



UNIVERSIDADE
DO BRASIL
UFRJ

INSTITUTO DE BIOLOGIA – CEDERJ



DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA
EM GESTANTES ATENDIDAS NO INSTITUTO NACIONAL DE
SAÚDE DA MULHER, DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE
FERNANDES FIGUEIRA – IFF/FIOCRUZ

DANIELLE NASCIMENTO ROCHA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
PÓLO UNIVERSITÁRIO DE DUQUE DE CAXIAS

2016



UNIVERSIDADE
DO BRASIL
UFRJ

INSTITUTO DE BIOLOGIA – CEDERJ



DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA
EM GESTANTES ATENDIDAS NO INSTITUTO NACIONAL DE
SAÚDE DA MULHER, DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE
FERNANDES FIGUEIRA – IFF/FIOCRUZ

DANIELLE NASCIMENTO ROCHA

Monografia apresentada como atividade obrigatória à integralização de créditos para conclusão do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas - Modalidade EAD.
Orientador (a): Letícia da Cunha Guida

ORIENTADOR: LETÍCIA DA CUNHA GUIDA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
PÓLO UNIVERSITÁRIO DEDUQUE DE CAXIAS

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Rocha, Danielle Nascimento

Diagnóstico Molecular da Toxoplasmose Congênita em Gestantes Atendidas no Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira – IFF/FIOCRUZ. Polo Duque de Caxias, 2016. 44 f. il: 31 cm

Orientadora: Letícia da Cunha Guida

Monografia apresentada à Universidade Federal do Rio de Janeiro para obtenção do grau de Licenciado (a) no Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas – Modalidade EAD. 2016.

Referencias bibliográfica: f.40-41

1. Palavras Chaves

I. GUIDA, Letícia da Cunha

II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Licenciatura em Ciências Biológicas – Modalidade EAD

III. Diagnóstico Molecular da Toxoplasmose Congênita em Gestantes Atendidas no Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira – IFF/FIOCRUZ

Dedico este trabalho ao amigo Leonardo,
por me ajudar a retornar ao mundo da
pesquisa científica,
e ao querido mestre Delfim Vera Cruz
Aguiar (*in memoriam*),
pela sua ajuda no meu desenvolvimento e
crescimento no magistério.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por me dar perseverança para buscar esta segunda graduação, desta vez em Ciências Biológicas;

Aos meus pais, por sempre me apoiarem para alcançar qualquer objetivo, inclusive este;

Ao meu noivo Jeferson, por seu apoio incondicional a esse projeto desde os primeiros momentos da nossa história conjunta;

À minha orientadora Letícia da Cunha Guida, por ter me aceitado como aluna, e ter permitido que, no seu laboratório, eu pudesse retornar ao mundo da pesquisa científica;

Ao amigo Leonardo, por me incentivar a retornar para a pesquisa e por tornar isso possível;

À amiga Louise, pela compreensão da importância desta graduação para mim, e pelo seu desejo sincero de me ver alcançar este objetivo.

Ao (esbelto!) amigo Seixas, pela ajuda em Zoologia e com as horas complementares;

A todos meus amigos e familiares, por tolerarem minhas ausências;

A todos os colegas do CEDERJ, pela união e solidariedade;

Aos tutores, professores e coordenadores do CEDERJ, pela sua dedicação, com ou sem salário, que me ajudou a realizar este sonho tão antigo;

A toda equipe do Laboratório de Alta Complexidade pelo acolhimento, paciência e por me ajudarem em tudo que foi possível;

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular pela ajuda com os géis e fotos.

E a todos que de alguma forma me ajudaram ou incentivaram, ou ainda que contribuíram para este trabalho, **MUITO OBRIGADA!**

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 TOXOPLASMA GONDII E A TOXOPLASMOSE	13
2.2 TOXOPLASMOSE CONGÊNITA	17
2.3 DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE	18
2.3.1 MÉTODOS SOROLÓGICOS.....	18
2.3.1.1 Hemaglutinação indireta	19
2.3.1.2 Imunofluorescência indireta	19
2.3.1.3 Aglutinação por Imunoabsorção	20
2.3.1.4 ELISA e Teste de avidéz	20
2.3.2 DIAGNÓSTICO MOLECULAR	20
2.3.2.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	21
2.3.2.2 PCR em tempo real	21
3 OBJETIVOS.....	23
3.1 OBJETIVO GERAL.....	23
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA	24
4.2 PCR EM TEMPO REAL	25
4.2.1 CURVA PADRÃO	25
4.2.2 PCR EM TEMPO REAL PELO SISTEMA TAQMAN® REAL-TIME PCR.....	25
4.3 NESTED PCR	27
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1 CURVA PADRÃO	29
5.2 PCR EM TEMPO REAL	31
5.3 NESTED PCR	38
6 CONCLUSÕES	40
REFERÊNCIAS	41

