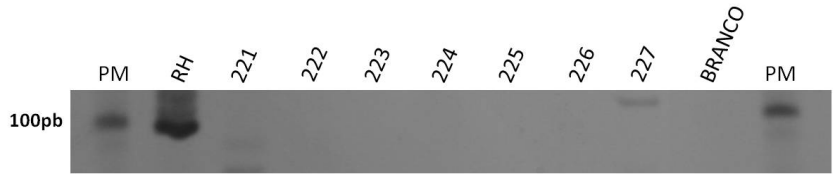
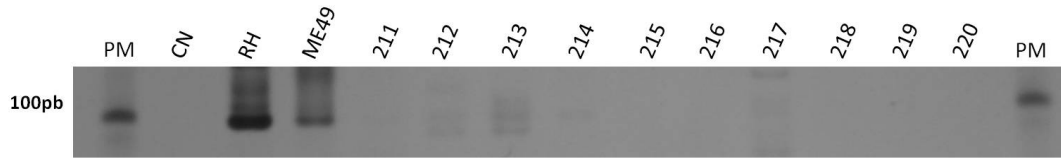
ANEXO B:

Nested PCR do gene B1. Pacientes NUPAD-AC 01 à 227. CN: controle negativo; DNA extraído de sangue de paciente não infectado com toxoplasmose. RH: controle positivo; DNA extraído de sangue negativo para a toxoplasmose adicionado de 100 taquizoítos/mL da cepa RH. ME49: controle positivo; DNA extraído de taquizoítos da cepa ME49.









ANEXO C – PCR-RFLP

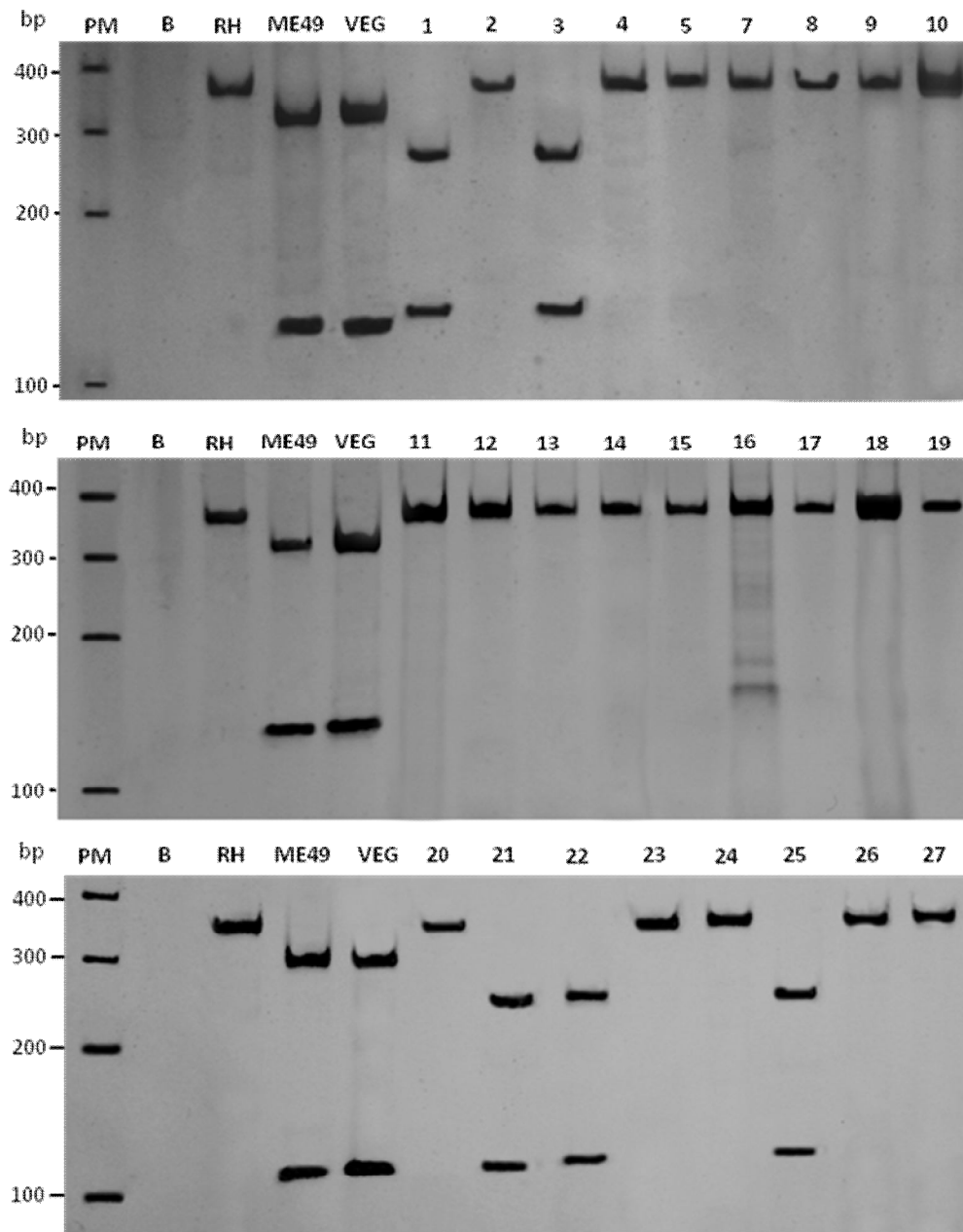


FIGURA 1 - PCR-RFLP do *loci* SAG1 com as endonucleases de restrição *Sal 96I* e *HaeIII*, em gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata, para genotipagem de cepas de *T. gondii* isoladas de sangue periférico de recém nascidos do estado de Minas Gerais (TgCTBr1, TgCTBr2, TgCTBr3, TgCTBr4, TgCTBr5, TgCTBr7, TgCTBr8, TgCTBr9, TgCTBr10, TgCTBr11, TgCTBr12, TgCTBr13, TgCTBr14, TgCTBr15, TgCTBr16, TgCTBr17, TgCTBr18, TgCTBr19, TgCTBr20, TgCTBr21, TgCTBr22, TgCTBr23, TgCTBr24, TgCTBr25, TgCTBr26, TgCTBr27), utilizando as cepas de referência RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III). PM = marcador de peso molecular (Promega, 100pb); B = controle negativo, sem DNA.

