



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

BEATRIZ DE SOUZA LIMA NINO

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA E BIOLÓGICA DE  
ISOLADOS DE *Toxoplasma gondii* NO BRASIL**

---

Londrina  
2019

BEATRIZ DE SOUZA LIMA NINO

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA E BIOLÓGICA DE  
ISOLADOS DE *Toxoplasma gondii* NO BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. João Luis Garcia

Londrina  
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

N715c Nino, Beatriz de Souza Lima.  
CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA E BIOLÓGICA DE ISOLADOS DE  
*Toxoplasma gondii* NO BRASIL / Beatriz de Souza Lima Nino. - Londrina,  
2019.  
64 f.

Orientador: João Luis Garcia.  
Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina,  
Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal,  
2019.  
Inclui bibliografia.

1. PCR-RFLP - Tese. 2. Camundongos Suíços Albinos - Tese. 3.  
Toxoplasmose - Tese. 4. Genotipagem - Tese. I. Garcia, João Luis. II.  
Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de  
Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 576.8:619

BEATRIZ DE SOUZA LIMA NINO

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA E BIOLÓGICA DE ISOLADOS DE  
Toxoplasma gondii NO BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. João Luis Garcia  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Italmir Teodorico Navarro  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra. Regina Mitsuka Breganó  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. George Rego Albuquerque  
Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC

---

Prof. Dr. Luiz Daniel de Barros  
Centro Universitário das Faculdades Integradas  
de Ourinhos – UNIFIO

Londrina, 22 de fevereiro de 2019

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a meus pais Rose e Luiz por todo incentivo e apoio durante todos os momentos, e por me ajudar muito com meus filhos durante os períodos de estudos e reflexões para a realização deste trabalho.

Agradeço a meu marido Evandro por sempre me apoiar e me incentivar sendo companheiro em todos os momentos, aos meus filhos Mateus e Murilo pelo incentivo mesmo muitas vezes não entendendo todo o esforço e ausência necessários para a realização deste trabalho. Agradeço também a toda a minha família por estarem sempre presentes além de sempre incentivar e apoiar a realização deste trabalho

A minha grande amiga Andréia Carla Eugênio Pupim, que me acompanha desde a graduação por todo incentivo, parceria, companhia, conversas, ajuda e por estar presente sempre em todos os momentos.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. João Luis Garcia por toda amizade e por sempre acreditar em meu potencial e aceitar fazer parte do meu desenvolvimento acadêmico e profissional dentro da universidade.

Agradeço a Profa. Dra. Prof Dra. Roberta Lemos por toda amizade e participação na de banca de qualificação, sendo de grande contribuição para a correção deste trabalho.

Agradeço aos Professores Dr. Itamar Teodorico Navarro, Dra. Regina Mitsuka Breganó, Dr. Luiz Daniel de Barros e Dr. George Albuquerque pela amizade e participação na banca de qualificação e defesa.

Agradeço aos amigos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, por compartilhar os momentos de descontração necessários para motivar a caminhada a cada dia.

Agradeço a todos os alunos de iniciação científica, mestrado, doutorado e residentes dos Laboratórios de Zoonoses e Saúde Pública, Protozoologia, Parasitologia, que permanecem e que passaram por aqui pois sempre tive algo a aprender com cada um.

Por todos aqueles que se tornaram grandes amigos com quem compartilho alegrias, tristezas, conquistas e não somente protocolos e papers.

Obrigada por tudo!!!

**"Bom mesmo é ir a luta com determinação,  
abraçar a vida e viver com paixão, perder  
com classe e viver com ousadia. Pois o triunfo  
pertence a quem se atreve e a vida é muito  
bela para ser insignificante"**

**Charles Chaplin**

NINO, Beatriz de Souza Lima. **Caracterização genotípica e biológica de isolados de Toxoplasma gondii no Brasil**. 2019. 64 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## RESUMO

O isolamento de *Toxoplasma gondii* por meio de bioensaio em camundongos é uma metodologia bastante utilizada para auxiliar estudos sobre a patogenia e virulência de cepas isoladas em amostras humanas, animais ou ambientais. *T. gondii* foi o causador de um surto de grandes proporções no ano de 2018 no município de Santa Maria – RS. Foram confirmados 809 casos, sendo 114 gestantes, com três óbito fetais, 10 abortamentos, e 22 casos de toxoplasmose congênita (TC). Este trabalho teve por objetivo caracterizar genotipicamente 13 cepas isoladas de diferentes espécies, bem como, isolar e genotipar o parasita presente nas amostras de placenta humana obtidas durante o surto de toxoplasmose no município de Santa Maria, além de verificar a virulência dessas cepas em camundongos. Todas as amostras também foram submetidas ao teste de virulência em camundongos, para avaliar a curva de sobrevivência, onde foram realizados inóculos nas diluições 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>2</sup> e 10<sup>1</sup> taquizoítos por mL e posteriormente inoculados em camundongos por via intraperitoneal. A caracterização genotípica dos isolados foi realizada pela PCR-RFLP, utilizando os 11 marcadores genéticos (SAG1, 5'-3'SAG2, alt. SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico), e clivados com enzimas de restrição. Das 13 cepas analisadas foi possível caracterizar seis genótipos diferentes, sendo quatro distribuídos aos genótipos, #21, #65, #166 bem como dois genótipos novos ainda não descritos no ToxoDB. A comparação das curvas de sobrevivência dessas cepas foi avaliada de acordo com o inóculo de 10<sup>3</sup> taquizoítos/mL, sendo que apenas duas delas não tiveram características semelhantes a cepa de referência RH de alta virulência. Os cinco isolados de placenta humana de Santa Maria demonstraram padrão idêntico para os 10 marcadores genéticos, e não foi associado a nenhum genótipo dos tipos clonais típicos I, II e III, sendo considerados virulentos pois houve mortalidade de 100% em animais inoculados com doses de 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup> e 10<sup>3</sup> e 10<sup>2</sup> taquizoítos/ml compatíveis com cepas de alta virulência como a RH. As cepas analisadas confirmam a elevada diversidade genotípica e biológica dos isolados brasileiros, bem como, a origem a partir de um único isolado no surto em Santa Maria.

**Palavras-chave:** Camundongos. Genotipagem. PCR-RFLP. Toxoplasmose congênita.

NINO, Beatriz de Souza Lima. **Genotypic and biological characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in Brazil**. 2019. 64 p. Thesis (Doctorate in Animal Science) - State University of Londrina, Londrina, 2019.

## ABSTRACT

The isolation of *Toxoplasma gondii* using bioassay in mice is a methodology widely used to assist studies on the pathogenesis and virulence of isolated strains in human, animal or environmental samples. *T. gondii* was the cause of a major outbreak in 2018 in the municipality of Santa Maria - RS. 809 cases were confirmed, of which 114 were pregnant women, with three fetal deaths, 10 abortions, and 22 cases of congenital toxoplasmosis (CT). This study aimed to characterize 13 strains isolated from different species genotypically, as well as isolate and genotype the parasite present in human placenta samples obtained during the toxoplasmosis outbreak in the municipality of Santa Maria, in addition to verifying the virulence of these strains in mice. All samples were also subjected to virulence testing in mice, to evaluate the survival curve, where inoculations were performed at dilutions 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>2</sup> and 10 tachyzoites per mL and subsequently inoculated into mice intraperitoneally. The genotypic characterization of the isolates was performed by PCR-RFLP, using the 11 genetic markers (SAG1, 5'-3'SAG2, alt. SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico), and cleaved with restriction enzymes. Of the 13 strains analyzed, it was possible to characterize six different genotypes, four of which were distributed to the genotypes, # 21, # 65, # 166 as well as two new genotypes not yet described in ToxoDB. The comparison of the survival curves of these strains was evaluated according to the inoculum of 10<sup>3</sup> tachyzoites / mL, and only two of them did not have characteristics similar to the reference strain of high virulence RH. The five human placenta isolates from Santa Maria showed an identical pattern for the 10 genetic markers and were not associated with any genotype of typical clonal types I, II and III, being considered virulent because there was 100% mortality in animals inoculated with doses of 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup> and 10<sup>3</sup> and 10<sup>2</sup> tachyzoites/ml compatible with highly virulent strains such as RH. The strains analyzed to confirm the high genotypic and biological diversity of Brazilian isolates, as well as the origin from a single isolate in the outbreak in Santa Maria.

**Keywords:** Mice. Genotyping. PCR-RFLP. Congenital toxoplasmosis.

## LISTA DE TABELAS

### Referencial Teórico

<b>Tabela 1</b> – Primers internos e Externos Utilizados na Reação de Multilocus Nested PCR- RFLP. Enzimas de Restrição e condições de reação para cada marcador a ser avaliado .....	20
---	----

### Artigo A

<b>Tabela 1</b> – Espécie de origem dos isolados submetidos a PCR-RFLP e análise de virulência .....	47
<b>Tabela 2</b> – Genotipagem de Isolados de <i>T.gondii</i> avaliados por meio da PCR-RFLP, demonstrando o resultado da análise dos 10 marcadores.....	48
<b>Tabela 3</b> – Análise de virulência, demonstrando a mortalidade de acordo com o inóculo.....	49

### Artigo B

<b>Tabela 1</b> – Materiais enviados para bioensaio, provenientes de Gestantes diagnosticadas com Toxoplasmose e a idade gestacional durante a vigência do surto na cidade de Santa Maria - Rio Grande do Sul - Brasil, 2018 .....	65
<b>Tabela 2</b> – Resultado das análises da PCR dos materiais primários e do bioensaio dos fragmentos enviados para análise .....	66
<b>Tabela 3</b> – Resultado da PCR-RFLP para os isolados em bioensaio das amostras enviadas de Santa Maria - Rio Grande do Sul, Brasil, 2018 .....	67

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	11
2.1. TOXOPLASMA GONDII .....	11
2.2. GENOTIPAGEM E VIRULÊNCIA DE TOXOPLASMA GONDII .....	13
2.3. VIRULÊNCIA DAS CEPAS DE TOXOPLASMA GONDII.....	17
2.4. TOXOPLASMOSE EM HUMANOS .....	20
2.5. TOXOPLASMOSE EM ANIMAIS .....	21
<b>REFERENCIAS</b> .....	26
<b>3. OBJETIVO</b> .....	32
3.1. OBJETIVO GERAL .....	32
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
<b>4. ARTIGO A</b> .....	33
Caracterização genotípica e biológica de isolados de toxoplasma gondii.....	33
<b>5. ARTIGO B</b> .....	47
Caracterização genotípica de isolados de Toxoplasma gondii oriundos do surto de toxoplasmose humana no município de Santa Maria – RS.....	47
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	63

## 1 INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é causada pelo parasita intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii* (NICOLLE; MANCEAUX, 1909) que infecta todos os animais homeotérmicos, sendo a prevalência em humanos no Brasil é uma das maiores do mundo (DUBEY, 2009).

A infecção por *T. gondii* pode ser adquirida pela ingestão de cistos presentes nos tecidos de animais infectados, quando estes são consumidos crus ou mal cozidos, pela ingestão de água contaminada com oocistos ou pela via transplacentária (TENTER et al., 2000). As fontes de infecção para os animais são as mesmas para os humanos, podendo ser utilizados como indicadores de contaminação ambiental deste parasita (DUBEY, 2004).

Uma das formas de infecção deste parasita é a toxoplasmose congênita que ocorre quando há a transmissão de *T. gondii* para o feto, quando a gestante se infecta pela primeira vez durante a gestação (MONTROYA ; LIESENFELD, 2004).

O isolamento de *T. gondii* em amostras biológicas confirma o diagnóstico da infecção e facilita a realização de testes diagnósticos que necessitam de altas quantidades de DNA do parasita para alcançarem resultados confiáveis. A caracterização genotípica de isolados de *T. gondii* por meio da PCR-RFLP é capaz de diferenciar e detectar a combinação dos alelos de diferentes arquétipos(SU, ZHANG, DUBEY, 2006). O Brasil possui alta diversidade entre as linhagens de *T. gondii*, sendo presentes em alguns isolados Tipo BrI, BrII, BrIII e BrIV consideradas clonais típicas do Brasil, sendo diferentes dos Tipos I, II e III identificadas na Europa e América do Norte (PENA et al., 2008).

Os isolados brasileiros são associados a alta virulência em camundongos, porém como nessa análise deve-se levar em conta a espécie estudada, não deve-se associar a presença de genótipos considerados virulentos, na avaliação em camundongos, com a presença de sintomatologia de toxoplasmose em outras espécies (DUBEY et al, 2002; DUBEY et al., 2007; PENA et al., 2008).

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *TOXOPLASMA GONDII*

A toxoplasmose é uma zoonose causada pelo *Toxoplasma gondii*, espécie pertencente ao Filo Apicomplexa; Levine, 1970, Classe Sporozoasida; Leukart, 1879, Subclasse Coccidiasina; Leukart, 1879, Ordem Eimeriorina; Leger, 1911, Família Toxoplasmatidae, Biocca, 1956 e Gênero Toxoplasma; Nicolle and Manceaux, 1909 (DUBEY, 2010). É um parasita intracelular obrigatório que tem ampla prevalência em seres humanos e em animais em todo o mundo (DUBEY, 2009).