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i>	15
Figura 2. Fotomicrografia eletrônica das diferentes formas de <i>T. gondii</i>	16
Quadro 1. Conjunto de iniciadores utilizados nas reações de PCR em tempo real.	26
Quadro 2. Mistura reacional utilizada nas reações de PCR em tempo real.....	27
Quadro 3. Conjunto de iniciadores utilizados nas reações de nested PCR.....	28
Gráfico 1. Curva padrão.. ..	30
Gráfico 2. Gráfico de amplificação da amostra de DNA extraído do líquido amniótico da paciente 36.....	33
Gráfico 3. Gráfico de amplificação da amostra de DNA extraído do líquido amniótico da paciente 118.....	33
Quadro 4. Dados de amplificação das amostras das pacientes 36 e 118.	34
Quadro 5. Dados de sorologia para <i>Toxoplasma gondii</i> das 50 pacientes analisadas....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Perfis sorológicos dos pacientes	19
Tabela 2. Dados da curva padrão: C_t , médias e desvio padrão.....	29
Tabela 3. Avaliação da presença do DNA de <i>Toxoplasma gondii</i> nas amostras extraídas do líquido amniótico das 50 pacientes.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- AE – Tampão de Eluição
- AL – Tampão de Lise
- AW1 – Tampão de Lavagem 1
- AW2 – Tampão de Lavagem 2
- B1 – Gene de *Toxoplasma gondii*
- C_t – Ciclo em que a fluorescência ultrapassa o nível de *background*
- DNA – Ácido Desoxiribonucléico
- dNTP – Deoxi-nucleotídeos
- ELFA – Imunoensaio por fluorescência
- ELISA – Ensaio Imunoenzimático
- FAM – 6-carboxyfluoresceína
- fg – Fentogramas
- GPI – Glicosilfosfatidilinositol
- GRA – Proteínas de grânulos densos
- IgA – Imunoglobulina A
- IgE – Imunoglobulina E
- IgG – Imunoglobulina G
- IgM – Imunoglobulina M
- ITS1 – Espaçador transcricional interno entre os genes de RNA ribossomal 18s e 5.8s
- kDa – Kilodáltons
- MIC – Proteínas de micronemas
- mL – Mililitro
- ng – Nanograma
- OMS – Organização Mundial da Saúde
- pb – Pares de bases
- PCR – Reação em cadeia da polimerase
- RNA – Ácido Ribonucléico
- RON e ROP – Proteínas de roptrias
- S – Svedberg
- SAG – Antígenos de superfície

TAMRA – Carboxitetrametilrodamina

VIC – Corante fluorescente (550 nm)

μM – Micromolar

ΔRn – Fluorescência normalizada

$^{\circ}\text{C}$ – Graus Celsius

μl – Microlitro

σ – Desvio padrão

20x – Solução vinte vezes concentrada

2x – Solução duas vezes concentrada

RESUMO

Neste trabalho, técnicas moleculares foram utilizadas para diagnosticar a transmissão materno-fetal da toxoplasmose em 50 gestantes atendidas pelo serviço de pré-natal do Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira – IFF/FIOCRUZ. A toxoplasmose é uma parasitose cujo agente etiológico é *Toxoplasma gondii*, e segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), esta zoonose está presente em todo o mundo, com prevalência variando entre 10 e 90 %. As consequências desta infecção são especialmente importantes para as mulheres soropositivas, já que em caso de gestação pode ocorrer transmissão vertical deste patógeno, resultando em diversas alterações no desenvolvimento fetal, como hepatoesplenomegalia, calcificações cerebrais e coriorretinite, e gerando impactos econômicos e sociais. Dentro desta perspectiva, os objetivos deste estudo incluíam padronizar a técnica de PCR em tempo real para diagnóstico da toxoplasmose congênita e aplicar este método ao grupo de gestantes atendidas pelo serviço de pré-natal do IFF, além de realizar a comparação com resultados obtidos pela técnica de *nested*-PCR, e correlacionar os dados obtidos com a sorologia das pacientes e com as características clínicas dos recém-nascidos. Para tanto, foi realizada a extração de DNA a partir de amostras de líquido amniótico coletadas por amniocentese nas pacientes que apresentavam quadro clínico e sorologia compatíveis com toxoplasmose aguda; alíquotas do DNA foram utilizadas para as reações de PCR em tempo real através do sistema *TaqMan*®, e depois os resultados obtidos foram confirmados por *nested*-PCR. Dentre as 50 pacientes avaliadas, em apenas dois casos foi confirmada a transmissão materno-fetal da toxoplasmose, através das duas técnicas utilizadas; os filhos destas pacientes apresentaram quadro de toxoplasmose congênita. Na maioria das pacientes (95,8%) a transmissão não ocorreu, provavelmente devido ao início precoce do tratamento. Estes dados permitem concluir que a detecção rápida e precoce da transmissão materno-fetal da toxoplasmose é de extrema importância para evitar as consequências deste evento no desenvolvimento fetal.