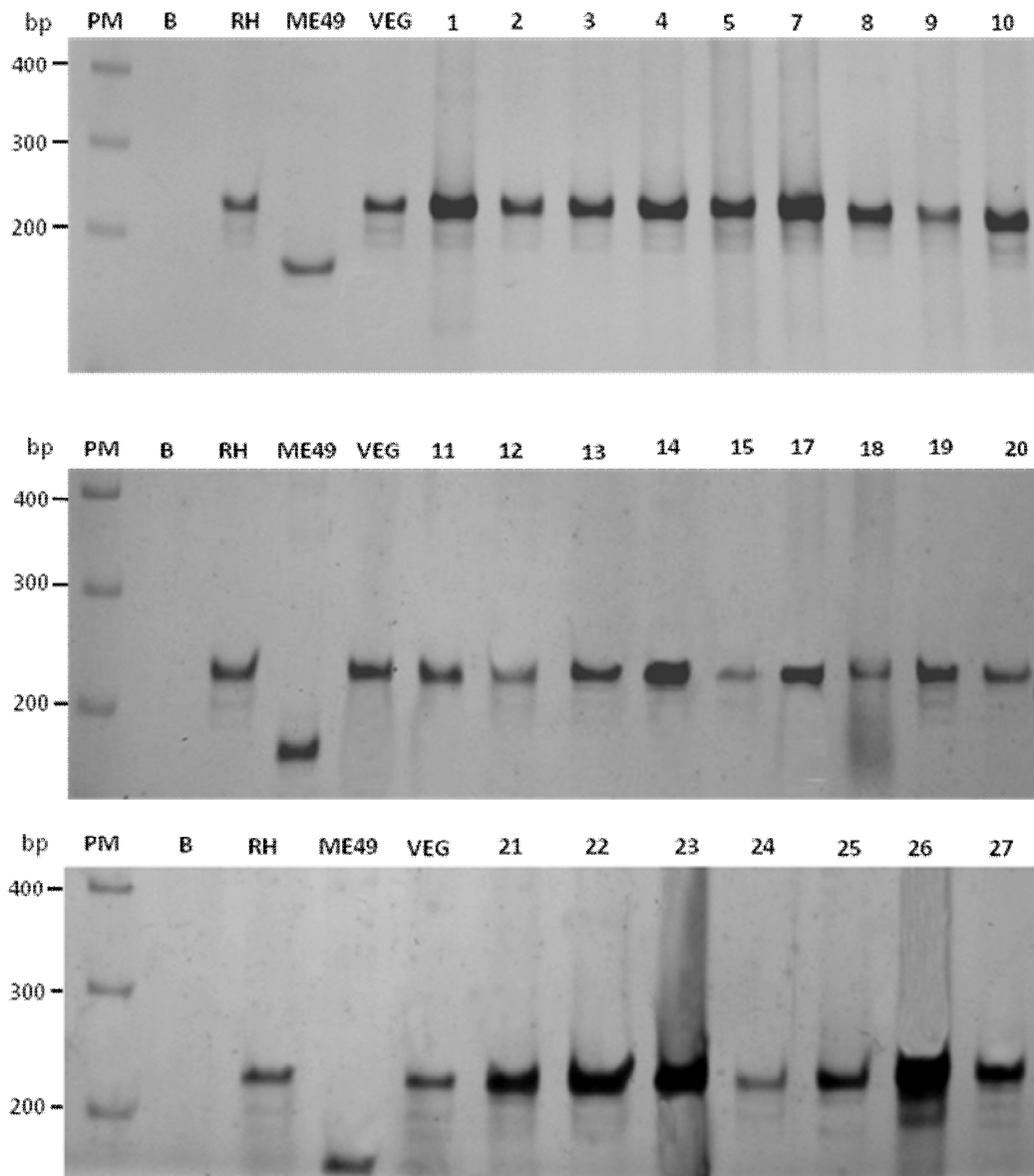


FIGURA 2 - PCR-RFLP do loci 3'SAG2 com a endonuclease de restrição *HhaI*, em gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata, para genotipagem de cepas de *T. gondii* isoladas de sangue periférico de recém nascidos do estado de Minas Gérias (TgCTBr1, TgCTBr2, TgCTBr3, TgCTBr4, TgCTBr5, TgCTBr7, TgCTBr8, TgCTBr9, TgCTBr10, TgCTBr11, TgCTBr12, TgCTBr13, TgCTBr14, TgCTBr15, TgCTBr17, TgCTBr18, TgCTBr19, TgCTBr20, TgCTBr21, TgCTBr22, TgCTBr23, TgCTBr24, TgCTBr25, TgCTBr26, TgCTBr27), utilizando as cepas de referência RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III). PM = marcador de peso molecular (Promega, 100pb); B = controle negativo, sem DNA.

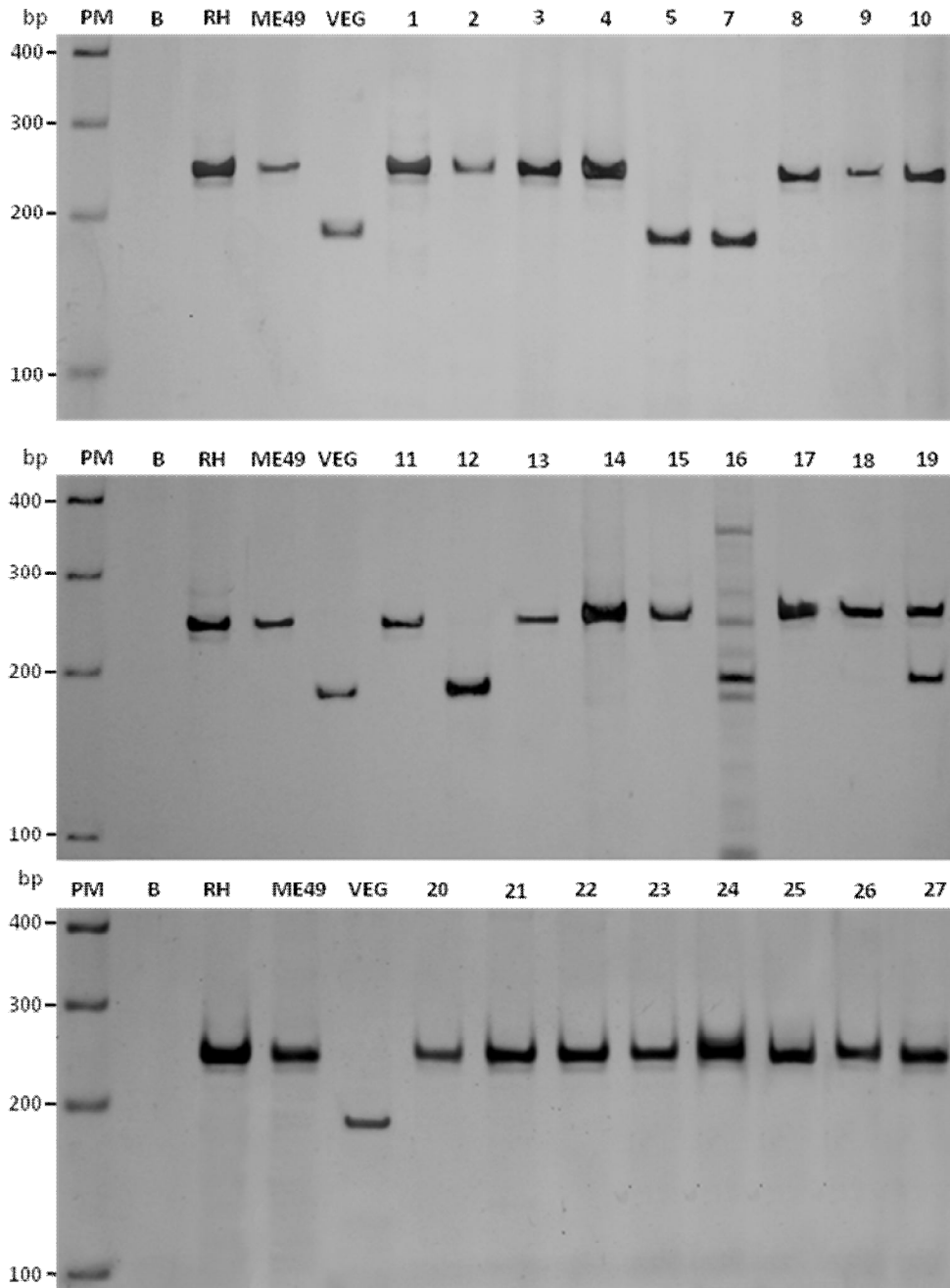


FIGURA 3 - PCR-RFLP do *loci* 5'SAG2 com a endonuclease de restrição *MboI*, em gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata, para genotipagem de cepas de *T. gondii* isoladas de sangue periférico de recém nascidos do estado de Minas Gerais (TgCTBr1, TgCTBr2, TgCTBr3, TgCTBr4, TgCTBr5, TgCTBr7, TgCTBr8, TgCTBr9, TgCTBr10, TgCTBr11, TgCTBr12, TgCTBr13, TgCTBr14, TgCTBr15, TgCTBr16, TgCTBr17, TgCTBr18, TgCTBr19, TgCTBr20, TgCTBr21, TgCTBr22, TgCTBr23, TgCTBr24, TgCTBr25, TgCTBr26, TgCTBr27), utilizando as cepas de referência RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III). PM = marcador de peso molecular (Promega, 100pb); B = controle negativo, sem DNA.