*Toxoplasma gondii* apresenta três formas evolutivas, taquizoítos, esporozoítos e bradizoítos. Os taquizoítos medem aproximadamente 6 µm de comprimento e 2 µm de largura, encontrado durante a fase aguda da infecção, sendo também denominado forma proliferativa ou forma livre. Possui duas regiões distintas: a) uma extremidade anterior afilada onde está situado o complexo apical, formado por um conjunto de organelas específicas, responsável pela penetração ativa nas células nucleadas e pela formação de um vacúolo parasitóforo no citoplasma da célula parasitada b) um núcleo com membrana dupla, uma externa e contínua e outra interna (DOBROWOLSKI; SIBLEY, 1996). Os taquizoítos se

multiplicam rapidamente até a ruptura da célula e, em seguida, são disseminados livres pelo sistema linfático e sangüíneo infectando vários tecidos, incluindo o SNC, olhos, musculatura esquelética, cardíaca e placenta. O cisto tecidual contém os bradizoítos que são morfológicamente semelhantes aos taquizoítos, mas possuem uma replicação lenta, e são encontrados durante a fase crônica da infecção (FRENKEL, 1973), e oocistos que apresentam parede dupla bastante resistente às condições do meio ambiente, são formados exclusivamente nas células intestinais de felídeos. São eliminados não esporulados e no meio ambiente sofrem esporulação e apresentam dois esporocistos com quatro esporozoítos cada (FRENKEL, 1973).

A infecção por *T. gondii* raramente leva a sinais clínicos no hospedeiro, no entanto, a severidade da infecção, quando esta ocorre, está relacionada à espécie, idade do hospedeiro, prenhez, estado imunológico, condição nutricional, estágio e cepa do parasita e infecções concomitantes (LUFT; REMINGTON, 1992; DUBEY, 1994; DUBEY et al., 1994; LIESENFELD et al., 2001; DUBEY; JONES 2008).

Os hospedeiros podem adquirir a toxoplasmose pela ingestão de tecidos de animais contendo cistos, alimentos ou água contaminados com oocistos esporulados, ou por transmissão transplacentária. Após a ingestão, os bradizoítos ou esporozoítos são liberados e invadem o tecido intestinal, transformam-se em taquizoítos, multiplicam-se localmente por endodiogenia e se disseminam por todo o organismo pela via hematogena ou linfática (DUBEY et al. 2004).

Com o desenvolvimento da imunidade do hospedeiro, os taquizoítos encistam-se nos tecidos e a última geração destes darão origem aos bradizoítos, que se multiplicam lentamente no interior dos cistos teciduais. Estes cistos são

evidenciados em diversos órgãos, principalmente, no SNC, olhos, musculatura esquelética e cardíaca. Na maioria das espécies de hospedeiros intermediários estes cistos podem persistir por toda a vida (DUBEY et al. 2004).

## 2.2 GENOTIPAGEM E VIRULÊNCIA DE *TOXOPLASMA GONDII*

O genoma haplóide total do *T. gondii* contém 14 cromossomos e 7.793 genes, com um tamanho total de 63.495.144 pares de bases (KHAN et al, 2007). Existe apenas uma espécie de *Toxoplasma*, o *Toxoplasma gondii*, sendo assim as técnicas de diagnóstico molecular devem ser capazes de detectar polimorfismos em um único nucleotídeo (SNPs). Isso acontece na análise do polimorfismo de comprimento de fragmentos de DNA por meio da Reação da Polimerase em cadeia com posterior digestão enzimática com enzimas de restrição (PCR-RFLP) com visualização em gel de agarose (SIBLEY; BOOTHROYD, 1992; HOWE; SIBLEY, 1994).

Apesar de sua ampla distribuição mundial, a população de *T. gondii* sempre foi classificada como de baixa variabilidade genética com uma estrutura populacional altamente clonal quando analisados pela PCR-RFLP ou marcadores isoenzimáticos, principalmente do gene SAG2, sendo os isolados de humanos e animais da Europa e América do Norte classificados em uma das três linhagens genéticas, Tipo I, II e III, com diferenças genéticas em torno de 1% (SIBLEY, BOOTHROYD, 1992; DARDÉ, BOUTEILLE, PESTRE-ALEXANDRE, 1992; HOWE, SIBLEY, 1995; AJIOKA, FITZPATRICK, REITTER, 2001). Entretanto estudos com análises de microssatélites e polimorfismo de fragmentos de DNA gerados por enzimas de restrição sobre produtos amplificados pela reação em cadeia pela polimerase (PCR-RFLP *multilocus*) com isolados de humanos e animais da América

Central e do Sul, principalmente o Brasil, demonstraram a ampla variabilidade genética, com recombinação genética em relação aos tipos clonais (AJZENBERG et al., 2004; LEHMANN et al., 2004; KHAN et al., 2006; SU, ZHANG, DUBEY, 2006; DUBEY et al., 2007a,b).

A PCR-RFLP é a análise do polimorfismo dos fragmentos de DNA, devido à clivagem DNA, feita por enzimas de restrição, que reconhecem uma sequência específica de quatro a oito bases. Possui a capacidade de diferenciação dos alelos atípicos (u-1, u-2) e detecção da combinação dos alelos de diferentes arquétipos, além da facilidade de utilização e a alta resolução, similar ao sequenciamento genético (SU, ZHANG, DUBEY, 2006). Depois de clivadas, moléculas de DNA relacionadas, porém diferentes, quando analisadas por eletroforese em gel de agarose, possuem bandas de diferentes pesos moleculares (CLARK, RUSSEL, 1997). Essa alta resolução da PCR-RFLP é importante em estudos que objetivam rastrear o agente ou avaliar uma associação entre os aspectos clínicos da infecção com o tipo de cepa (AJZENBERG et al., 2002).

No Brasil os isolados foram se mostrando cada vez mais diferentes dos já estudados em outras partes do mundo, foram então inicialmente caracterizados como atípicos, ou seja, que não se enquadravam nos tipos clonais I, II e III. A caracterização de isolados brasileiros demonstra alta taxa de recombinação genética sendo possível verificar distinção entre as linhagens clonais presentes em outros países. Apesar desta recombinação, alguns isolados enquadram-se em tipos clonais específicos do Brasil como Tipo BrI, BrII, BrIII e BrIV (AJZENBERG et al., 2004; PENA et al., 2008).

A identificação genotípica das cepas isoladas por meio da Multiplex PCR-RFLP apresenta uma alta resolução em comparação a outras técnicas de

detecção molecular (KHAN et al., 2005). Essa alta resolução da PCR-RFLP é importante em estudos que objetivam rastrear o agente ou avaliar uma associação entre os aspectos clínicos da infecção com o tipo de cepa (AJZENBERG et al., 2002).

Para realização desta técnica são utilizados como controles cepas isoladas de diversos hospedeiros que têm características genótípicas distintas no tipos clonais I, II, III e atípicos. As cepas controles caracterizadas como Tipo I são: cepa RH (cérebro humano) e GT1 (músculo de cabra); as do Tipo II: Me-49 (músculo de ovelha), PTG (clone da Me-49); Tipo III: VEG (sangue humano) e CTG (oocistos de gato) além dos caracterizados como atípicos u-1 e u-2: TgCa1 (oocistos de puma), CatBr5 (tecido de gato) e MAS (tecidos fetais humanos) (SABIN, 1941; LUNDE and JACOBS, 1983; SABIN and WARREN 1942; DUBEY et al., 1996; DUBEY, 1980; ARAMINI et al., 1998; DUBEY et al., 2008; DUBEY et al., 2004; PFEFFERKORN et al., 1977; DARDÉ et al., 1992)

Os marcadores utilizados atualmente na PCR-RFLP são SAG1, SAG2, altSAG2, SAG3, BTUB, GRA6, C22-8, C29-2, L358, PK1, APICO (SU, ZHANG, DUBEY, 2006; PENA et al., 2008). A técnica consiste em analisar as sequências alvo de DNA que são previamente amplificadas pela PCR-Multiplex, nas quais utiliza-se primers externos de todos os marcadores, seguida de uma nested-PCR utilizando os primers internos em reações individuais para cada marcador. A digestão enzimática é feita com enzimas específicas para cada marcador conforme descrito na Tabela 1.

**Tabela 1. Primers internos e Externos Utilizados na Reação de Multilocus Nested PCR- RFLP. Enzimas de Restrição e condições de reação para cada marcador a ser avaliado.**

Marcadores	Primers Externos (multiplex PCR)*	Primers Internos (nested PCR)	PCR nest ed (bp)	Enzimas de restrição, Tampão Custmart tempo e temperatura de incubação e Concentração de Gel
<b>SAG1</b>	SAG1-Fext: GTTCTAACCACGCACCCTGAG SAG1-Rext2: AAGAGTGGGAGGCTCTGTGA	SAG1-S2: CAATGTGCACCTGTAGGAAGC SAG1-Rext: GTGGTTCTCCGTCGGTGTGAG	390	Sau96I + HaeII Custmart, 37°C 1 h. 2,5% gel.
<b>5'-SAG2</b>	Não necessita primers externos as sequências são reconhecidas pelos primers do alt.SAG2.	5-SAG2F: GAAATGTTTCAGGTTGCTGC 5-SAG2R: GCAAGAGCGAACTTGAACAC	242	MboI, Custmart, 37°C 1 h. 2,5% gel.
<b>3'-SAG2</b>	3'-SAG2-Fext: TCTGTTCTCCGAAGTGA CTCC 3'-SAG2-Rext: TCAAAGCGTGCATTATCGC	3-SAG2F: ATTCTCATGCCTCCGCTTC 3-SAG2R: AACGTTTCACGAAGGCACAC	222	HhaI, Custmart, 37°C 1 h. 2,5% gel.
<b>SAG3</b>	SAG3-Fext: CAACTCTACCA TTCCACCC SAG3-Rext: GCGCGTTGTTAGACAAGACA	P43S2: TCTTGTCGGGTGTTCACTCA P43AS2: CACAAGGAGACCGAGAAGGA	225	NciI, Custmart, 37°C 1 h. 2,5% gel.
<b>BTUB</b>	BTUB -Fext: TCCAAAATGAGAGAAATCGT BTUB -Rext: AAATTGAAATGACGGAAGAA	Btub-F: GAGGTCATCTCGGACGAACA BtubR: TTGTAGGAACACCCGGACGC	411	BsiEI + TaqI , Custmart, 60°C 1 h. 2,5% gel.
<b>GRA6</b>	GRA6-Fext: ATTTGTGTTTCCGAGCAGGT GRA6-Rext: GCACCTTCGCTTGTGGTT	GRA6-F1: TTTCCGAGCAGGTGACCT GRA6-R1x: TCGCCGAAGAGTTGACATAG	344	MseI (o,2µl), Custmart, 37°C 1 h. 2,5% gel.
<b>c22-8</b>	c22-8-Fext: TGATGCATCCATGCGTTTAT c22-8-Rext: CCTCCACTTCTTCGGTCTCA	C22-8F: TCTCTCTACGTGGACGCC C22-8R: AGGTGCTTGGATATTCGC	521	BsmAI + MboII ,Custmart, 37°C 30 min, 55°C 30min. 2,5% gel.
<b>c29-2</b>	c29-2-Fext: ACCCACTGAGCGAAAAGAAA c29-2-Rext: AGGGTCTCTTGCGCATACAT	C29-2F: AGTTCTGCAGAGTGTCGC C29-2R: TGTCTAGGAAAGAGGCGC	446	HpyCH4IV(o,2µl) + RsaI(o,2µl), Custmart , 37°C 1 h. 2,5% gel.
<b>L358</b>	L358-Fext: TCTCTCGACTTCGCCTCTTC L358-Rext: GCAATTTCTCGAAGACAGG	L358-F2: AGGAGGCGTAGCGCAAGT L358-R2: CCCTCTGGCTGCAGTGCT	418	HaeIII + NlaIII(o,2µl), Custmart, 37°C 1 h. 2,5% gel.
<b>PK1</b>	PK1-Fext: GAAAGCTGTCCACCCTGAAA PK1-Rext: AGAAAGCTCCGTGCAGTGAT	PK1-F: CGCAAAGGGAGACAATCAGT PK1-R: TCATCGCTGAATCTCATTGC	903	AvaI + RsaI, Custmart, 37°C 1 h. 2,5% gel.
<b>alt. SAG2</b>	alt. SAG2-Fext: GGAACGCGAACAATGAGTTT alt. SAG2-Rext: GCACTGTTGTCCAGGGTTT	SAG2-Fa: ACCCATCTGCGAAGAAAACG SAG2-Ra: ATTTGACCGAGCGGGAGCAC	546	HinfI + TaqI, Custmart, 37°C 30 min, 65°C 30 min. 2,5% gel.
<b>Apico</b>	Apico -Fext: TGGTTTTAACCCTAGATTGTGG Apico -Rext: AAACGGAATTAATGAGATTTGAA	Apico-F: TGCAAATTCTTGAATTCTCAGTT Apico-R: GGGATTCTGAACCCCTTGATA	640	AflIII(o,2µl) + DdeI(o,2µl), Custmart, 37°C 1 h. 3% gel

Fonte: SU et al., 2010.

### 2.3 VIRULÊNCIA DAS CEPAS DE *TOXOPLASMA GONDII*

Antes do desenvolvimento de marcadores genéticos, os isolados de *T. gondii* eram agrupados por sua virulência em camundongos isogênicos. Com base no RFLP Howe e Sibley (1995) classificaram *T. gondii* em três tipos genéticos (I, II, III) e virulência do camundongo ligada ao tipo genético. Eles propuseram que os isolados do tipo I eram letais para camundongos, independentemente da dose, e que os tipos II e III geralmente eram avirulentos para camundongos (HOWE et al., 1996).