Palavras-chave: Toxoplasmose Congênita; Diagnóstico Molecular; PCR em tempo real.

1 Introdução

Este trabalho avaliou a transmissão materno fetal da toxoplasmose em gestantes atendidas pelo serviço de pré-natal do Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira (IFF/FIOCRUZ). A toxoplasmose é uma doença infecciosa, cujo agente etiológico é *Toxoplasma gondii* e que pode afetar diversas espécies de animais de sangue quente, incluindo os humanos. Este parasito apresenta distribuição geográfica mundial, mas a prevalência da infecção por ele causada varia entre 10 e 90%, segundo a OMS.

Na maioria dos casos, indivíduos saudáveis não apresentam sintomas de toxoplasmose, mas em cerca de 20% dos casos pode ocorrer febre, dores musculares e linfadenopatia. As consequências desta infecção são especialmente graves para indivíduos imunocomprometidos, que podem apresentar toxoplasmose generalizada ou encefalite (ROBERT-GANGNEUXA; DARDÉ, 2012).

A toxoplasmose em gestantes também pode apresentar consequências importantes. Em gestantes com sorologia positiva para toxoplasmose pode ocorrer a transmissão vertical do parasito, provocando alterações no desenvolvimento fetal, como hepatoesplenomegalia, calcificações cerebrais e coriorretinite; o cuidado com os indivíduos afetados gera impactos econômicos e sociais (AMENDOEIRA; CAMILLO-COURA, 2012). Por esta razão é de extrema importância o diagnóstico sorológico da gestante, realizado durante o pré-natal; em gestantes que apresentam infecção recente é iniciado tratamento com espiramicina, buscando evitar a transmissão materno fetal da toxoplasmose.

O diagnóstico acurado da toxoplasmose fetal também é muito importante, porque se a transmissão vertical for comprovada, a conduta será modificada: serão administrados fármacos para tratamento do feto (pirimetamina, sulfadiazina e ácido fólico), buscando minimizar as alterações no desenvolvimento fetal, e assim mitigar o impacto da toxoplasmose congênita para as famílias e a sociedade (MONTROYA; REMINGTON, 2008). Nesta perspectiva, este trabalho teve como objetivo contribuir para o aperfeiçoamento dos métodos para diagnóstico da transmissão materno fetal da infecção por *Toxoplasma gondii*, através da padronização de uma técnica de diagnóstico

molecular utilizando amostras coletadas do grupo de gestantes atendidas pelo serviço de pré-natal do Instituto Nacional Fernandes Figueira.

2 Referencial Teórico

2.1 *Toxoplasma gondii* e a Toxoplasmose

A toxoplasmose é uma doença infecciosa de grande importância médica e veterinária, sendo uma zoonose que tem como agente etiológico o protozoário apicomplexo *Toxoplasma gondii*. Este protozoário apresenta uma distribuição geográfica mundial, e pode infectar animais de sangue quente (incluindo os humanos); a maioria dos organismos infectados são hospedeiros intermediários; os únicos hospedeiros definitivos deste protozoário são os animais da família dos felídeos (ROBERT-GANGNEUXA; DARDÉ, 2012). A infecção por este parasito está associada a abortamentos e doenças congênitas em seus hospedeiros intermediários (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000; SUKTHANA, 2006).

Os primeiros relatos de identificação do parasito foram realizados por Nicolle e Manceaux, no ano de 1908, na Tunísia, em roedores silvestres africanos. Como se diferenciavam de protozoários do gênero *Leishmania*, foi introduzido um novo gênero (*Toxoplasma*) um ano mais tarde, sendo *T. gondii* a espécie-tipo do gênero. Simultaneamente, Splendore (1908) descreveu o mesmo parasito em coelhos no Brasil (FERGUSON, 2009). Taxonomicamente, o *T. gondii* é classificado como:

Domínio Eukaryota

Sub-reino: Protozoa

Filo: Apicomplexa

Classe: Conoidasida

Subclasse: Coccidia

Ordem: Eimeriida

Família: Sarcocistidae

Gênero: *Toxoplasma*

Espécie: *Toxoplasma gondii*.