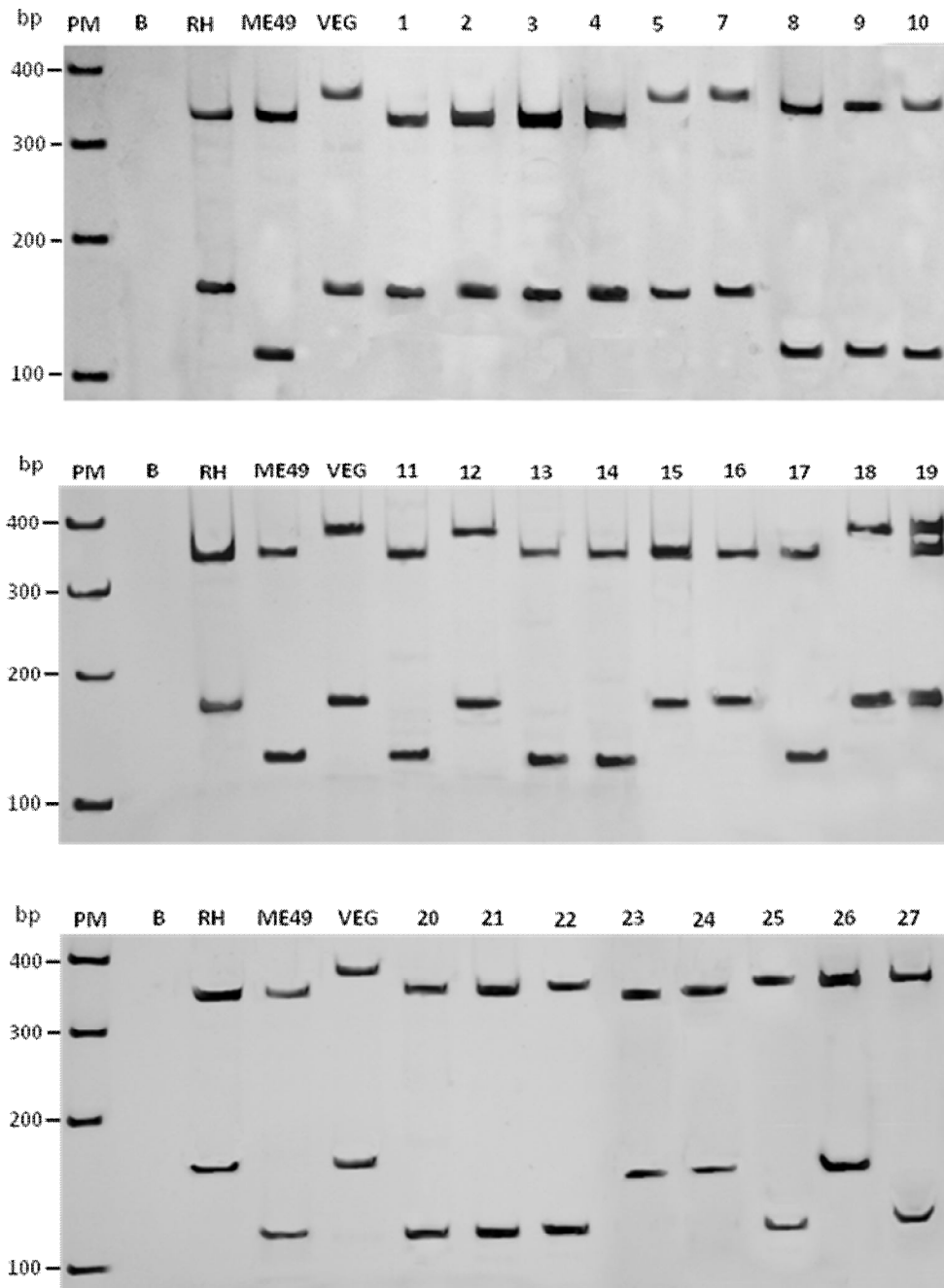


FIGURA 4 - PCR-RFLP do *loci* SAG2 alt com as endonucleases de restrição *Hinf*I e *Taq*I, em gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata, para genotipagem de cepas de *T. gondii* isoladas de sangue periférico de recém nascidos do estado de Minas Gerais (TgCTBr1, TgCTBr2, TgCTBr3, TgCTBr4, TgCTBr5, TgCTBr7, TgCTBr8, TgCTBr9, TgCTBr10, TgCTBr11, TgCTBr12, TgCTBr13, TgCTBr14, TgCTBr15, TgCTBr16, TgCTBr17, TgCTBr18, TgCTBr19, TgCTBr20, TgCTBr21, TgCTBr22, TgCTBr23, TgCTBr24, TgCTBr25, TgCTBr26, TgCTBr27), utilizando as cepas de referência RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III). PM = marcador de peso molecular (Promega, 100pb); B = controle negativo, sem DNA.