Estudos conseguiram determinar por meio da inoculação de duas cepas diferentes em um mesmo felino que estas eram capazes de se recombinar e passar as características de virulência de uma delas para seus descendentes (PFEFFERKORN et al., 1983). Na grande maioria dos estudos verificou-se que a estrutura populacional de *T. gondii* é extremamente clonal, porém concomitantes em um mesmo animal pode levar a recombinações genéticas no epitélio intestinal dos hospedeiros definitivos causando a eliminação de oocistos com características recombinadas de duas cepas com características de virulência diferentes (GRIGG et al., 2001).

Su et al. (2002) afirmaram que a determinação de genes específicos dá suporte a característica de alta virulência as cepas do tipo I, pois estas possuem QTLs conservados nos cromossomos IV e VII, e não estão presentes em outras cepas. Um número pequeno de genes são únicos e conservados somente nessa linhagem.

A virulência das cepas analisadas sempre deve levar em consideração o animal que foi utilizado como modelo experimental, pois a virulência para camundongos não pode ser extrapolada para outras espécies, pois o comportamento biológico pode não ser igual em diferentes espécies (DUBEY, 2010).

Pena et al. (2008), estudando isolados no estado de São Paulo observaram linhagens clonais típicas do Brasil, denominadas de Tipo BrI, BrII, BrIII e BrIV, e com base na virulência para camundongos, o tipo BrI foi classificado como virulento, o tipo BrII e BrIV como virulentos intermediários e o tipo BrIII não virulento. Observou-se que a estrutura populacional do *T. gondii* no Brasil é altamente diversificada com algumas das linhagens clonais em diferentes áreas geográficas, além das diferenças biológicas destas linhagens.

Isolados brasileiros considerados virulentos em camundongos tiveram seus genótipos descritos também em outras espécies de animais e humanos. Nos animais, onde houve a caracterização genotípica destes genótipos porém não foi associado a sintomatologia aguda da toxoplasmose (DUBEY et al, 2002; DUBEY et al., 2007; PENA et al., 2008).

Uma das metodologias utilizadas para determinar a virulência em camundongos, leva em consideração a dose aplicada, pois analisa a curva de sobrevivência nos diferentes grupos. As três formas do parasita podem ser utilizadas em testes de virulência, porém estudos já demonstraram que camundongos inoculados via oral com oocistos são mais propensos a morrer em poucas semanas em comparação a animais infectados com a mesma quantidade de cistos teciduais. (DUBEY et al., 1981).

As vias de inoculação também apresentam importante influencia na determinação da virulência da cepa sendo as vias oral, subcutânea e intraperitoneal

as mais utilizadas (DUBEY; FRENKEL, 1973). A virulência pode ser influenciada por alterações fenotípicas decorrentes do número de passagens em animais ou em cultivo celular (HOWE; SIBLEY, 1994), desse modo deve-se dar preferência para as análises em isolados originais ou com um baixo número de repiques .

Linhagens de camundongos apresentam diferentes respostas frente a infecção por *T. gondii*. Diversos pesquisadores demonstraram a diferença entre camundongos inbred/ outbred; BALB/c; Swiss, C57BL/6, camundongos transgênicos ou knockout, tanto no desenvolvimento quanto a diferentes vias de inoculação (ARAUJO et al 1976; DUBEY et al., 2012; SUZUKI et al., 1993; McLEOD, et al., 1989).

Para a multiplicação dos taquizoítos para análise de virulência pode-se utilizar a passagem via intraperitoneal em camundongos, ou cultivo celular (DUBEY, 2010). Quando as análises levarem em consideração a dose aplicada essa metodologia de crescimento deve ser utilizada como forma de garantir quantidade e qualidade dos inóculos, pois garante grande quantidade de taquizoítos.

Apenas uma única dose não deve ser avaliada como determinante de virulência para cepas de *T. gondii*. Saraf et al. (2017) propõem que, após o isolamento e quando ainda está em um número baixo de passagens, deve-se retirar o líquido peritoneal inocular outro camundongo ou colocar para crescimento em cultivo celular; feito isso deve-se purificar os taquizoítos e proceder com a contagem em Câmara de Neubauer. O preparo deve considerar diluições seriadas entre  $10^1$  e  $10^4$  parasitas/ml, a via de inoculação também deve ser escolhida e mantida para todos os animais de todos os grupos. A análise do teste de virulência segue com avaliação dos camundongos para verificação de sinais clínicos e morte decorrentes da infecção, os que permanecerem vivos ao final de quatro semanas devem ser

avaliados sorologicamente para verificação de soroconversão. Análise pode ser feita por taxa de sobrevivência (Kaplan-Meier) e também pelo cálculo da mortalidade acumulada, que leva em conta os animais mortos e os com sorologia positiva contra *T. gondii*.

Hill e Dubey (2013), acreditam que a determinação da quantidade de DNA nos tecidos de animais submetidos ao bioensaio, seja suficiente e comparável com os ensaios de mortalidade. nesse modelo os animais seriam eutanasiados em 3, 5 e 7 dias pós-inoculação e teriam seus órgãos analisados e se detectada quantidade de DNA teriam sua virulência determinada, porém só é possível verificar a fase aguda, não sendo determinante para cepas com características de virulência intermediária de cepas não virulentas.

#### 2.4 TOXOPLASMOSE EM HUMANOS

A infecção em indivíduos imunocompetentes é em sua maioria assintomática, casos onde ocorre febre e linfadenite assemelham-se com sinais ligados a outras infecções, em alguns casos ocorre a manifestação ocular da doença. (HOLLAND, 2004). Em imunocomprometidos como pacientes com AIDS a reativação de infecções crônicas pode levar a encefalite e morte (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; DUBEY, 2010).

A toxoplasmose congênita apresenta-se de várias formas, grave quando ocorre morte fetal ou natimortalidade, ou quando há sinais e sintomas graves observados logo ao nascimento, ainda podem ocorrer nascimento de crianças infectadas sem presença de sinais ou sintomas, sendo descoberto a infecção congênita apenas em fases pré-escolar e adolescência (REMINGTON et al., 2006). A Tétrade de Sabin (SABIN; WARREN, 1942) é conhecida como as

características que afetam o feto tais como corioretinite, calcificações intracranianas, macro ou microcefalia e retardo mental.

Lesões oculares variam em severidade devido à duração da infecção e da intensidade inflamatória, podendo ser tanto unilaterais como bilaterais, com reativação em 80% dos casos (CENCI-COGA et al., 2011). Garcia et al. (1999), avaliando uma comunidade rural verificaram que indivíduos com anticorpos anti-*T.gondii* tinham 2,06 vezes mais chances de apresentarem problemas oculares frente a indivíduos soronegativos. Estudos realizados em áreas endêmicas com pacientes acompanhados por vários anos após exposição inicial ao *T. gondii* afirmam que a doença ocular pode ocorrer vários anos após a infecção sistêmica por este parasita (ARANTES et al., 2015).

Muitas vezes o diagnóstico sorológico das gestantes é dificultado pela falta de informação correta dos profissionais de saúde responsáveis pelo acompanhamento pré-natal destas mulheres, fazendo com que crianças infectadas acabem nascendo e não recebendo acompanhamento adequado, problemas que também ocorrem em mulheres que não realizam o pré-natal. Programas de triagem para toxoplasmose gestacional foram desenvolvidos para padronizar condutas para que as gestantes recebam acompanhamento e quando necessário tratamento para evitar maiores prejuízos nas crianças infectadas durante seu desenvolvimento fetal (MITSUKA-BREGANÓ ; LOPES-MORI, NAVARRO, 2010).

## 2.5 TOXOPLASMOSE EM ANIMAIS

Resultados de estudos envolvendo *T. gondii* no Brasil foram compilados no artigo de Dubey et al. (2012), e de acordo com as análises em sua

maioria sorológica, demonstraram alta prevalência em diversas espécies de animais estudadas, bem como verificou-se que a infecção está distribuída pelo país.

No Brasil, grande parte do rebanho suíno apresenta anticorpos IgG anti- *T. gondii* e diversos estudos realizados nestes animais apresentam características genóticas não compatíveis com os tipos clonais já descritos para *T. gondii* (BELFORT-NETO et al., 2007; BEZERRA et al., 2012). Parasitas viáveis já foram isolados de amostras de carne suína, obtidas em abatedouros e também em produtos prontos para o consumo humano preparados com carne suína contaminada, o que reforça a associação com o risco de adquirir a infecção por meio desse consumo (VIDOTO et al., 1990; NAVARRO et al., 1992). Diversos autores já determinaram que a ingestão desses produtos é uma das principais vias de transmissão (DUBEY et al., 2005; COOK et al., 2000). A diversidade genética do *T. gondii* foi verificada por Miura et al.(2019), que avaliaram suínos de dois abatedouros que recebiam animais dos estados brasileiros de Santa Catarina e Paraná e obtiveram 18 isolados, dos quais 14 foi possível a identificação completa dos marcadores e identificação do genótipo descrito como ToxoDB #206, sendo que até o momento do estudo não havia identificação deste genótipo nesta espécie no Brasil.

Estudos de genotipagem têm sido realizados em diversos estados brasileiros visando caracterizar a diversidade genética presente no país. Em um estudo realizado em duas cidades do Estado da Bahia, observou que os genótipos encontrados em isolados de amostras de cães não eram dos tipos clonais I, II e III, nem dos tipos clonais mais descritos no Brasil como BrI, BrII, BrIII e BrIV, todos apresentavam características genéticas distintas, porém com isolados já descritos em outras regiões e hospedeiros no Brasil (SILVA et al., 2017).

Em São Paulo, cães provenientes do centro de Zoonoses, após eutanásia e confirmação sorológica de anticorpos anti-*T.gondii* tiveram seus órgãos processados e inoculados em camundongos a fim de verificar isolamento e virulência de cepas, obtiveram 19 isolados e foi possível identificar 12 genótipos diferentes. Alta virulência foi verificada em 5 isolados, que foram letais para 100% dos animais inoculados (DUBEY et al., 2007)

Dubey et al. (2012) relatam que diversas pesquisas foram realizadas no Brasil utilizando galinhas como indicadores de contaminação ambiental. Animais positivos na análise do MAT foram submetidos a bioensaio e os órgãos analisados são passíveis de isolamento dos parasitas. Garcia et al. (2000), demonstraram que galinhas de propriedades rurais, apresentavam sorologia positiva para *T.gondii* indicando o risco de infecção para os humanos e outros animais, quando do consumo da carne desses animais infectados.

Em diversos estados brasileiros são realizados estudos utilizando galinhas para verificar a infecção e diversidade genotípica além da análise de fatores de risco para a doença. Vieira et al. (2018) avaliando 386 galinhas caipiras distribuídas em 24 propriedades de 11 cidades do norte do Paraná verificaram resultados positivos para anticorpos anti- *T. gondii* em 119 amostras, 38 amostras positivas no bioensaio e 18 isolados distribuídos em dez genótipos , sendo seis já descritos no ToxoDB, e quatro genótipos não descritos anteriormente. No Rio Grande do Sul, Camillo et al., (2018), verificaram que 49,2% (294/597) dos animais eram positivos para análises de anticorpos anti-*T.gondii*, além de verificar que esses animais estavam distribuídos em 74 propriedades das quais 79,7% (59) foi reportada a presença de gatos domésticos.

Alta prevalência sorológica é relatada nos rebanhos bovinos, porém o isolamento de taquizoítos viáveis, são raros no mundo todo, incluindo o Brasil, em alguns casos é possível o isolamento em amostras de fetos, obtidos em abatedouros (DUBEY et al, 2012). Macedo et al. (2012) avaliando vacas penhas em abatedouros obtiveram dois isolados de *T.gondii* sendo que um deles foi pela primeira vez descrita no Brasil em bovinos, identificada como sendo uma cepa do Tipo II, a sorologia das amostras revelou positividade em 48.3% (29/60), neste estudo os isolados obtidos através do bioensaio foram um de vaca prenha e de um feto.

Romanelli et al. (2007) verificou 51.4% (157/305) de prevalência para anticorpos anti-*T. gondii* em ovinos da região de Guarapuava e analisando fatores de risco das propriedades verificou que onde era permitido o acesso dos gatos ao depósito de comida a prevalência dos anticorpos do animais era maior. Silva et al. (2011) analisando materiais de ovinos da Região de Botucatu identificou um total de nove genótipos em 13 isolados, sendo que destes quatro foram considerados atípicos e dois pertencente a linhagem clonal Tipo II, as análises sorológicas demonstraram anticorpos anti- *T. gondii* em 66/602 (11%) das amostras analisadas.

A contaminação ambiental por *T. gondii* pode ser analisada pela presença de anticorpos nos animais testados que convivem em nestes determinados ambientes. Locais com limpeza e organização precárias como são os locais de reciclagem são locais onde os ratos podem ser encontrados e capturados afim de verificar a contaminação destes ambientes, porém diversos pesquisadores já verificaram que como há uma diversidade biológica entre as espécies de ratos, mas que são indicadores da presença da contaminação por oocistos. (MURADIAN et al.,2012; ARAUJO et al. 2010). Ruffolo et al. (2016) isolaram por meio de bioensaio

quatro amostras provenientes de roedores da espécie *Rattus rattus*, a análise sorológica foi um método utilizado porém dois isolados foram de animais negativos na sorologia e dois com presença de anticorpos anti-*T.gondii*. Foram identificados os genótipos #21 e 14# sendo já descritos no Brasil em outras espécies.