O primeiro caso de toxoplasmose humana foi descrito em 1923, em uma criança de 11 anos de idade que apresentava hidrocefalia e microftalmia (HILL; CHIRUKANDOTH; DUBEY, 2005; SUKTHANA, 2006). Em 1937 *T. gondii* foi

reconhecido como o agente causador de encefalomielite em crianças recém-nascidas, sendo que cinco anos mais tarde comprovou-se a sua transmissão vertical em humanos (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). Apesar de vários estudos terem sido realizados desde o início do século XX, somente na década de 1960, o ciclo biológico do parasito foi elucidado, ao demonstrar estágios infecciosos de *T. gondii* nas fezes de gatos, e que estes poderiam transmiti-los a hospedeiros intermediários (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

Existem duas principais vias de transmissão da doença para os seres humanos: (1) ingestão oral acidental de alimentos ou água contaminados com oocistos infecciosos, ou o consumo de carne crua ou malcozida contendo cistos teciduais (bradizoítos); e (2) a transmissão transplacentária ao feto durante uma infecção primária em uma mulher grávida. Destes modos de transmissão, a via oral é considerada mais comum (ZHOU et. al., 2009).

Após a ingestão por hospedeiros intermediários, os oocistos ou cistos ingeridos são lisados durante a digestão liberando formas infectantes (esporozoítos e bradizoítos, respectivamente) que penetram no epitélio intestinal. Nos hospedeiros intermediários, ocorre no interior das células intestinais a diferenciação para a forma taquizoíto, de proliferação rápida, permitindo a disseminação do protozoário por todo organismo. Ao penetrar nas demais células do organismo, os protozoários se diferenciam para uma forma de reprodução lenta (bradizoítos) e formam cistos comumente encontrados no cérebro ou musculatura dos hospedeiros intermediários. Nestes animais é observada reprodução assexuada do *T. gondii*, através do processo conhecido como endodiogenia (ROBERT-GANGNEUXA; DARDÉ, 2012).

Já nos felídeos, no interior do epitélio intestinal ocorre a formação de um esquizonte contendo a forma merozoíto do protozoário. Há o rompimento da célula liberando os merozoítos que colonizam novas células epiteliais formando gametas masculinos e femininos (microgameta e macrogameta, respectivamente). Os microgametas são móveis, e fecundam os macrogametas formando zigotos, originando oocistos que serão liberados nas fezes dos felídeos, e contaminam o solo, a água, e os vegetais (ROBERT-GANGNEUXA; DARDÉ, 2012). A reprodução do protozoário nos felídeos consiste na fase sexuada do ciclo de vida do parasito (Figura 1).

Todos os três estágios são infectantes tanto para os hospedeiros intermediários, como para os hospedeiros definitivos, os quais adquirem toxoplasmose principalmente através da transmissão horizontal – ingestão de oocistos esporulados no ambiente.