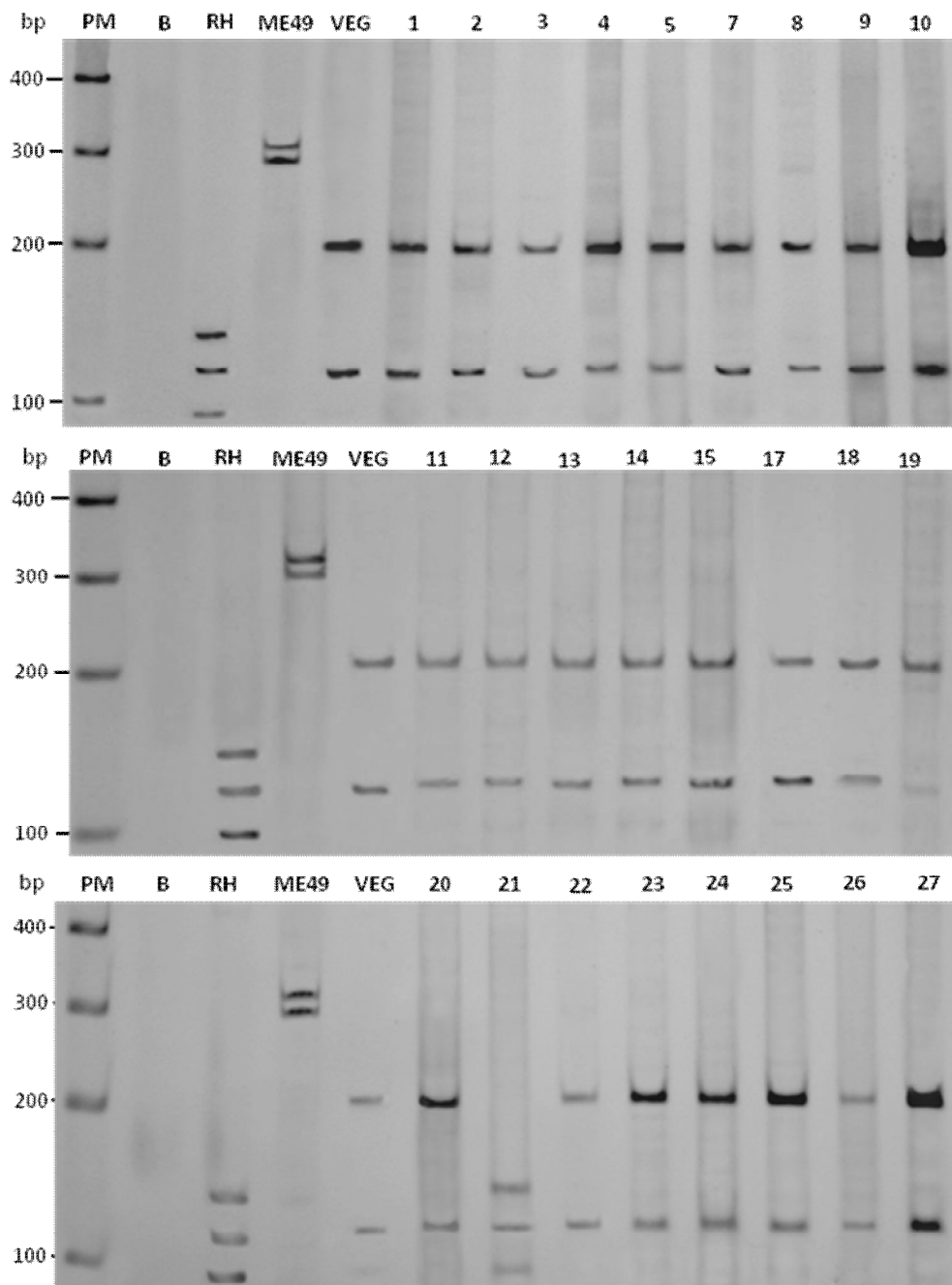


FIGURA 5 - PCR-RFLP do *loci* SAG3 com a endonuclease de restrição *NciI* em gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata, para genotipagem de cepas de *T. gondii* isoladas de sangue periférico de recém nascidos do estado de Minas Gerais (TgCTBr1, TgCTBr2, TgCTBr3, TgCTBr4, TgCTBr5, TgCTBr7, TgCTBr8, TgCTBr9, TgCTBr10, TgCTBr11, TgCTBr12, TgCTBr13, TgCTBr14, TgCTBr15, TgCTBr17, TgCTBr18, TgCTBr19, TgCTBr20, TgCTBr21, TgCTBr22, TgCTBr23, TgCTBr24, TgCTBr25, TgCTBr26, TgCTBr27), utilizando as cepas de referência RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III). PM = marcador de peso molecular (Promega, 100pb); B = controle negativo, sem DNA.

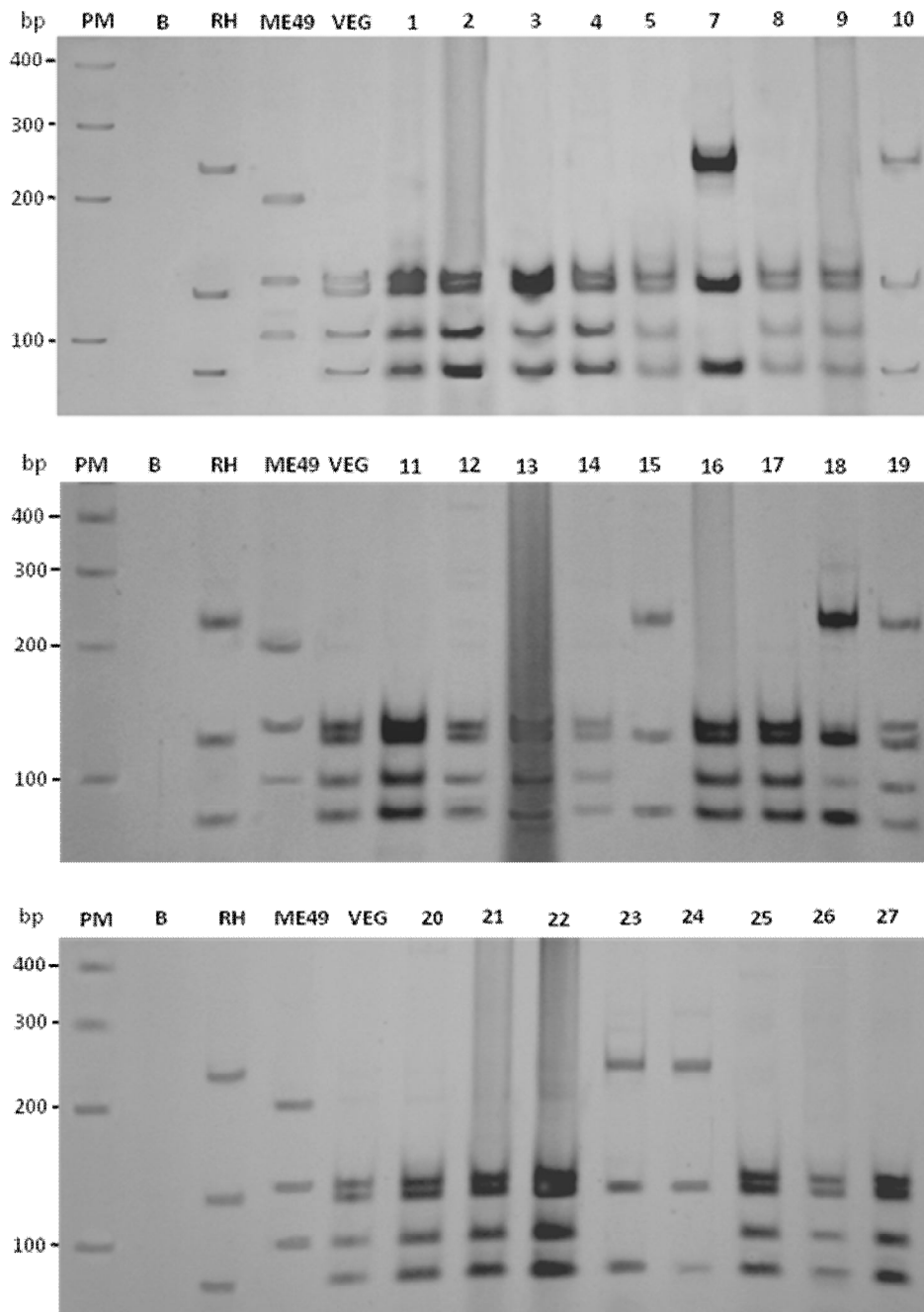


FIGURA 6 - PCR-RFLP do *loci* BTUB com as endonucleases de restrição *BsiEI* e *TaqI*, em gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata, para genotipagem de cepas de *T. gondii* isoladas de sangue periférico de recém nascidos do estado de Minas Gerais (TgCTBr1, TgCTBr2, TgCTBr3, TgCTBr4, TgCTBr5, TgCTBr7, TgCTBr8, TgCTBr9, TgCTBr10, TgCTBr11, TgCTBr12, TgCTBr13, TgCTBr14, TgCTBr15, TgCTBr16, TgCTBr17, TgCTBr18, TgCTBr19, TgCTBr20, TgCTBr21, TgCTBr22, TgCTBr23, TgCTBr24, TgCTBr25, TgCTBr26, TgCTBr27), utilizando as cepas de referência RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III). PM = marcador de peso molecular (Promega, 100pb); B = controle negativo, sem DNA.