## REFERENCIAS

- AJZENBERG, D., BAÑULS, A. L., SU, C., DUMÈTRE, A., DEMAR, M., CARME, B., & DARDÉ, M. L. (2004). Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, *34*(10), 1185–1196. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.06.007>
- AJZENBERG, DANIEL, COGNE, N., PARIS, L., BESSIERES, M.-H., THULLIEZ, P., FILISETTI, D., ... DARDE, M.-L. (2002). Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. **The Journal of Infectious Diseases**, *186*(5), 684–689. <https://doi.org/10.1086/342663>
- ARAMINI, J. J., STEPHEN, C., & DUBEY, J. P. (1998). *Toxoplasma gondii* in Vancouver Island cougars (*Felis concolor vancouverensis*): serology and oocyst shedding. **The Journal of Parasitology**, *84*(2), 438–440.
- ARANTES, T. E. F., SILVEIRA, C., HOLLAND, G. N., MUCCIOLI, C., YU, F., JONES, J. L., ... BELFORT, R. (2015). Ocular involvement following postnatally acquired *Toxoplasma gondii* infection in southern Brazil: A 28-year experience. **American Journal of Ophthalmology**, *159*(6), 1002-1012.e2.
- ARAÚJO, F. G., WILLIAMS, D. M., GRUMET, F. C., & REMINGTON, J. S. (1976). Strain-dependent differences in murine susceptibility to *Toxoplasma*. **Infect Immun**, *13*(5), 1528–1530.
- BELFORT-NETO, R., NUSSENBLATT, V., RIZZO, L., MUCCIOLI, C., SILVEIRA, C., NUSSENBLATT, R., ... BELFORT, R. J. (2007). High prevalence of unusual genotypes of *Toxoplasma gondii* infection in pork meat samples from Erechim, Southern Brazil. **Anais Da Academia Brasileira de Ciencias**, *79*(1), 111–114.
- BEZERRA, R. A., CARVALHO, F. S., GUIMARAES, L. A., ROCHA, D. S., MACIEL, B. M., WENCESLAU, A. A., ... ALBUQUERQUE, G. R. (2012). Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs intended for human consumption in Brazil. **Veterinary Parasitology**, *189*(2–4), 153–161.
- CAMILLO, G., MACHADO, M. E. A., WEBER, A., CADORE, G. C., MENEZES, F. R., PARDINI, L., ... VOGEL, F. S. F. (2018). Prevalência de anticorpos e fatores de risco associados à infecção por *Toxoplasma gondii* em galinhas domésticas da zona rural de Santa Maria, Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, *38*(7), 1351–1357.
- CENCI-GOGA, B. T., ROSSITTO, P. V, SECHI, P., MCCRINDLE, C. M. E., & CULLOR, J. S. (2011). *Toxoplasma* in animals, food, and humans: an old parasite of new concern. **Foodborne Pathogens and Disease**, *8*(7), 751–762.
- COOK, A. J., GILBERT, R. E., BUFFOLANO, W., ZUFFEREY, J., PETERSEN, E.,

JENUM, P. A., ... DUNN, D. T. (2000). Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. **BMJ (Clinical Research Ed.)**, 321(7254), 142–147.

DA SILVA, J. R., MACIEL, B. M., DE SANTANA SOUZA SANTOS, L. K. N., CARVALHO, F. S., ROCHA, D. DE S., GOMES LOPES, C. W., & ALBUQUERQUE, G. R. (2017). Isolation and Genotyping of *Toxoplasma gondii* in Brazilian Dogs. **KOREAN JOURNAL OF PARASITOLOGY**, 55(3), 239–246.

DARDE, M. L., BOUTEILLE, B., & PESTRE-ALEXANDRE, M. (1992). Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. **The Journal of Parasitology**, 78(5), 786–794.

DOBROWOLSKI, J. M., & SIBLEY, L. D. (1996). *Toxoplasma* Invasion of Mammalian Cells Is Powered by the Actin Cytoskeleton of the Parasite. **Cell**, 84(6), 933–939.

DUBEY, J. (2010). **Toxoplasmosis of Animals and Humans**. BioMed Central.

DUBEY, J. P. (1980). Mouse pathogenicity of *Toxoplasma gondii* isolated from a goat. **American Journal of Veterinary Research**, 41(3), 427–429.

DUBEY, J. P. (1981). Prevention of abortion and neonatal death due to toxoplasmosis by vaccination of goats with the nonpathogenic coccidium *hammondia hammondi*. **American Journal of Veterinary Research**, 42(12), 2155–2157.

DUBEY, J. P. (2009). History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, 39(8), 877–882.

DUBEY, J. P., BAKER, D. G., DAVIS, S. W., URBAN, J. F. J., & SHEN, S. K. (1994). Persistence of immunity to toxoplasmosis in pigs vaccinated with a nonpersistent strain of *Toxoplasma gondii*. **American Journal of Veterinary Research**, 55(7), 982–987.

DUBEY, J. P., FERREIRA, L. R., MARTINS, J., & MCLEOD, R. (2012). Oral oocyst-induced mouse model of toxoplasmosis: effect of infection with *Toxoplasma gondii* strains of different genotypes, dose, and mouse strains (transgenic, out-bred, in-bred) on pathogenesis and mortality. **Parasitology**, 139(1), 1–13.

DUBEY, J. P., & FRENKEL, J. K. (1973). Experimental toxoplasma infection in mice with strains producing oocysts. *The Journal of Parasitology*, 59(3), 505–512.

DUBEY, J. P., GRAHAM, D. H., BLACKSTON, C. R., LEHMANN, T., GENNARI, S. M., RAGOZO, A. M. A., ... THULLIEZ, P. (2002). Biological and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from São Paulo, Brazil: unexpected findings. **International Journal for Parasitology**, 32(1), 99–105.

DUBEY, J. P., GRAHAM, D. H., DE YOUNG, R. W., DAHL, E., EBERHARD, M. L., NACE, E. K., ... LEHMANN, T. (2004). Molecular and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from wildlife in the United States. **JOURNAL OF**

**PARASITOLOGY**, 90(1), 67–71.

DUBEY, J. P., HILL, D. E., JONES, J. L., HIGHTOWER, A. W., KIRKLAND, E., ROBERTS, J. M., ... OTHERS. (2005). Prevalence of viable *Toxoplasma gondii* in beef, chicken, and pork from retail meat stores in the United States: risk assessment to consumers. **Journal of Parasitology**, 91(5), 1082–1093.

DUBEY, J. P., & JONES, J. L. (2008). *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **International Journal for Parasitology**, 38(11), 1257–1278.

DUBEY, J. P., LUNNEY, J. K., SHEN, S. K., KWOK, O. C. H., ASHFORD, D. A., & THULLIEZ, P. (1996). Infectivity of Low Numbers of *Toxoplasma gondii* Oocysts to Pigs. *The Journal of Parasitology*, 82(3), 438–443. Retrieved from

DUBEY, J. P., NAVARRO, I. T., SREEKUMAR, C., DAHL, E., FREIRE, R. L., KAWABATA, H. H., ... LEHMANN, T. (2004). *Toxoplasma Gondii* Infections in Cats From Paraná, Brazil: Seroprevalence, Tissue Distribution, and Biologic and Genetic Characterization of Isolates. **Journal of Parasitology**, 90(4), 721–726.

DUBEY, J. P., PARNELL, P. G., SREEKUMAR, C., VIANNA, M. C. B., DE YOUNG, R. W., DAHL, E., & LEHMANN, T. (2004). Biologic and molecular characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from striped skunk (*Mephitis mephitis*), Canada goose (*Branta canadensis*), black-winged lory (*Eos cyanogenia*), and cats (*Felis catus*). **JOURNAL OF PARASITOLOGY**, 90(5), 1171–1174.

DUBEY, J. P., SUNDAR, N., GENNARI, S. M., MINERVINO, A. H. H., FARIAS, N. A. D. R., RUAS, J. L., ... SU, C. (2007). 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. **Veterinary Parasitology**, 143(2), 182–188.

DUBEY, J. P., VELMURUGAN, G. V., CHOCKALINGAM, A., PENA, H. F. J., DE OLIVEIRA, L. N., LEIFER, C. A., ... SU, C. (2008). Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil. **Veterinary Parasitology**, 157(3–4), 299–305.

GARCIA, J. L., NAVARRO, I. T., OGAWA, L., & MARANA, E. R. M. (2000). Soroprevalência do *Toxoplasma gondii* em galinhas (*Gallus gallus domesticus*) de criações domésticas, oriundas de propriedades rurais do Norte do Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, 30(1), 123–127.

GARCIA, J. L., NAVARRO, I. T., OGAWA, L., OLIVEIRA, R. C. DE, & KOBILKA, E. (1999). Soroprevalência, epidemiologia e avaliação ocular da toxoplasmose humana na zona rural de Jaguapitã (Paraná), Brasil. **Revista Panamericana de Salud Pública**, 6(3), 157–163.

GONCALVES VIEIRA, F. E., SASSE, J. P., MINUTTI, A. F., MIURA, A. C., DE BARROS, L. D., CARDIM, S. T., ... GARCIA, J. L. (2018). *Toxoplasma gondii*: prevalence and characterization of new genotypes in free-range chickens from south

Brazil. **PARASITOLOGY RESEARCH**, 117(3), 681–688.

GRIGG, M. E., BONNEFOY, S., HEHL, A. B., SUZUKI, Y., & BOOTHROYD, J. C. (2001). Success and virulence in toxoplasma as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. **SCIENCE**, 294(5540), 161–165.

HILL, D. E., & DUBEY, J. P. (2013). Toxoplasma gondii prevalence in farm animals in the United States. **International Journal for Parasitology**, 43(2), 107–113. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.09.012>

HOLLAND, G. N. (2004). Ocular toxoplasmosis: A global reassessment: Part II: Disease manifestations and management. **American Journal of Ophthalmology**, 137(1), 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2003.10.032>

HOWE, D. K., & SIBLEY, L. D. (1994). Toxoplasma gondii: analysis of different laboratory stocks of the RH strain reveals genetic heterogeneity. *Experimental Parasitology*, 78(2), 242–245.

KHAN, A., TAYLOR, S., SU, C., MACKEY, A. J., BOYLE, J., COLE, R., ... SIBLEY, L. D. (2005). Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of Toxoplasma gondii. *Nucleic Acids Research*, 33(9), 2980–2992.

KHAN, A., TAYLOR, S., SU, C., SIBLEY, L. D., PAULSEN, I., & AJIOKA, J. W. (2007). Genetics and genome organization of Toxoplasma gondii. In J. W. Ajioka & D. Soldati (Eds.), **Toxoplasma** (pp. 193–207). Horizon Bioscience.

LIESENFELD, O., MONTOYA, J. G., KINNEY, S., PRESS, C., & REMINGTON, J. S. (2001). Effect of testing for IgG avidity in the diagnosis of Toxoplasma gondii infection in pregnant women: experience in a US reference laboratory. **The Journal of Infectious Diseases**, 183(8), 1248–1253. <https://doi.org/10.1086/319672>

LUFT, B. J., & REMINGTON, J. S. (1992). Toxoplasmic encephalitis in AIDS. **Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, 15(2), 211–222.

LUNDE, M. N., & JACOBS, L. (1983). Antigenic Differences between Endozoites and Cystozoites of Toxoplasma gondii. **The Journal of Parasitology**, 69(5), 806–808.

MACEDO, M. F. S. B. DE, MACEDO, C. A. B. DE, EWALD, M. P. DE C., MARTINS, G. F., ZULPO, D. L., CUNHA, I. A. L. DA, ... GARCIA, J. L. (2012). Isolation and genotyping of Toxoplasma gondii from pregnant dairy cows (Bos taurus) slaughtered. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 21(1), 74–77.

MCLEOD, R., FRENKEL, J. K., ESTES, R. G., MACK, D. G., EISENHAUER, P. B., & GIBORI, G. (1988). Subcutaneous and intestinal vaccination with tachyzoites of Toxoplasma gondii and acquisition of immunity to peroral and congenital toxoplasma challenge. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, 140(5), 1632–1637.