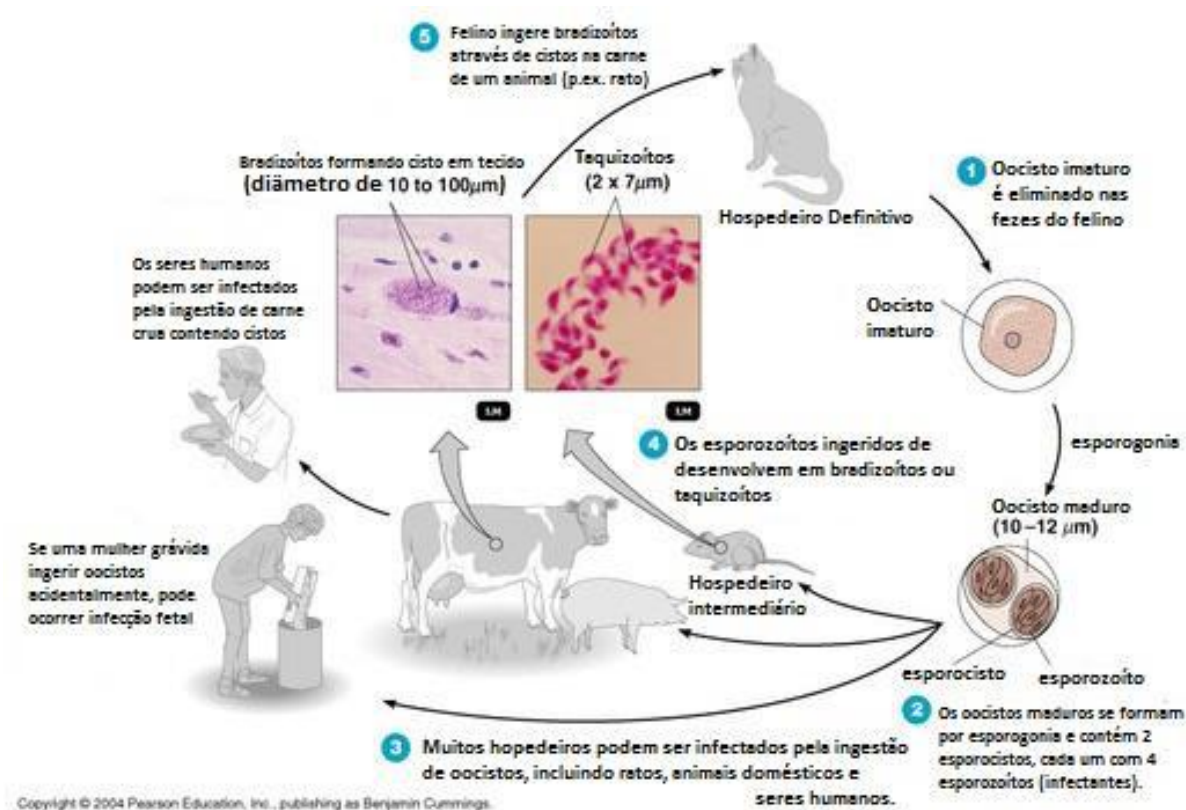


Figura 1. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*. As fotografias apresentam imagens de bradizoítos (formando cistos) e taquizoítos em microscopia ótica. Fonte: TORTORA; FUNKE; CASE, 2004, p. 662.

Em apenas 20% dos casos a infecção aguda pelo *T. gondii* apresenta sintomas como febre, dores musculares, e linfadenopatia; na maioria dos casos não são observados sintomas nos indivíduos saudáveis. Com a formação dos cistos nos tecidos inicia-se a fase crônica da doença. Indivíduos imunocomprometidos podem ser contaminados por este protozoário ou apresentarem uma reativação da infecção crônica, levando à toxoplasmose generalizada ou à encefalite. (ROBERT-GANGNEUXA; DARDÉ, 2012)

T. gondii apresenta três formas evolutivas citadas anteriormente na descrição do seu ciclo de vida (taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos); algumas destas formas podem ser observadas nas Figuras 1 e 2. A observação através de microscopia eletrônica revela a presença de diversas organelas e estruturas celulares, algumas delas típicas do filo Apicomplexa (Figura 2). Os taquizoítos (Figura 2A) apresentam forma de arco e núcleo central; na região mais afilada encontra-se o complexo apical, formado pelo conóide, anel polar, micronemas, roptrias, e grânulos densos. A principal diferença estrutural entre estes e os bradizoítos (Figura 2B) é a posição do núcleo, na extremidade oposta ao complexo apical.

As diferentes formas evolutivas possuem diferenças em algumas organelas e estruturas que desempenham papéis críticos nos processos de movimentação, adesão e invasão da célula hospedeira. Nesses processos estão envolvidos os antígenos de superfície (SAG), e proteínas presentes em organelas do complexo apical, como as proteínas de micronemas (MIC), proteínas de roptrias (ROP e RON) e proteínas de grânulos densos (GRA) (CARVALHO et. al., 2008; HOLEC-GAŞIÖR; KUR, 2010).