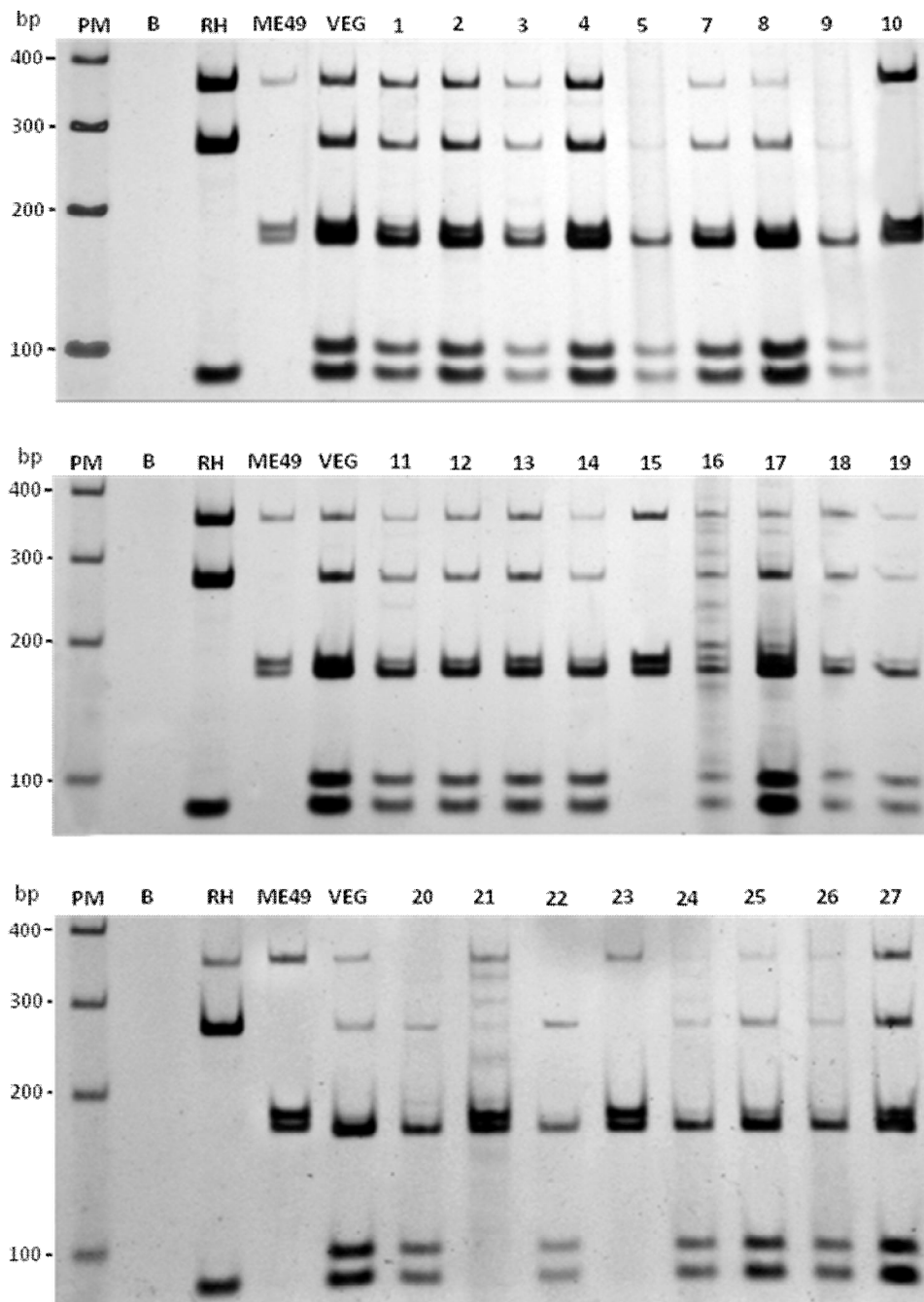


FIGURA 7 - PCR-RFLP do *loci* GRA6 com a endonuclease de restrição *MseI* em gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata, para genotipagem de cepas de *T. gondii* isoladas de sangue periférico de recém nascidos do estado de Minas Gerais (TgCTBr1, TgCTBr2, TgCTBr3, TgCTBr4, TgCTBr5, TgCTBr7, TgCTBr8, TgCTBr9, TgCTBr10, TgCTBr11, TgCTBr12, TgCTBr13, TgCTBr14, TgCTBr15, TgCTBr16, TgCTBr17, TgCTBr18, TgCTBr19, TgCTBr20, TgCTBr21, TgCTBr22, TgCTBr23, TgCTBr24, TgCTBr25, TgCTBr26, TgCTBr27), utilizando as cepas de referência RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III). PM = marcador de peso molecular (Promega, 100pb); B = controle negativo, sem DNA.