MIURA, A. C., BARROS, L. D. DE, FERREIRA, F. P., MAURICIO, J., NETO, F.,

- FRANCO, P. M. L. S., ... GARCIA, J. L. (2019). Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolated from pigs for human consumption, **Parasitology Research**, 118 (5) 1593–1599.
- MONTOYA, J. G., & LIESENFELD, O. (2004). Toxoplasmosis. *Lancet (London, England)*, 363(9425), 1965–1976.
- MURADIAN, V., FERREIRA, L. R., LOPES, E. G., ESMERINI, P. DE O., PENA, H. F. DE J., SOARES, R. M., & GENNARI, S. M. (2012). A survey of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection in urban rodents from Brazil. **The Journal of Parasitology**, 98(1), 128–134.
- NAVARRO, I. T., VIDOTTO, O., GIRALDI, N., & FREIRE, R. L. (1992). *Toxoplasma gondii* isolamento a partir de carne e cérebro de suínos comercializados na região de Londrina--PR. **Semina: Ciências Agrárias**, 13(1), 32–34.
- PENA, H. F. J., GENNARI, S. M., DUBEY, J. P., & SU, C. (2008). Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International Journal For Parasitology**, 38(5), 561–569.
- PFEFFERKORN, E. R., PFEFFERKORN, L. C., & COLBY, E. D. (1977). Development of gametes and oocysts in cats fed cysts derived from cloned trophozoites of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Parasitology**, 63(1), 158–159.
- REGINA MITSUKA-BREGANÓ, FABIANA MARIA RUIZ LOPES-MORI, & ITALMAR TEODORICO NAVARRO. (2010). ***Toxoplasmose adquirida na gestação e congênita.***
- ROMANELLI, P. R., FREIRE, R. L., VIDOTTO, O., MARANA, E. R. M., & OGAWA, L. (2007). Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in sheep ´ State , Brazil and dogs from Guarapuava farms , Parana. **Research in Veterinary Science** 82, 202–207.
- RUFFOLO, B. B., TOLEDO, R. DOS S., MARTINS, F. D. C., BUGNI, F. M., DA COSTA, L., MARANA, E. R. M., ... FREIRE, R. L. (2016). Isolation and genotyping of *toxoplasma gondii* in seronegative urban rats and presence of antibodies in communicating dogs in Brazil. **Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, 58(1), 1–6.
- SABIN, A. B., & WARREN, J. (1942). Therapeutic Effectiveness of Certain Sulfonamides on Infection by an Intracellular Protozoon (*Toxoplasma*). **Experimental Biology and Medicine**, 51(1), 19–23.
- SARAF, P., SHWAB, E. K., DUBEY, J. P., & SU, C. (2017). On the determination of *Toxoplasma gondii* virulence in mice. **Experimental Parasitology**, 174, 25–30.
- SIBLEY, L. D., & BOOTHROYD, J. C. (1992). Construction of a molecular karyotype for *Toxoplasma gondii*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 51(2), 291–300.
- SILVA, R. C. DA, LANGONI, H., SU, C., & SILVA, A. V. DA. (2011). Genotypic

characterization of *Toxoplasma gondii* in sheep from Brazilian slaughterhouses: New atypical genotypes and the clonal type II strain identified. **Veterinary Parasitology**, 175(1–2), 173–177.

SILVEIRA, C., MUCCIOLI, C., HOLLAND, G. N., JONES, J. L., YU, F., DE PAULO, A., & BELFORT, R. (2015). Ocular involvement following an epidemic of *Toxoplasma gondii* infection in Santa Isabel do Ivaí, Brazil. **American Journal of Ophthalmology**, 159(6), 1013–1021.e3.

SU, C. L., HOWE, D. K., DUBEY, J. P., AJIOKA, J. W., & SIBLEY, L. D. (2002). Identification of quantitative trait loci controlling acute virulence in *Toxoplasma gondii*. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America**, 99(16), 10753–10758.

SU, C., ZHANG, X., & DUBEY, J. P. (2006). Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: A high resolution and simple method for identification of parasites. **International Journal for Parasitology**, 36(7), 841–848.

SUZUKI, Y., ORELLANA, M. A., WONG, S. Y., CONLEY, F. K., & REMINGTON, J. S. (1993). Susceptibility to chronic infection with *Toxoplasma gondii* does not correlate with susceptibility to acute infection in mice. **Infection and Immunity**, 61(6), 2284–2288.

TENTER, A. M., HECKEROTH, A. R., & WEISS, L. M. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, 30(12–13), 1217–1258.

VIDOTTO, O., NAVARRO, I. T., MITSUKA, R., & FREIRE, R. L. (1990). Estudos epidemiológicos da toxoplasmose em suínos da região de Londrina--PR. **Semina: Ciências Agrárias**, 11(1), 53–59.

### 3 OBJETIVO

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar genética e biologicamente isolados de *Toxoplasma gondii* no Brasil.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Genotipar cepas isoladas de *T. gondii* de diversas espécies de animais e humanos isolados e armazenados no Laboratório de Protozoologia.
- Avaliar a virulência das cepas isoladas em camundongos suíços albinos.

## 4 ARTIGO A

**Caracterização genotípica e biológica de isolados de *Toxoplasma gondii*****RESUMO**

O isolamento de *Toxoplasma gondii* por meio de bioensaio em camundongos é bastante utilizada no mundo todo para auxiliar no diagnóstico da infecção e é necessário para estudos de patogenia e virulência de cepas do parasita quanto a amostras humanas, animais ou ambientais. Este trabalho teve por objetivo caracterizar genotipicamente 13 isolados no laboratório de Protozoologia da Universidade Estadual de Londrina e determinar a virulência em camundongos. A virulência foi avaliada após retirada de exsudato peritoneal de camundongos previamente inoculados contendo taquizoítos do parasita, foram submetido a diluição de  $10^3$  taquizoítos por mL e posteriormente re-inoculados em camundongos por via intraperitoneal. A caracterização genotípica dos isolados foi realizada pela PCR-RFLP, utilizando os 11 marcadores genéticos (SAG1, 5'-3'SAG2, alt. SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico), e clivados com enzimas de restrição. Os resultados demonstraram a presença dos genótipos #21, #65, #166 nas amostras analisadas, e dois genótipos ainda não descritos no ToxoDB. Quanto a virulência, das 13 cepas analisadas somente duas não tiveram características semelhantes a cepa RH, sendo que a RAT61-2 e a BrHuMg2 tiveram mortalidade de 20% e 60% respectivamente. As análises genotípicas confirmam a diversidade dos isolados brasileiros e alta virulência dos isolados brasileiros.

Palavras-chave: camundongos suíços albinos; genotipagem; PCR-RFLP; curva de sobrevivência; toxoplasmose

## Genotypic and biological characterization of *Toxoplasma gondii* isolates

### ABSTRACT

The isolation of *Toxoplasma gondii* using bioassay in mice is widely used worldwide to assist in the diagnosis of infection and is necessary for studies of pathogenesis and virulence of strains of the parasite in humans, animals or environmental samples. This study aimed to characterize 13 isolates genotypically in the Protozoology laboratory of the State University of Londrina and to determine virulence in mice. Virulence was assessed after removal of peritoneal exudate from previously inoculated mice containing tachyzoites from the parasite, were subjected to dilution of 10<sup>3</sup> tachyzoites per mL and subsequently re-inoculated into mice intraperitoneally. The genotypic characterization of the isolates was performed by PCR-RFLP, using the 11 genetic markers (SAG1, 5'-3'SAG2, alt. SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico ), and cleaved with restriction enzymes. The results demonstrated the presence of genotypes # 21, # 65, # 166 in the analyzed samples, and two genotypes not yet described in ToxoDB. As for virulence, of the 13 strains analyzed, only two did not have characteristics similar to the RH strain, with RAT61-2 and BrHuMg2 having mortality rates of 20% and 60% respectively. Genotypic analyzes confirm the diversity of Brazilian isolates and the high virulence of Brazilian isolates.

Keywords: Swiss albino mice; genotyping; PCR-RFLP; survival curve; toxoplasmosis

## INTRODUÇÃO

O Brasil possui alta diversidade entre as linhagens de *Toxoplasma gondii*, sendo identificadas em alguns isolados cepas Tipo BrI, BrII, BrIII e BrIV consideradas clonais típicas do Brasil, e são diferentes do Tipo I, II e III identificadas na Europa e América do Norte (PENA et al., 2008; SHWAB et al., 2016) A caracterização genotípica de isolados de *T. gondii* por meio da PCR-RFLP é capaz de detectar da combinação dos alelos de diferentes arquétipos (SU, ZHANG, DUBEY, 2006).

A virulência de isolados brasileiros testada em camundongos apresentou alta virulência. Como essas características biológicas devem ser avaliadas de acordo com a espécie estudada essa virulência pode não refletir o comportamento desses genótipos em outras espécies (DUBEY et al, 2002; DUBEY et al., 2007; PENA et al., 2008).

O objetivo desse trabalho foi caracterizar genotipicamente isolados de *T. gondii* obtidos de amostras de animais e humanos e avaliar a virulência em camundongos suíços albinos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### ***Animais***

Foram utilizados camundongos fêmeas suíços albinos com 45 dias de vida. Os animais foram mantidos em gaiolas com água e ração *ad libitum*. O projeto foi analisado e APROVADO pela Comissão de Ética No Uso de Animais nos seguintes números de protocolos: CEUA n°6911.2015.87; CEEA n°118/09; CEUA n°5943.2012.85; CEEA 8 n°35/08; CEEA n°39/08; CEUA n°4153.2017.55.

### ***Cepas de Toxoplasma gondii***

Foram utilizadas amostras previamente isoladas através de bioensaio em estudos realizados no laboratório de Protozoologia da Universidade Estadual de Londrina no período de 1988-2018, conforme Tabela 1. As amostras foram mantidas em nitrogênio líquido desde o isolamento até a realização dos testes. Foram descongeladas a 37°C, centrifugadas e ressuspensas em solução fisiológica 0,85% e inoculadas em camundongos para proliferação dos taquizoítos previamente à análise de virulência, incluindo a cepa RH como controle.

### **Teste de Virulência**

Taquizoítos retirados do líquido peritoneal foram centrifugados e ressuspensos em 1mL de salina estéril. As contagens foram realizadas em câmara de Neubauer e o inóculo foi calculado para  $10^3$  taquizoítos por animal (SARAF et al., 2017)

Para cada cepa analisada foram utilizados de três a cinco animais, que foram observados duas vezes ao dia para verificação de sinais clínicos da

doença, aqueles que apresentavam sinais evidentes eram eutanasiados. Os animais que sobreviveram após 45 dias de inoculação foram eutanasiados e tiveram seu cérebro analisado microscopicamente quanto a presença de cistos cerebrais por meio da visualização de parte do cérebro entre lâmina e lamínula. O soro foi analisado para a presença de anticorpos IgG anti- *T. gondii* através da reação de imunofluorescência indireta (CAMARGO, 1964).

### **Extração de DNA**

A extração de DNA de taquizoítos foi realizada conforme técnica descrita por Garcia et al. (2006). Após a homogeneização da amostra, 300µL da amostra foi transferida para um microtubo com igual volume de tampão de extração (200nM NaCl, 20nM Tris, 50mM EDTA, proteinase K 1mg/ml e 2%SDS) e incubada a 56°C por 1 hora. Em seguida, foi adicionado 500µL de fenol tamponado e centrifugado a 13.000g por 5 minutos. A fase aquosa foi transferida para outro tubo com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico e centrifugado novamente a 13.000g por 5 minutos. A precipitação foi realizada com acetato de sódio e etanol.

### **PCR-RFLP**

A caracterização genotípica dos isolados foi realizada utilizando 11 marcadores genéticos, SAG1, 5'-3'SAG2, alt. SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico, conforme previamente descrito (SU, ZHANG, DUBEY, 2006, PENA et al., 2008).

Foram utilizados os seguintes controles cepas do Tipo I : cepa RH (cérebro humano), GT1 (músculo de cabra); as do Tipo II: Me-49 (músculo de ovelha), PTG (clone da Me-49); Tipo III: VEG (sangue humano) e CTG (oocistos de

gato) além dos caracterizados como atípicos u-1 e u-2: TgCa1 (oocistos de puma), CatBr5 (tecido de gato) e MAS (tecidos fetais humanos) (SABIN, 1941; LUNDE and JACOBS, 1983; SABIN and WARREN 1942; DUBEY et al., 1996; DUBEY, 1980; ARAMINI et al., 1998; DUBEY et al., 2008; DUBEY et al., 2004; PFEFFERKORN et al., 1977; DARDÉ et al., 1992).

As sequencias alvo do DNA foram primeiramente amplificadas pela PCR-multiplex, com primers externos de todos os marcadores, seguida de uma PCR-nested, utilizando primers internos individualmente para cada marcador. A reação da PCR-multiplex foi realizada em 25µL, 10x tampão de PCR, 25mM de MgCl<sub>2</sub>, 2,5mM de cada dNTP, 0,3µM de cada primer, 1,25U de platinum Taq-DNA polimerase (Invitrogen, EUA), 2µL de DNA e água ultrapura. Foi utilizada a seguinte programação: 95°C por 4 minutos para desnaturação inicial, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos para desnaturação, 55°C por 1 minuto para anelamento e 72°C por 2 minutos para extensão e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. A reação da PCR-nested foi realizada da mesma forma como descrito acima, com as seguintes características de programação: 95°C por 4 minutos para desnaturação inicial, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos para desnaturação, 60°C por 1 minuto para anelamento e 72°C por 1 minuto e 30 segundos para extensão e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Em seguida, os produtos da PCR-nested foram clivados por meio de enzimas de restrição e condições de temperatura e tempo específicos para cada marcador (SU, ZHANG, DUBEY, 2006). Para cada reação, 3µL do produto da PCR-nested foi adicionado com 17µL de reação de digestão, contendo Tampão Cutsmart e uma unidade de cada enzima.

Todos os produtos foram visualizados sobre luz UV depois de realizada eletroforese em gel de agarose 2,5 ou 3%, dependendo do marcador,

corado com Sybr® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, EUA). Os resultados obtidos foram comparados de acordo com os genótipos presente no ToxoDB (<http://toxodb.org/toxo/>) e na ToxoDB PCR-RFLP Genotypes disponibilizada pelo Dr. Chunlei Su (<http://web.utk.edu/~csu1/ListToxoDB-PCR-RFLPgenotypes.html>).