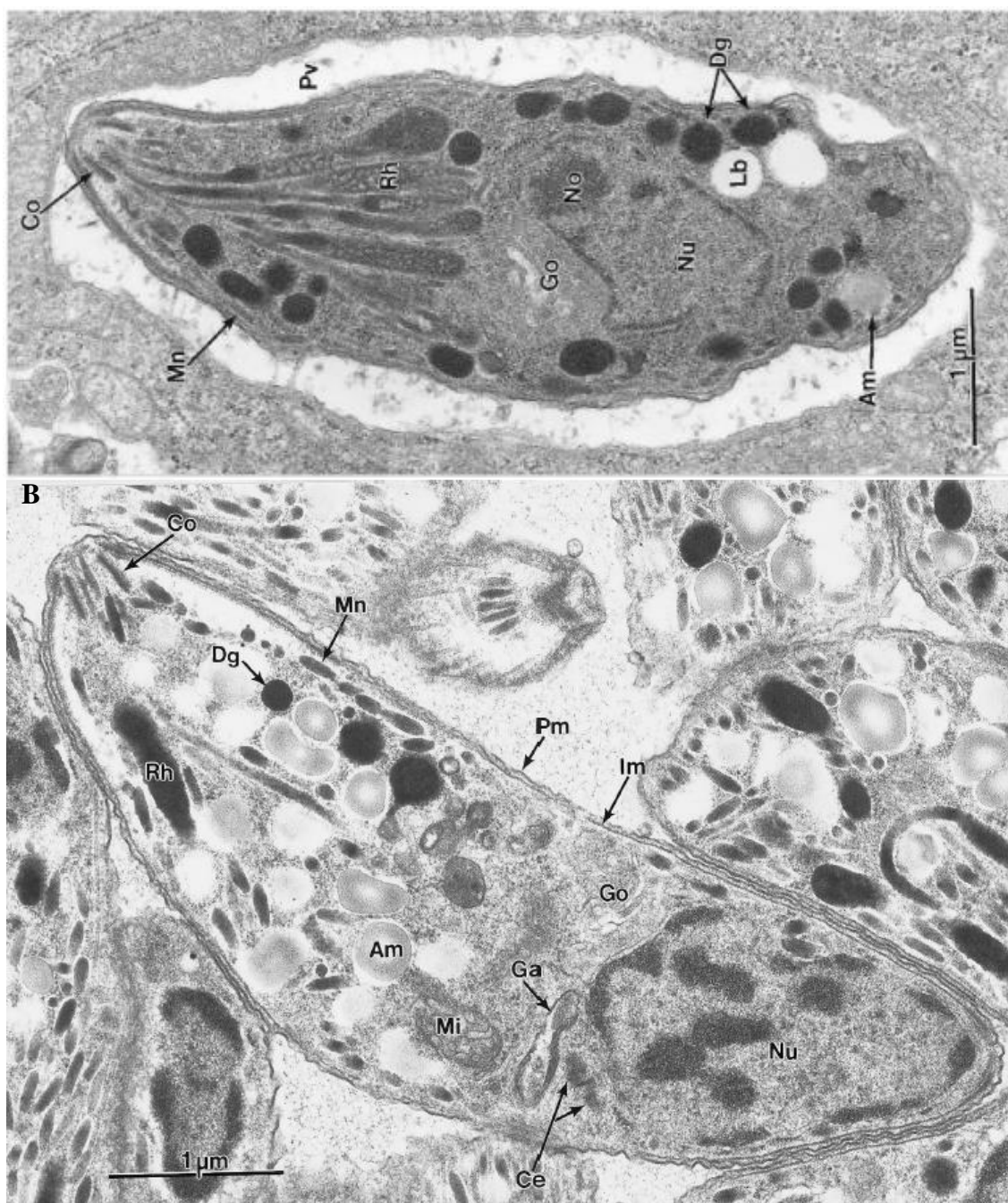


Figura 2. Fotomicrografia eletrônica das diferentes formas de *T. gondii*. A – Taquizoíto; B – Bradizoíto. Am – grânulo de amilopectina; Ce – centríolos; Co – conoide; Dg – grânulo eletrodense; Ga – apicoplasto; Go – complexo de Golgi; Im – complexo de membranas internas; Mi - mitocôndria; Mn – Micronema; No – nucléolo; Nu – núcleo; Pv – vacúolo parasitóforo; Pm – plasmalema; Rh – róptria. Fonte: DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998.

Os antígenos de superfície (SAGs - *surface antigens*) são proteínas ancoradas por glicosilfosfatidilinositol (GPI) na superfície do *T. gondii* e desempenham a função de ligantes que permitem a adesão do parasito à célula hospedeira. O subtipo SAG1 (30 kDa) é predominante na superfície de taquizoítos e já está sendo utilizada em testes diagnósticos (CARVALHO et al., 2008) e vacinais (LIU et al., 2008).

As proteínas do micronema estão associadas aos processos de adesão e invasão na célula hospedeira. Já foram descritas várias proteínas de micronemas apresentando domínios do tipo: *integrina-like*, *trombospondina-like*, fator de crescimento epidermal-like e lectina-like, semelhantes às proteínas adesivas encontrada em vertebrados (BEGHETTO et al., 2006).

As roptrias são organelas em forma de bastão encontradas na região anterior de *T. gondii* apresentando atividade enzimática (proteíno-quinases, fosfatases e proteases) em número aproximado de 30 (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998). As proteínas de roptrias são encontradas tanto no gargalo (proteínas RON) como no bulbo (proteínas ROP) destas organelas, e são liberadas durante a invasão e formação do vacúolo parasitóforo na célula hospedeira.

Os grânulos densos são organelas envolvidas na maturação do vacúolo parasitóforo, caracterizadas por nanotubos membranosos (HOLEC-GAŞIOR; KUR, 2010). As proteínas de grânulos densos (GRA) são as principais porções de antígenos excretórios/secretórios de *T. gondii*, estando associadas à construção da rede membranosa intravacuolar que permite a interação do parasito com a célula hospedeira (PRIGIONE et al., 2000).

2.2 Toxoplasmose congênita

A transmissão materno-fetal da toxoplasmose pode ocorrer quando a gestante é infectada ou quando ocorre reagudização de uma infecção crônica durante a gestação. Quando uma destas situações se apresenta no primeiro trimestre da gestação, a transmissão para o feto ocorre em menos de 10% dos casos; já no segundo trimestre a transmissão ocorre em até 23% dos casos; no terceiro trimestre a transmissão ocorre em até 70% dos casos (NEVES et al., 2004; AMENDOEIRA; CAMILLO-COURA, 2010).