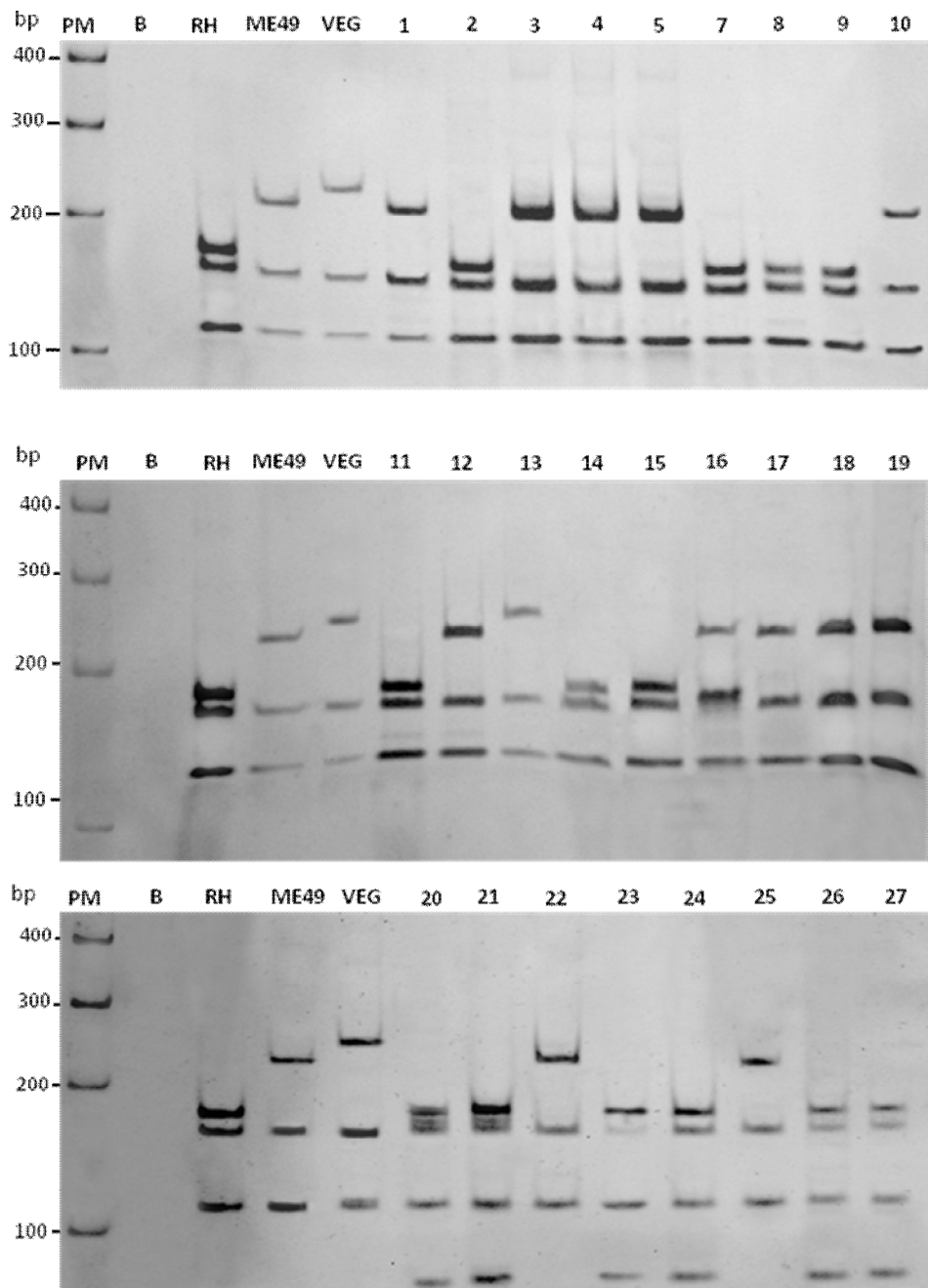


FIGURA 8 - PCR-RFLP do *loci* C22-8 com as endonucleases de restrição *BsmI* e *MboI*, em gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata, para genotipagem de cepas de *T. gondii* isoladas de sangue periférico de recém nascidos do estado de Minas Gerais (TgCTBr1, TgCTBr2, TgCTBr3, TgCTBr4, TgCTBr5, TgCTBr7, TgCTBr8, TgCTBr9, TgCTBr10, TgCTBr11, TgCTBr12, TgCTBr13, TgCTBr14, TgCTBr15, TgCTBr16, TgCTBr17, TgCTBr18, TgCTBr19, TgCTBr20, TgCTBr21, TgCTBr22, TgCTBr23, TgCTBr24, TgCTBr25, TgCTBr26, TgCTBr27), utilizando as cepas de referência RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III). PM = marcador de peso molecular (Promega, 100pb); B = controle negativo, sem DNA.

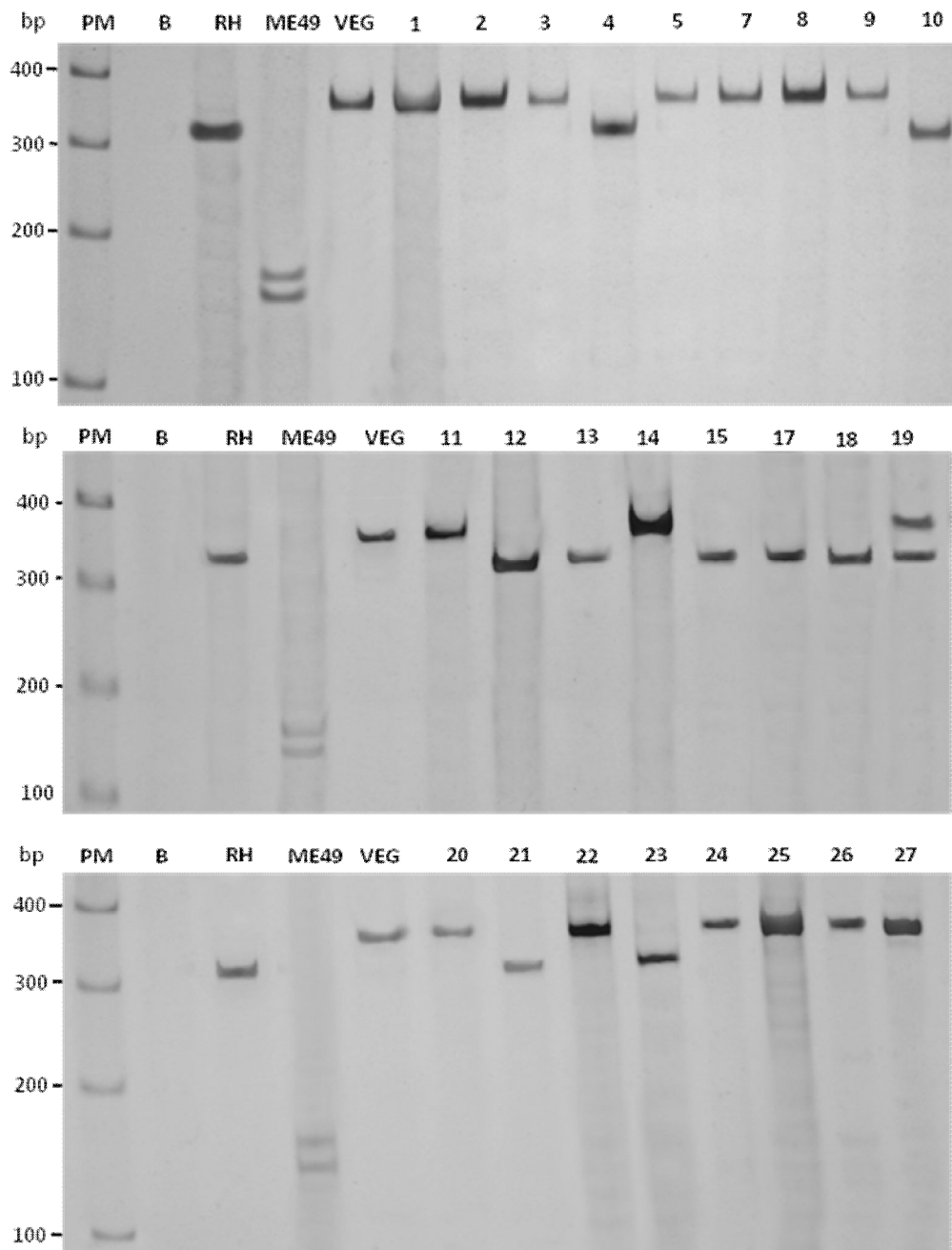


FIGURA 9 - PCR-RFLP do *loci* C29-2 com as endonucleases de restrição *HpyCH4IV* e *RsaI*, em gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata, para genotipagem de cepas de *T. gondii* isoladas de sangue periférico de recém nascidos do estado de Minas Gerais (TgCTBr1, TgCTBr2, TgCTBr3, TgCTBr4, TgCTBr5, TgCTBr7, TgCTBr8, TgCTBr9, TgCTBr10, TgCTBr11, TgCTBr12, TgCTBr13, TgCTBr14, TgCTBr15, TgCTBr17, TgCTBr18, TgCTBr19, TgCTBr20, TgCTBr21, TgCTBr22, TgCTBr23, TgCTBr24, TgCTBr25, TgCTBr26, TgCTBr27), utilizando as cepas de referência RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III). PM = marcador de peso molecular (Promega, 100pb); B = controle negativo, sem DNA.