## **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Foi utilizado o Programa GraphPad Prism 6.0 para análise da comparação da virulência entre os isolados analisados, utilizando como parâmetro um  $p \leq 0.05$  obtido dos cálculos após a análise da curva de sobrevivência por meio do gráfico de Kaplan-Meier e teste Log-rank (Mantel-Cox), levando em consideração a diluição de  $10^3$ .

## **RESULTADOS**

Foram analisadas 13 cepas isoladas, sendo identificadas como pertencentes a seis genótipos diferentes, sendo dois caracterizados como genótipos novos pois não há descrição no ToxoDB. Os animais que permaneceram vivos ao final de 45 dias pós-inoculação foram avaliados pela RIFI e não apresentaram sorologia reagente, exceto os animais da cepa CPL que apresentaram sorologia positiva animais avaliados. A mortalidade foi de 100% dos animais nos inóculos de  $10^3$ , de acordo com as cepas, foi observadas em todas as avaliadas exceto na RAT61-2 onde morreram 20% dos animais e BrHuMg2 60% de mortalidade, o que fez com que a análise estatística não fosse significativa ( $p > 0,05$ ) quando comparadas a cepa RH, porém com características semelhantes a cepa controle de referencia. A Tabela 2 e 3 apresentam os resultados da Multiplex PCR-RFLP e os resultados da análise de virulência, respectivamente.

## DISCUSSÃO

Isolamento de cepas de *T. gondii* é importante para a pesquisa em amostras humanas e animais, auxiliando na identificação de taquizoítos viáveis, que podem apresentar diversos comportamentos biológicos diferentes pertinentes aos isolados específicos. As cepas utilizadas nesse trabalho foram isoladas de diferentes espécies animais, entre elas suínos, ovinos, caprinos, galinhas, cães, bem como humanos.

Alguns autores submetem materiais não isolados a técnica de PCR-RFLP, estes isolados são importantes para demonstrar a diversidade, porém não auxiliam nos estudos de virulência e caracterização biológica das cepas. Ferreira et al. (2011), analisaram genotipicamente amostras não isoladas de pacientes com diagnóstico de clínico toxoplasmose confirmado por sorologia, PCR ou Nested-PCR, em vários materiais como sangue, líquido ou líquido amniótico, essas amostras eram de pacientes imunossuprimidos, gestantes ou com toxoplasmose ocular. A caracterização genotípica dos materiais revelou que o genótipo ToxoDB#65 foi o mais prevalente entre eles este já foi descrito em outras espécies como gatos e galinhas no Brasil, no presente estudo foi relacionado a isolados de suínos e caprinos.

O genótipo ToxoDB#21, neste estudo foi isolado de galinhas provenientes de propriedades com casos de aborto em ovinos na cidade de Palmital no estado de São Paulo, e também de ratos provenientes de locais de reciclagem, em outros estudos também já foram descritos nos mesmos hospedeiros (DUBEY et al., 2004).

O isolado relacionado ao ToxoDB #166 aqui identificados como causadores da toxoplasmose em gestantes, isolado de líquido amniótico (HIGA et al., 2014), foi também identificado em um jaguarundi, um animal da família dos felídeos, em um zoológico no estado de Pernambuco (PENA et al., 2011).

Vários autores ao caracterizar virulência diferenciam as cepas entre virulentas, com virulência intermediária ou avirulentas, porém utilizam-se de dados de mortalidade nos animais inoculados com amostras de órgãos e tecidos das espécies originalmente analisadas, ou seja não há controle da quantidade do inóculo (PENA et al., 2011; FERREIRA et al., 2011).

## **CONCLUSÃO**

Foi possível identificar seis genótipos diferentes em 13 cepas isoladas, sendo dois genótipos ainda não descritos no ToxoDB. A análise de virulência demonstrou que as cepas isoladas possuem alta virulência, semelhantes a cepa de referência RH.

## REFERENCIAS

ARAMINI, J. J., STEPHEN, C., & DUBEY, J. P. (1998). *Toxoplasma gondii* in Vancouver Island cougars (*Felis concolor vancouverensis*): serology and oocyst shedding. **The Journal of Parasitology**, *84*(2), 438–440.

DARDE, M. L., BOUTEILLE, B., & PESTRE-ALEXANDRE, M. (1992). Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. **The Journal of Parasitology**, *78*(5), 786–794.

DUBEY, J. P. (1980). Mouse pathogenicity of *Toxoplasma gondii* isolated from a goat. **American Journal of Veterinary Research**, *41*(3), 427–429.

DUBEY, J. P., GRAHAM, D. H., BLACKSTON, C. R., LEHMANN, T., GENNARI, S. M., RAGOZO, A. M. A., ... THULLIEZ, P. (2002). Biological and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from São Paulo, Brazil: unexpected findings. **International Journal for Parasitology**, *32*(1), 99–105.

DUBEY, J. P., LUNNEY, J. K., SHEN, S. K., KWOK, O. C. H., ASHFORD, D. A., & THULLIEZ, P. (1996). Infectivity of Low Numbers of *Toxoplasma gondii* Oocysts to Pigs. **The Journal of Parasitology**, *82*(3), 438–443. Retrieved from

DUBEY, J. P., NAVARRO, I. T., SREEKUMAR, C., DAHL, E., FREIRE, R. L., KAWABATA, H. H., ... LEHMANN, T. (2004). *Toxoplasma Gondii* Infections in Cats From Paraná, Brazil: Seroprevalence, Tissue Distribution, and Biologic and Genetic Characterization of Isolates. **Journal of Parasitology**, *90*(4), 721–726.

DUBEY, J. P., QUIRK, T., PITT, J. A., SUNDAR, N., VELMURUGAN, G. V., KWOK, O. C. H., ... SU, C. (2008). Isolation and Genetic Characterization of *Toxoplasma gondii* from Raccoons (*Procyon lotor*), Cats (*Felis domesticus*), Striped Skunk (*Mephitis mephitis*), Black Bear (*Ursus americanus*), And Cougar (*Puma concolor*) from Canada. **Journal of Parasitology**, *94*(1), 42–45.

DUBEY, J. P., SUNDAR, N., GENNARI, S. M., MINERVINO, A. H. H., FARIAS, N. A. D. R., RUAS, J. L., ... SU, C. (2007). 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. **Veterinary Parasitology**, *143*(2), 182–188.

FERREIRA, I. M. R., VIDAL, J. E., DE MATTOS, C. DE C. B., DE MATTOS, L. C., QU, D., SU, C., & PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. (2011). *Toxoplasma gondii* isolates: Multilocus RFLP-PCR genotyping from human patients in Sao Paulo State, Brazil identified distinct genotypes. **Experimental Parasitology**, *129*(2), 190–195. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.06.002>

GARCIA, J. L., GENNARI, S. M., MACHADO, R. Z., & NAVARRO, I. T. (2006).

*Toxoplasma gondii*: detection by mouse bioassay, histopathology, and polymerase chain reaction in tissues from experimentally infected pigs. **Experimental Parasitology**, 113(4), 267–271.

HIGA, L. T., GARCIA, J. L., SU, C., ROSSINID, R. C., & FALAVIGNA-GUILHERMEE, A. L. (2014). *Toxoplasma gondii* genotypes isolated from pregnant women with follow-up of infected children in southern Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 108(4), 244–246.

Lunde, M. N., & Jacobs, L. (1983). Antigenic Differences between Endozoites and Cystozoites of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Parasitology**, 69(5), 806–808.

PENA, H. F. J., GENNARI, S. M., DUBEY, J. P., & SU, C. (2008). Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International Journal For Parasitology**, 38(5), 561–569.

PENA, H. F. J., MARVULO, M. F. V., HORTA, M. C., SILVA, M. A., SILVA, J. C. R., SIQUEIRA, D. B., ... GENNARI, S. M. (2011). 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. **Veterinary Parasitology**, 175(3–4), 377–381.

PFEFFERKORN, E. R., PFEFFERKORN, L. C., & COLBY, E. D. (1977). Development of gametes and oocysts in cats fed cysts derived from cloned trophozoites of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Parasitology**, 63(1), 158–159.

SABIN, A. B., & WARREN, J. (1942). Therapeutic Effectiveness of Certain Sulfonamides on Infection by an Intracellular Protozoon (*Toxoplasma*). **Experimental Biology and Medicine**, 51(1), 19–23.

SARAF, P., SHWAB, E. K., DUBEY, J. P., & SU, C. (2017). On the determination of *Toxoplasma gondii* virulence in mice. **Experimental Parasitology**, 174, 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.01.009>

SHWAB, E. K., JIANG, T., PENA, H. F. J., GENNARI, S. M., DUBEY, J. P., & SU, C. (2016). The ROP18 and ROP5 gene allele types are highly predictive of virulence in mice across globally distributed strains of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, 46(2), 141–146.

SU, C., ZHANG, X., & DUBEY, J. P. (2006). Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: A high resolution and simple method for identification of parasites. **International Journal for Parasitology**, 36(7), 841–848.

**Tabela 1. Espécie de origem dos isolados submetidos a PCR-RFLP e análise de virulência**

<b>ORIGEM</b>	<b>ISOLADO</b>
Ratos Urbanos Londrina 2006 (Ruffolo et al., 2016)	RAT60 - 1
	RAT61 - 2
Galinhas Palmital -SP Propriedades com casos de aborto em ovinos (Surto)	BrPalCh1
	BrPalCh3
	BrPalCh4
	BrPalCh7
	BrPalCh8
Abortamento Caprino 1988	CPL
Liq Amniótico Maringá (HIGA et al., 2014)	MGA2
Suíno 1987 (NAVARRO et al., 1992)	LIV4
Caprino Guarapuava Feto 2005 (SILVA FILHO et al., 2008)	CPG
Ovinos	Cepa Ovinos
Londrina Linguíça Suíno 2002 (DIAS et al., 2005)	LLS
Sangue Cão Ourinhos 2018	Cão Ourinhos

**Tabela 2. Genotipagem de Isolados de *T.gondii* avaliados por meio da PCR-RFLP, demonstrando o resultado da análise dos 10 marcadores.**

	SAG1	5-3SAG2	alt.SAG2	SAG3	BTUB	GRA6	c22-8	c29-2	L358	PK1	Apico	GENOTIPO
RAT60 - 1	I	III	III	III	III	III	I	I	I	III	III	
RAT61 - 2	I	III	III	III	III	III	I	I	I	III	III	
BrPalCh1	I	III	III	III	III	III	I	I	I	III	III	#21
BrPalCh 8	I	III	III	III	III	III	I	I	I	III	III	
BrPalCh 3	I	III	III	III	III	III	I	I	I	III	III	
BrPalCh 4	I	III	III	III	III	III	I	I	I	III	III	
BrPalCh 7	I	III	III	III	III	III	I	I	I	III	III	
MGA2	I	III	III	III	III	III	u-1	I	III	III	III	#166
LIV4	I	I	II	III	III	III	u-1	I	I	III	I	#65
CPG	I	I	II	III	III	III	u-1	I	I	III	I	
CPL	I	I	II	III	III	III	u-1	I	I	III	I	
LLS	I	I	I	III	I	III	I	I	I	I	I	#novo1
Cão Ourinhos	I	I	I	III	I	II	III	I	III	I	I	#novo2

Legenda: o resultado dos marcadores foram verificados no ToxoDB e quando as sequências eram compatíveis caracterizavam um mesmo genótipo, quando não eram compatíveis com nenhuma sequência foram considerados genótipos novos.

Fonte: NINO (2019)

**Tabela 3. Análise de virulência, demonstrando a mortalidade de acordo com o inóculo.**

ISOLADO	INÓCULO	MORTALIDADE	DIAS P. I.
RAT60 - 1	10 <sup>3</sup>	100% (5/5)	10
RAT61 - 2	10 <sup>3</sup>	20% (1/5)	7
BrPalCh1	10 <sup>3</sup>	100% (3/3)	6
BrPalCh 8	10 <sup>3</sup>	100% (3/3)	7
BrPalCh 4	10 <sup>3</sup>	100% (3/3)	6
BrPalCh 7	10 <sup>3</sup>	100% (3/3)	7
CPL	10 <sup>3</sup>	100% (5/5)	10
Mga2	10 <sup>3</sup>	60% (3/5)	13
LIV4	10 <sup>3</sup>	100% (5/5)	10
CPG	10 <sup>3</sup>	100% (3/3)	7-8
Cepa Ovinos	10 <sup>3</sup>	100% (3/3)	7-8
LLS	10 <sup>3</sup>	100% (3/3)	8
Cão Ourinhos	10 <sup>3</sup>	100% (3/3)	8

Fonte: NINO (2019)

1 5 ARTIGO B  
23 **Caracterização genotípica de isolados de *Toxoplasma gondii* oriundos do**  
4 **surto de toxoplasmose humana no município de Santa Maria - RS.**5  
6 **RESUMO**  
7

8 *Toxoplasma gondii* foi o causador de um surto de grandes proporções no ano de  
9 2018 na cidade de Santa Maria – RS. Foram confirmados 809 casos, sendo entre  
10 eles 114 gestantes, com três óbito fetais, 10 abortamentos, e 22 casos de  
11 toxoplasmose congênita (TC). Objetivo-se com esse trabalho foi isolar e genotipar o  
12 parasita de amostras de fragmentos ou restos fetais de oito pacientes que sofreram  
13 aborto, morte fetal, ou fragmentos de placenta obtidos após parto cesárea de  
14 crianças que as mães foram diagnosticada com toxoplasmose gestacional. Os  
15 materiais submetidos ao bioensaio foram avaliados também pela PCR utilizando os  
16 primers TOX4 e TOX5. A caracterização genotípica dos isolados foi realizada por  
17 meio da técnica de PCR-RFLP utilizando os 10 marcadores genéticos (SAG1, 5'-  
18 3'SAG2, alt. SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico), e sendo  
19 posteriormente submetida a clivagem com enzimas de restrição. Houve resultado  
20 positivo na PCR de cinco materiais, os mesmos foram também positivos ao  
21 bioensaio. A PCR-RFLP apresentou caracterização genotípica idêntica nos 10  
22 marcadores genéticos avaliados, para os cinco isolados. Na análise de virulência  
23 houve 100% de mortalidade em animais inoculados com doses de  $10^5$ ,  $10^4$  e  $10^3$  e  
24  $10^2$  taquizoítos/ml semelhantes à cepa RH de alta virulência.