Em mulheres adultas, a prevalência de positividade pode variar entre 51% e 72% na América Latina, 54% a 77% na África Ocidental, 4% a 39% no sudeste asiático, 58% nos países europeus e 15% na América do Norte (RORMAN et al., 2006).

As consequências da infecção para o feto dependem do período em que ocorreu a transmissão. Em cerca de 80% dos casos, a transmissão ocorre no terceiro trimestre, e os fetos são assintomáticos. Quando a transmissão ocorre no segundo trimestre a gravidade da infecção fetal é variável; o feto pode apresentar hepatoesplenomegalia, calcificações cerebrais e coriorretinite (NEVES *et. al*, 2004).

As consequências mais graves são observadas quando a infecção ocorre no primeiro trimestre de gestação, envolvendo anormalidades no cérebro e olhos, e aumentando o risco de aborto. Pode ser observada hidrocefalia, calcificações cerebrais, retardo, convulsões, microcefalia, surdez e deficiência psicomotora. Já as alterações oftálmicas incluem microftalmia, catarata, estrabismo, coriorretinite (NEVES *et. al*, 2004).

O cuidado com os indivíduos afetados pelas consequências mais graves da toxoplasmose gera grande impacto socioeconômico para a população, fazendo com que o diagnóstico rápido desta infecção na gestante e no feto seja de extrema importância. No Brasil é rotina a realização de teste sorológico da gestante para determinação de anticorpos do tipo IgM, IgG e o teste de avidéz da IgG; dependendo dos resultados também são realizados testes utilizando material fetal.

2.3 Diagnóstico da Toxoplasmose

Um teste padrão ouro para o diagnóstico da toxoplasmose é a técnica de inoculação em camundongos. Amostras de material infectado são inoculadas no peritônio de camundongos suíços, que preferencialmente devem ser imunossuprimidos. Podem ser utilizados como inóculo diversos tipos de fluídos corporais e tecidos, que previamente devem ser tratados com ácido e digeridos com pepsina. A utilização desta técnica tem diminuído devido ao seu alto custo, aos riscos envolvidos (pela presença de organismos viáveis) e também pelo tempo necessário para sua execução; técnicas de execução mais rápida, como as de diagnóstico sorológico e molecular, têm sido mais empregadas nos últimos anos (LIU *et. al.*, 2015; WYROSDICK; SCHAEFER, 2015).

2.3.1 Métodos sorológicos

Durante a infecção aguda, após um período de incubação de cerca de uma semana, inicia-se a produção de anticorpos da classe IgM, que pode perdurar por vários meses; também já foi descrita a produção de IgA e IgE durante esta fase. Em seguida inicia-se a produção de IgG, que indica infecção/contato com o parasita, mas não possibilita precisar quando ocorreu a infecção.

Grande parte dos testes sorológicos permite a detecção de todos os tipos de anticorpos; mas alguns são específicos para a detecção de IgM e IgG. A partir da presença ou ausência destes anticorpos é possível estabelecer perfis para os pacientes (Tabela 1).

Tabela 1. Perfis sorológicos dos pacientes. Adaptado de ROBERT-GANGNEUXA; DARDÉ, 2012.

Perfil	Teste sorológico para IgG	Teste sorológico para IgM
Infecção crônica / imunidade	positivo	negativo
Infecção recente ou aguda	positivo	positivo
Infecção aguda	negativo	positivo
Susceptível	negativo	negativo

Vários métodos podem ser usados para detecção dos anticorpos, como por exemplos a imunocromatografia, o *Western Blot* e a reação de Sabin Feldman. Esta reação envolve a neutralização dos parasitas vivos (na forma taquizoíto) por anticorpos do soro dos pacientes, e pode detectar todos os tipos de anticorpos; este método é considerado como um teste padrão ouro para diagnóstico da toxoplasmose (LIU et. al., 2015). Alguns outros métodos de diagnóstico sorológico serão descritos a seguir.

2.3.1.1 Hemaglutinação indireta

Para realização deste teste, os eritrócitos são tratados com ácidos ou outras substâncias químicas que adsorvem antígenos; na presença de soro contendo anticorpos anti-toxoplasma ocorre aglutinação. Este método não permite a detecção de IgG e IgM logo no início da infecção e por isso não é adequado para o diagnóstico da toxoplasmose congênita, em que a rapidez é importante para diminuir os riscos de anormalidades no feto (LIU et. al., 2015).

2.3.1.2 Imunofluorescência indireta

Neste método, os parasitas na forma taquizoíto são fixados e incubados com o soro do paciente, e em seguida é adicionado um anticorpo secundário conjugado com marcador fluorescente, que reconhecem os anticorpos presentes no soro. A análise das amostras é feita utilizando microscópio de fluorescência (LIU et. al., 2015).