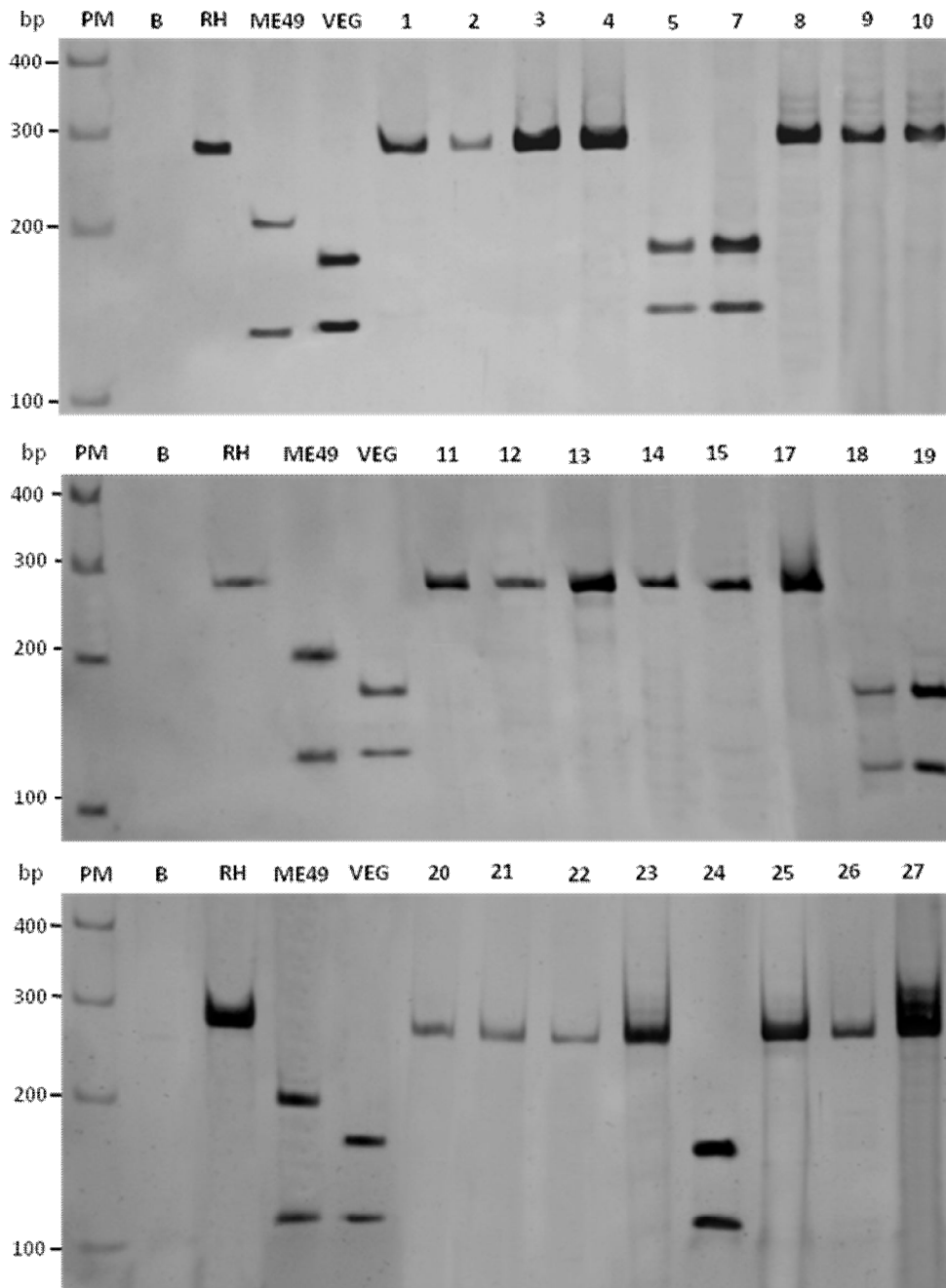


FIGURA 10 - PCR-RFLP do *loci* L358 com as endonucleases de restrição *HaeIII* e *NlaIII* em gel de poli-acrilamida a 5% corado com nitrato de prata, para genotipagem de cepas de *T. gondii* isoladas de sangue periférico de recém nascidos do estado de Minas Gerais (TgCTBr1, TgCTBr2, TgCTBr3, TgCTBr4, TgCTBr5, TgCTBr7, TgCTBr8, TgCTBr9, TgCTBr10, TgCTBr11, TgCTBr12, TgCTBr13, TgCTBr14, TgCTBr15, TgCTBr17, TgCTBr18, TgCTBr19, TgCTBr20, TgCTBr21, TgCTBr22, TgCTBr23, TgCTBr24, TgCTBr25, TgCTBr26, TgCTBr27), utilizando as cepas de referência RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III). PM = marcador de peso molecular (Promega, 100pb); B = controle negativo, sem DNA.

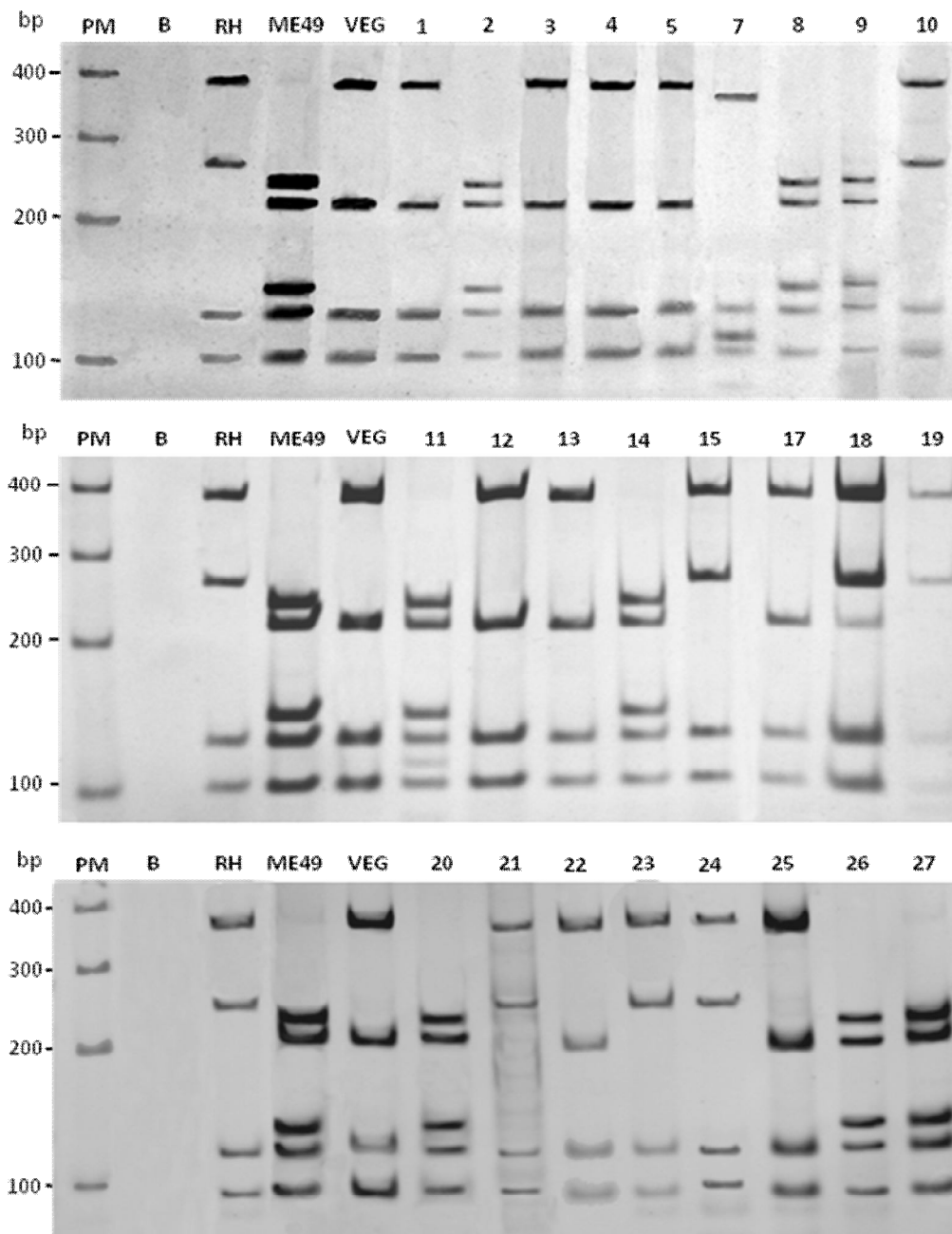


FIGURA 11 - PCR-RFLP do *loci* PK1 com as endonucleases de restrição *AvaI* e *RsaI* em gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata, para genotipagem de cepas de *T. gondii* isoladas de sangue periférico de recém nascidos do estado de Minas Gerais (TgCTBr1, TgCTBr2, TgCTBr3, TgCTBr4, TgCTBr5, TgCTBr7, TgCTBr8, TgCTBr9, TgCTBr10, TgCTBr11, TgCTBr12, TgCTBr13, TgCTBr14, TgCTBr15, TgCTBr17, TgCTBr18, TgCTBr19, TgCTBr20, TgCTBr21, TgCTBr22, TgCTBr23, TgCTBr24, TgCTBr25, TgCTBr26, TgCTBr27), utilizando as cepas de referência RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III). PM = marcador de peso molecular (Promega, 100pb); B = controle negativo, sem DNA.