25  
26 Palavras-chave: bioensaio; *Toxoplasma gondii*; PCR-RFLP; congênita; mortalidade.

27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34

**ABSTRACT**

*Toxoplasma gondii* was the cause of a major outbreak in 2018 in the city of Santa Maria - RS. 809 cases were confirmed, including 114 pregnant women, with three fetal deaths, 10 abortions, and 22 cases of congenital toxoplasmosis (CT). The objective of this work was to isolate and genotype the parasite from samples of fragments or fetal remains of eight patients who suffered abortion, fetal death, or fragments of placenta obtained after cesarean delivery of children whose mothers were diagnosed with gestational toxoplasmosis. The materials submitted to the bioassay were also evaluated by PCR using primers TOX4 and TOX5. The genotypic characterization of the isolates was performed using the PCR-RFLP technique using the 10 genetic markers (SAG1, 5'-3'SAG2, alt. SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico), and subsequently subjected to cleavage with restriction enzymes. There was a positive result in the PCR of five materials, they were also positive for the bioassay. The PCR-RFLP showed identical genotypic characterization in the 10 genetic markers evaluated, for the five isolates. In virulence analysis, there was 100% mortality in animals inoculated with doses of 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup> and 10<sup>3</sup> and 10<sup>2</sup> tachyzoites/ml similar to the RH strain of high virulence.

Key-words: Bioassay; *Toxoplasma gondii*; PCR-RFLP; congenital, mortality.

## 1 INTRODUÇÃO

2                   O *Toxoplasma gondii* (NICOLLE; MANCEAUX, 1909) é um parasita  
3 intracelular obrigatório que infecta todos os animais homeotérmicos, e sua  
4 prevalência em humanos no Brasil é uma das maiores do mundo (DUBEY, 2009).

5                   A infecção por *T. gondii* pode ser adquirida pela ingestão de cistos  
6 presentes nos tecidos de animais infectados, quando estes são consumidos crus ou  
7 mal cozidos, pela ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos ou  
8 pela via transplacentária (TENTER et al., 2000).

9                   A toxoplasmose congênita ocorre quando mãe se infecta pela  
10 primeira vez durante a gestação e passa taquizoítos via barreira transplacentária  
11 para o feto, causando sequelas que podem ser graves de acordo com o estágio da  
12 gestação. A severidade da infecção, quando esta ocorre, está relacionada à espécie,  
13 idade do hospedeiro, estado imunológico, condição nutricional, estágio e cepa do  
14 parasita e infecções concomitantes (LUFT; REMINGTON, 1992; DUBEY, 1994;  
15 DUBEY et al., 1994; LIESENFELD et al., 2001; DUBEY; JONES 2008).

16                   Surto de toxoplasmose causam prejuízos a população afetada  
17 principalmente quando há gestantes entre os acometidos. Em Santa Izabel do Ivaí,  
18 houve sete casos de gestantes infectadas, uma delas teve aborto espontâneo e as  
19 demais tiveram filhos infectados (BRASIL, 2002), neste caso o surto foi associado ao  
20 consumo de água contaminada com oocistos, sendo possível isolamento após  
21 bioensaio de amostras de água retiradas caixas d'água (MOURA et al., 2006)

22                   O surto de toxoplasmose em Santa Maria no estado do Rio Grande  
23 do Sul, no Brasil, ocorreu em 2018 e afetou 809 indivíduos, entre eles 114 gestantes  
24 com três óbito fetais, 10 abortamentos, e 22 casos de toxoplasmose congênita  
25 (TC)(CEVS, 2018). O objetivo do presente trabalho foi isolar e caracterizar

1 genotipicamente cepas de *T. gondii* isolados de placentas humanas obtidas durante  
2 o surto de toxoplasmose.

3

## 4 **MATERIAL E MÉTODOS**

5

### 6 ***Isolamento***

7                   As amostras enviadas estão especificadas na tabela 1, foram e  
8 submetidas ao bioensaio, onde fragmentos foram macerados com solução salina  
9 0,85% estéril, filtradas em gaze e inoculadas em camundongos suíços, por via  
10 intraperitoneal. Foram utilizados camundongos suíços albinos fêmeas com 45 dias  
11 de vida. Os animais foram mantidos em gaiolas com água e comida *ad libitum*. Os  
12 animais foram acompanhados, diariamente, para detecção de alterações clínicas.  
13 Animais inoculados e que não apresentaram sinais clínicos da doença, foram  
14 mantidos por 45 dias para verificação de soroconversão dos anticorpos e presença  
15 de cistos cerebrais, em animais com resultados negativos nesta primeira análise, foi  
16 então realizada uma nova inoculação com macerados de cérebro.

17                   Uma parte das amostras foram armazenadas em microtubos e  
18 congeladas até a realização da PCR.

19

### 20 ***Teste de Virulência***

21                   Taquizoítos retirados do líquido peritoneal foram centrifugados e  
22 ressuspendido em 1mL de salina estéril. As contagens foram realizadas em câmara  
23 de Neubauer e padronizados os inóculos entre  $10^5$  e  $10^6$  taquizoítos/ml por animal em  
24 um volume final de 100  $\mu$ l.

1                    Para cada cepa analisada foram utilizados três animais por diluição,  
2 sendo elas entre  $10^5$  a 10 taquizoítos por ml para cada animal. Os animais foram  
3 observados duas vezes ao dia para verificação de sinais clínicos da doença. Os  
4 animais que sobreviveram após 40 dias de inoculação foram eutanasiados e tiveram  
5 seu cérebro analisado microscopicamente para a presença de cistos cerebrais por  
6 meio da visualização de parte do cérebro entre lâmina e lamínula. O soro foi  
7 analisado para a presença de anticorpos IgG anti- *T. gondii* através da reação de  
8 imunofluorescência indireta de acordo com Camargo (1964).

9

#### 10 **PCR convencional**

11                    A extração de DNA de *T. gondii* das amostras de placenta e de  
12 líquido peritoneal, foram realizadas utilizando-se o kit NucleoSpin Tissue (Macharey-  
13 Nagel, Germany), seguindo as orientações do fabricante.

14                    Os materiais foram avaliados pela PCR de acordo com Homan et al  
15 (2000). As condições de PCR foram realizadas como descrito por Garcia et al.  
16 (2006). Um controle positivo constituído de DNA extraído da cepa RH e um negativo,  
17 água ultrapura estéril foram incluídos em cada teste de PCR.

18

#### 19 **Caracterização Genotípica**

20                    A caracterização genotípica dos isolados foi realizada por meio da  
21 técnica de PCR-RFLP utilizando 10 marcadores genéticos, SAG1, 5'-3'SAG2, alt.  
22 SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1 e Apico (SU, ZHANG, DUBEY,  
23 2006, PENA et al., 2008).

24

25                    Para a análise dos marcadores utilizou-se como controles as cepas  
do Tipo I : cepa RH, GT1; as do Tipo II: Me-49, PTG (clone da Me-49); Tipo III: VEG

1 e CTG além dos caracterizados como atípicos: TgCa1 (oocistos de puma), CatBr5  
2 (tecido de gato) e MAS (tecidos fetais humanos)

3                   As sequencias alvo do DNA foram primeiramente amplificadas pela  
4 PCR-multiplex, utilizando primers externos de todos os marcadores, seguida de uma  
5 PCR-nested, utilizando primers internos individualmente para cada marcador. Em  
6 seguida, os produtos da PCR-nested foram clivados com de enzimas de restrição e  
7 condições de temperatura e tempo específicos para cada marcador (SU, ZHANG,  
8 DUBEY, 2006). Todos os produtos foram visualizados sobre luz UV depois de  
9 realizada eletroforese em gel de agarose 2,5 ou 3%, dependendo do marcador,  
10 corado com Sybr® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, EUA). Os resultados obtidos  
11 foram comparados e classificados de acordo com os genótipos presente no ToxoDB  
12 (<http://toxodb.org/toxo/>) e na ToxoDB PCR-RFLP Genotypes disponibilizada pelo Dr.  
13 Chunlei Su (<http://web.utk.edu/~csu1/ListToxoDB-PCR-RFLPgenotypes.html>).

14

### 15 **Análise estatística**

16                   Foi utilizado o Programa GraphPad Prism 6.0, para análise das  
17 curvas de sobrevivência e comparação entre doses e cepa de referência RH. A  
18 análise da sobrevivência foi realizada por meio do gráfico de Kaplan Meier e teste  
19 Log-rank (Mantel-Cox) considerando um  $p \leq 0.05$ .

20

## 21 **RESULTADOS**

22                   Das oito amostras analisadas cinco foram positivas na PCR  
23 convencionada e no bioensaio (Tabela 2). Na primeira inoculação os camundongos  
24 apresentaram sinais clínicos da infecção entre o oitavo e décimo dia pós inoculação.  
25 O cérebro desses animais foi verificado quanto a presença de cistos cerebrais e foi  
26 negativo, o sangue foi colhido para análise sorológica as quais apresentaram

1 resultados negativos, estes foram reinoculados em um segundo momento e também  
2 apresentaram resultados negativos.

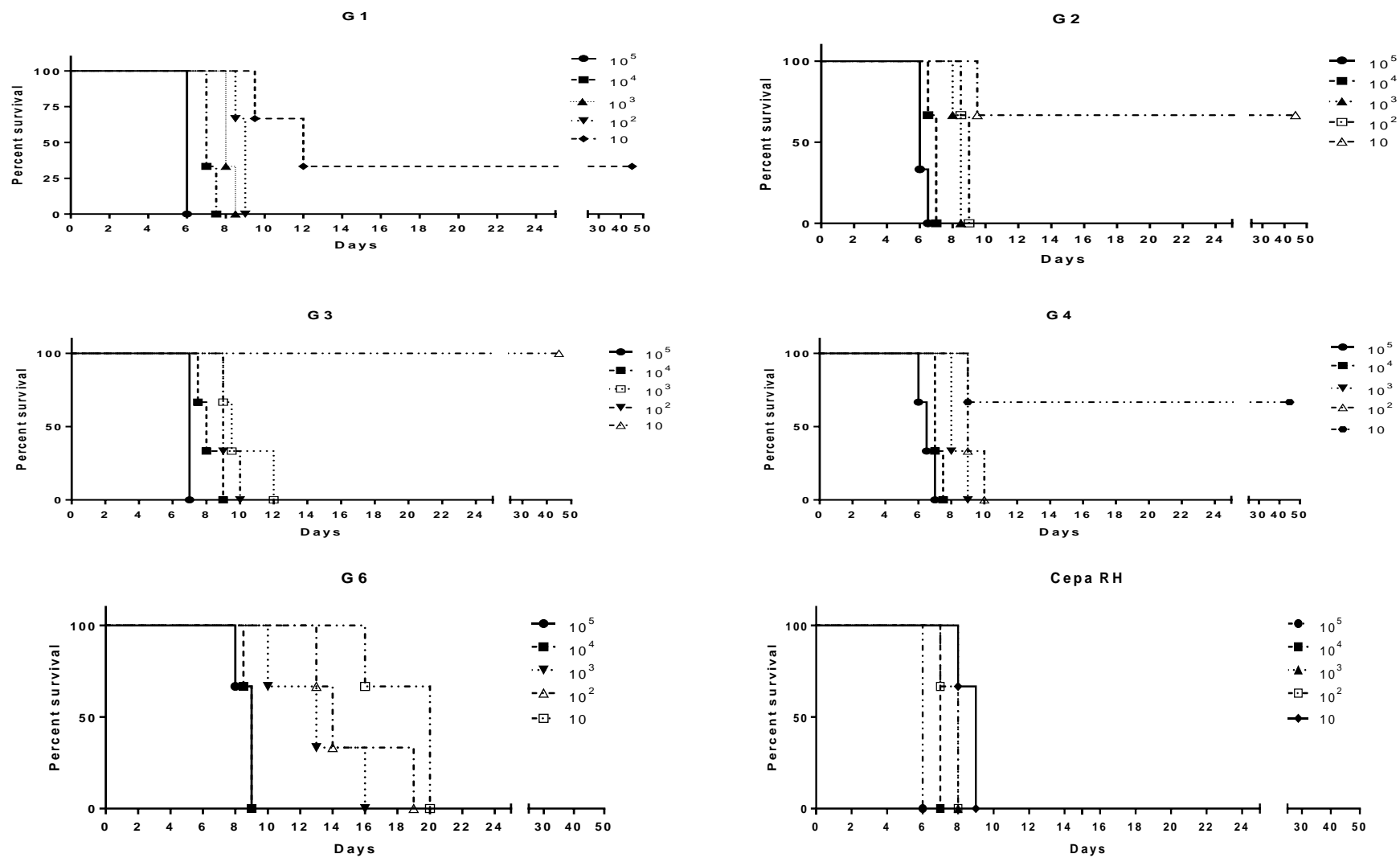
3 A análise genotípica demonstrou que todas as cepas isoladas  
4 apresentaram a mesma caracterização para todos os marcadores. (Tabela 3). Foram  
5 comparadas com as sequências e não apresentaram compatibilidade com nenhuma  
6 das cepas já depositadas no ToxoDB, não sendo identificadas nenhuma das cepas  
7 clonais típicas (I, II e III), nem com as linhagens clonais brasileiras mais prevalentes  
8 Tipo BrI, BrII, BrIII e BrIV.