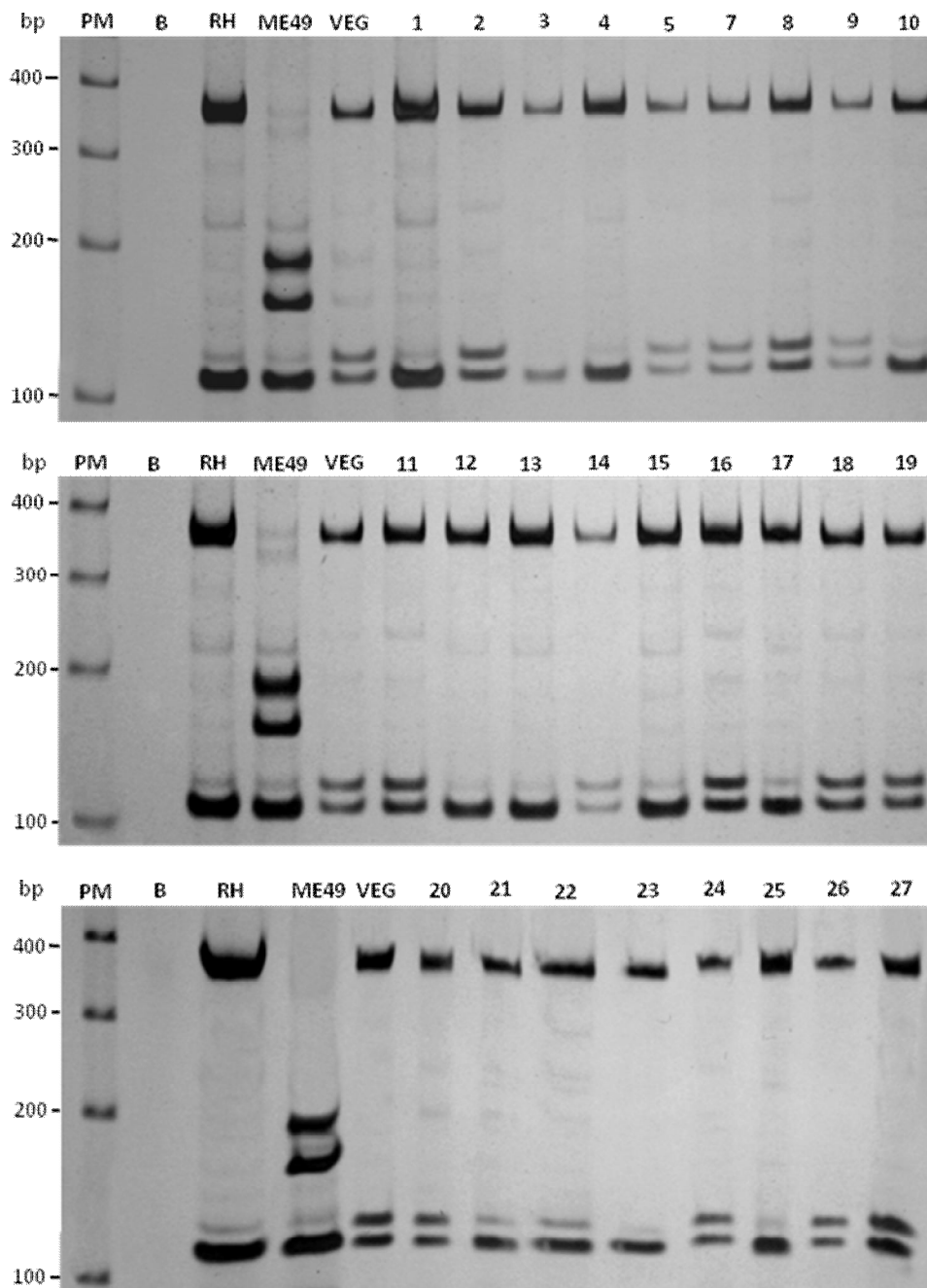


FIGURA 12 - PCR-RFLP do *loci* APICO com as endonucleases de restrição *AflII* e *DdeI*, em gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata, para genotipagem de cepas de *T. gondii* isoladas de sangue periférico de recém nascidos do estado de Minas Gerais (TgCTBr1, TgCTBr2, TgCTBr3, TgCTBr4, TgCTBr5, TgCTBr7, TgCTBr8, TgCTBr9, TgCTBr10, TgCTBr11, TgCTBr12, TgCTBr13, TgCTBr14, TgCTBr15, TgCTBr16, TgCTBr17, TgCTBr18, TgCTBr19, TgCTBr20, TgCTBr21, TgCTBr22, TgCTBr23, TgCTBr24, TgCTBr25, TgCTBr26, TgCTBr27), utilizando as cepas de referência RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III). PM = marcador de peso molecular (Promega, 100pb); B = controle negativo, sem DNA.

Durante a realização do doutorado, a candidata colaborou com as seguintes publicações relacionadas ao tema da tese:

- Vasconcelos-Santos, D. V. ; Machado Azevedo, D. O. ; Campos, W. R. ; Oréfica, F. ; Andrade, G. M. Q. ; Carellos, E. V. M. ; Romanelli, R. M. C ; Januario, J. N. ; Macedo de Rezende L. ; Olindo Assis Martins-Filho ; CARNEIRO, A. C. A. V. ;Vitor, R.W.A.; Caiaffa W. T. Congenital Toxoplasmosis in Southeastern Brazil: Results of Early Ophthalmologic Examination of a Large Cohort of Neonates. *Ophthalmology (Rochester, Minn.)*, v. 116, p. 2199-2205, 2009.

- Andrade, G. M. Q. ; Vasconcelos-Santos, D. V. ; Carellos, E. V. M.; Romanelli, R. M. C ;Vitor, R.W.A.; CARNEIRO, A. C. A. V. ; Januario, J. N.. Congenital toxoplasmosis from a chronically infected woman with reactivation of retinochoroiditis during pregnancy an underestimated event?. *J. Pediatr.*, v. 86, p. 1-4, 2010.

- Machado, Anderson S ; Andrade, Gláucia MQ ; Januário, José N ; Fernandes, Matheus D ; CARNEIRO, A. C. A. V. ; Carneiro, Mariângela ; Carellos, Ericka VM ; Romanelli, Roberta MC ; Vasconcelos-Santos, Daniel V ; Vitor, Ricardo WA . IgG and IgM western blot assay for diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* ., v. 105, p. 757-761, 2010.