9 Os resultados do teste de virulência em camundongos estão  
10 demonstrados na Figura 2. As mortes ocorreram para entre 6 e 8 dias na  
11 concentração de  $10^5$  taquizoítos/mL dias; para  $10^4$  entre 6 e 9 dias;  $10^3$  entre 8 e 16  
12 dias;  $10^2$  entre 8 e 19 dias; 10 a partir do nono dia pós inoculação, porém alguns  
13 animais desta diluição não morreram e foram eutanasiados em 45 dias pós  
14 inoculação, estes animais foram avaliados por sorologia e não houve presença de  
15 cistos cerebrais em nenhum dos camundongos avaliados. Apenas os camundongos  
16 do isolado G6 morreram entre 16 e 20 dias na dosagem de 10 taquizoítos/mL.  
17 Apesar dessa diferença vale ressaltar que todos apresentaram o mesmo genótipo.

18 Foi utilizado como padrão para comparação a cepa RH a qual possui  
19 genótipo caracterizado como tipo I, que apresenta características de alta virulência e  
20 acistogênica, nas quais as mortes para todos os inóculos ocorreu entre seis e nove  
21 dias.

22

Figura 1. Análise de sobrevivência em camundongo, demonstrando a mortalidade dos animais de acordo com a quantidade do inóculo e tempo.



Legenda: Todas as curvas apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,0001$ ) entre as dosagens

Quando comparadas a cepa RH, a cepa G6 foi considerada significativa em todas as dosagens, no inóculo de  $10^5$  ( $p=0,02$ ),  $10^4$  ( $p=0,02$ ) somente essa cepa foi estatisticamente significativa, na dosagem de  $10^3$  além da G6 ( $p=0,02$ ) a G3 ( $p=0,03$ ) também foi considerada estatisticamente significativa,  $10^2$  G3, G4 e G6 apresentaram  $p=0,0339$  sendo significativas; para o inóculo de 10 taquizoítos/ml, G3 e G6 foram significativas ( $p=0,0339$ ). A análise da virulência em diferentes inóculos de taquizoítos demonstrou padrão compatível com cepas virulentas, tendo 100% de mortalidade em todas as cepas para as diluições acima de  $10^2$  taquizoítos/mL.

## **DISCUSSÃO**

A caracterização genotípica por meio da PCR-RFLP nos cinco isolados apresentou resultados iguais para os 10 marcadores genéticos avaliados, após verificação de compatibilidade com as sequências já identificadas verificou-se que trata-se de genótipos novos, diferentes dos tipos clonais I, II e III. A análise da virulência dos taquizoítos demonstrou padrão de alta virulência semelhante a cepa RH.

O município de Santa Maria, durante o ano de 2018, teve surto de toxoplasmose humana onde foram diagnosticados 809 casos, destes 114 foram em gestantes (CEVS, 2018). Os estudos realizados em soros desses pacientes apontaram o envolvimento da infecção por oocistos como via de transmissão para esses pacientes, analisados através da técnica de ELISA IgG tendo como alvo a proteína CCp5a (MINEO, comunicação pessoal), o que corrobora com o estudo epidemiológico que verificou uma associação com fatores ambientais, destacando-se consumo de água e hortaliças (SILVA et al., 2018).

Da mesma forma, no município de Santa Isabel do Ivaí, no estado do Paraná (BRASIL, 2002) ocorreu o que era considerado até então o maior surto de toxoplasmose humana do mundo, no qual foram diagnosticados 426 indivíduos com diagnóstico de toxoplasmose aguda, além de casos de toxoplasmose ocular e sete casos de infecção durante a gestação. Verificou-se que o surto ocorreu pela contaminação do reservatório de água com oocistos do *T. gondii* (DUBEY et al, 2004; BRASIL 2002). Houve isolamento de *T. gondii* a partir de amostras de água recolhidas em caixas d'água contaminadas com oocistos (MOURA, 2006).

A contaminação ambiental causada por oocistos de *T. gondii* que são liberados pelos felídeos em altas quantidades é uma importante via de transmissão para os humanos pois estes podem permanecer viáveis no ambiente por longos períodos (DUBEY et al., 1970; DUBEY e FRENKEL, 1973; DUBEY 2010).

Hill e Dubey (2002) verificaram que o risco para sequelas severas da infecção aumenta em 65% quando as gestantes são acometidas no início da gestação, porém as consequências da infecção nas gestantes aqui analisadas ocorreram a partir da 15ª semana com casos verificados em também em fases finais da gestação. A severidade da doença está associada a cepa e quantidade do inóculo recebida, neste trabalho a análise da virulência foi realizada em camundongos e nesta espécie as curvas de virulência apresentaram comportamentos de cepas virulentas nos diferentes inóculos nas doses de 10 a 100.000 taquizoítos/mL.

Casos de toxoplasmose congênita já foram identificados durante surtos causados por *T. gondii* em diversas cidade pelo mundo. No Canadá 12 crianças nasceram após as mães serem infectadas durante a gestação, sendo que algumas apresentaram lesões na retina, o surto foi apontado como causado por

oocistos, porém não foi possível detectar o oocisto em águas utilizadas para consumo (BOWIE et al., 1997; BURNETT et al., 1998).

## **CONCLUSÃO**

O isolamento do parasita, genotipagem e verificação da virulência obtidas no presente estudo permitiram identificar que a cepa causadora da infecção nas gestantes era a mesma, uma cepa de genótipo novo, ainda não descrito, e com alta virulência. Esta observação pode caracterizar uma fonte de infecção comum a todas as gestantes.

## REFERENCIAS

BOWIE, W. R., KING, A. S., WERKER, D. H., ISAAC-RENTON, J. L., BELL, A., ENG, S. B., & MARION, S. A. (1997). Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. **Lancet**, 350(9072), 173–177.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Surto de Toxoplasmose no Município de Santa Isabel do Ivaí – Paraná. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**; 2(3):2-9, 2002.

CAMARGO, M. Estudo comparativo das reações de Sabin-Feldman e de imunofluorescência indireta, para a toxoplasmose, em 1000 soros humanos. Comportamento anômalo de alguns soros. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 24(1-2), 1-26, 1964.

**CEVS**. Relatório de atualização de investigação de Surto, Relatório de Investigação Epidemiológica. Disponível em <http://www.santamaria.rs.gov.br/docs/noticia/2018/10/D19-1566.pdf>. Acesso em 10-12-2018.

BURNETT, A. J., SHORTT, S. G., ISAAC-RENTON, J., KING, A., WERKER, D., & BOWIE, W. R. (1998). Multiple cases of acquired toxoplasmosis retinitis presenting in an outbreak. **Ophthalmology**, 105(6), 1032–1037.

DUBEY, J.P. (2010). **Toxoplasmosis of Animals and Humans**. BioMed Central.

DUBEY, J. P. (2009). History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, 39(8), 877–882.

DUBEY, J. P., BAKER, D. G., DAVIS, S. W., URBAN, J. F. J., & SHEN, S. K. (1994). Persistence of immunity to toxoplasmosis in pigs vaccinated with a nonpersistent strain of *Toxoplasma gondii*. **American Journal of Veterinary Research**, 55(7), 982–987.

DUBEY, J. P., & FRENKEL, J. K. (1973). Experimental toxoplasma infection in mice with strains producing oocysts. **The Journal of Parasitology**, 59(3), 505–512.

DUBEY, J. P., & JONES, J. L. (2008). *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **International Journal for Parasitology**, 38(11), 1257–1278.

HILL, D., & DUBEY, J. P. (2002). *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, 8(10), 634–640.

LIESENFELD, O., MONTOYA, J. G., KINNEY, S., PRESS, C., & REMINGTON, J. S. (2001). Effect of testing for IgG avidity in the diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women: experience in a US reference laboratory. **The Journal of Infectious Diseases**, 183(8), 1248–1253.

LUFT, B. J., & REMINGTON, J. S. (1992). Toxoplasmic encephalitis in AIDS.

**Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, 15(2), 211–222.

PENA, H. F. J., GENNARI, S. M., DUBEY, J. P., & SU, C. (2008). Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International Journal For Parasitology**, 38(5), 561–569.

SILVA, C.R.; CRIMA, S.M.; SILVA e ALVES, A.J.; FIGUEIREDO, J.A. et al. Surto de toxoplasmose associado ao consumo de água no município de Santa Maria – um estudo caso-controle. Rio Grande do Sul, Brasil, 2018. **10º Encontro Científico do Programa de Treinamento em Epidemiologia Aplicada aos Serviços do Sistema Único de Saúde – Nível Avançado (EpiSUS-Avançado) : caderno de resumos / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília : Ministério da Saúde, 2018.** 132 p. Disponível em:  
<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/novembro/21/caderno-resumos-episuus-20nov18-web.pdf>. Acesso em 10-12-2018.

SU, C., ZHANG, X., & DUBEY, J. P. (2006). Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: A high resolution and simple method for identification of parasites. **International Journal for Parasitology**, 36(7), 841–848.

TENTER, A. M., HECKEROTH, A. R., & WEISS, L. M. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, 30(12–13), 1217–1258.

**Tabela 1 - Materiais enviados para bioensaio, provenientes de Gestantes diagnosticadas com Toxoplasmose e a idade gestacional durante a vigência do surto na cidade de Santa Maria - Rio Grande do Sul - Brasil, 2018.**

<b>Amostras</b>	<b>AMOSTRA BIOLÓGICA</b>	<b>Idade gestacional</b>
G1	Fragmento de placenta e líquido amniótico	37 semanas - óbito fetal
G2	Fragmento de placenta e líquido amniótico	26 semanas - óbito fetal
G3	Fragmento de Placenta e feto	15 semanas - óbito fetal
G4	Fragmento de Placenta e feto	15 semanas
G5	Fragmento de Placenta	36 semanas
G6	Fragmento de Placenta e feto	15 semanas- óbito fetal
G7	Fragmento de Placenta	Terceiro trimestre - parto cesárea
G8	Fragmento de Placenta e feto	37 semanas - óbito fetal

Legenda: dados de idade gestacional enviados juntamente a ficha das pacientes no envio das amostras ao laboratório.

Fonte: NINO (2019)

**Tabela 2 - Resultado das análises da PCR dos materiais primários e do bioensaio dos fragmentos enviados para análise**

<b>AMOSTRAS</b>	<b>RESULTADO DA PCR</b>	<b>BIOENSAIO</b>
G1	Positivo	Positivo
G2	Positivo	Positivo
G3	Positivo	Positivo
G4	Positivo	Positivo
G5	Negativo	Negativo
G6	Positivo	Positivo
G7	Negativo	Negativo
G8	Negativo	Negativo

Legenda: Bioensaio positivo - presença de taquizoítos em líquido peritoneal; Bioensaio negativo - não houve presença de taquizoítos em líquido peritoneal, presença de cistos cerebrais negativos.

Fonte: NINO (2019)

**Tabela 3 Resultado da PCR-RFLP para os isolados em bioensaio das amostras enviadas de Santa Maria - Rio Grande do Sul, Brasil, 2018.**

	Marcadores genéticos										
	SAG1	5-3SAG2	alt.SAG2	SAG3	BTUB	GRA6	c22-8	c29-2	L358	PK1	Apico
G1											
G2											
G3	I	I	I	I	III	III	II	III	III	I	I
G4											
G6											

Legenda: todas as análises foram acompanhadas de controles positivos para cada marcador, indicando a caracterização das bandas avaliadas após corrida em gel de agarose concentração de 2,5% para os todos os marcadores exceto APICO na concentração de 3% sendo avaliadas por comparação.

Fonte: NINO (2019)

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível determinar o genótipo e caracterizar a virulência de cepas de *T. gondii* isolados de diferentes espécies, estas cepas eram provenientes de diversas localidades e foi possível identificar seis genótipos diferentes em 13 isolados, sendo dois genótipos não descritos no ToxoDB. Uma alta virulência foi observada em 11 isolados que apresentaram mortalidade de 100% nos animais inoculados com  $10^3$  taquizoítos de *T. gondii* /mL, características semelhantes a cepa de referência RH.

O isolamento do parasita, genotipagem e verificação da virulência de amostras de placenta humana permitiram identificar a cepa causadora desse surto, uma cepa de genótipo novo, e com alta virulência, identificada em todos os cinco isolados por meio da PCR-RFLP. A análise da virulência desta cepa em camundongos demonstrou que características semelhantes com cepas virulentas como a cepa RH, ou seja, alta letalidade.