2.3.1.3 Aglutinação por Imunoabsorção

Neste teste anticorpos anti IgM humanos são incubados com soro dos pacientes e taquizoítos de *T. gondii*. Se há anticorpos anti-toxoplasma no soro ocorre aglutinação (LIU et. al., 2015).

2.3.1.4 ELISA e Teste de avidéz

Neste teste uma placa de 96 poços é sensibilizada com antígenos de *T. gondii*; em seguida é adicionado o soro dos pacientes e anticorpos secundários conjugados à peroxidase, que reconhecem os anticorpos presentes no soro do paciente. Caso haja ligação antígeno-anticorpo é formado um produto colorido, quantificado em espectrofotômetro, o que permite avaliar os títulos dos anticorpos. Uma variação deste teste é o imunoenensaio por fluorescência ou ELFA, cujo sistema de detecção utiliza anticorpos secundários fluorescentes. (LIU et. al., 2015)

A metodologia de ELISA também pode ser utilizada para realizar o teste de avidéz para IgG. Este teste permite diferenciar entre infecção aguda e crônica; na infecção aguda os anticorpos apresentam baixa especificidade em relação aos antígenos e, portanto baixa avidéz; com a progressão para infecção crônica os anticorpos tornam-se mais específicos e apresentam maior avidéz. Para realização deste teste o soro é tratado como agentes desnaturantes, como por exemplo, a ureia; estes agentes promovem a dissociação entre o anticorpo e o antígeno, e anticorpos com menor avidéz dissociam-se mais facilmente dos antígenos do que aqueles anticorpos com maior avidéz (LIU et. al., 2015).

2.3.2 Diagnóstico molecular

As técnicas de diagnóstico molecular permitem a detecção da presença do parasita através da identificação de seu DNA por PCR ou PCR em tempo real. Esta detecção só é possível em algumas situações, como por exemplo, em indivíduos imunocomprometidos, em que se pode realizar o diagnóstico utilizando amostras de sangue; ou ainda em casos de toxoplasmose ocular, em que são utilizadas amostras de humor aquoso para o diagnóstico molecular.

As principais aplicações das técnicas de diagnóstico molecular incluem a avaliação do risco de transmissão materno-fetal da toxoplasmose, através da análise do líquido amniótico, e o diagnóstico da toxoplasmose congênita, realizado através da análise de DNA extraído da placenta ou do cordão umbilical do recém-nascido. (SAADATNIA; GOLKAR, 2012)

2.3.2.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O diagnóstico molecular da toxoplasmose utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR) foi desenvolvido primeiramente em 1989 sendo utilizado principalmente para diagnóstico pré-natal da toxoplasmose e em indivíduos imunocomprometidos (LIU et. al., 2015). Vários genes alvo já foram utilizados, tais como o gene B1, um fragmento repetitivo de 529 pb, o gene para o RNA ribossomal 18S, dentre outros.

Este método de diagnóstico representou um grande avanço no diagnóstico da toxoplasmose, já que é realizada de forma direta e num tempo curto, e pode permitir a detecção do DNA de até um parasita em um lizado celular, mesmo na presença do DNA de 100.000 células humanas (BURG et. al., 1989). Sua sensibilidade varia entre 70 e 95%, inclusive com o tempo de gestação, sendo maior no período entre 17 e 21 semanas (SAADATNIA; GOLKAR, 2012). A utilização de alvos que contém múltiplas cópias no genoma do parasita (LIU et. al., 2015) pode permitir o aumento de sua sensibilidade. Uma outra melhoria poder ser alcançada através da amplificação de sequencias pequenas dos alvos, que aumenta eficiência da PCR (SU et. al., 2010). Embora apresente alta especificidade (próxima de 100%), considera-se necessário verificar a sequência amplificada através de técnicas como *Southern Blot* ou PCR-ELISA.

Também é utilizada uma variação desta técnica, denominada *nested-PCR*, em que são realizadas duas reações de PCR; na primeira reação utiliza-se um par de iniciadores mais externos e na segunda reação um novo par de iniciadores (mais internos) que amplifica o produto da primeira reação. Por esta razão, normalmente a técnica de *nested-PCR* apresenta maior sensibilidade do que a PCR convencional. Vários alvos já foram testados utilizando esta estratégia, incluindo o gene B1, o fragmento repetitivo de 529 pares de base e as sequências ITS1 (LIU et. al., 2015).

2.3.2.2 PCR em tempo real

A PCR em tempo real também pode ser usada para o diagnóstico da toxoplasmose; este método alia o procedimento de amplificação com a detecção dos produtos amplificados, através da utilização de sonda fluorescente, e permite a detecção de baixas concentrações do DNA do parasita (SAADATNIA; GOLKAR, 2012). Assim como no caso do diagnóstico por PCR, vários genes alvo já foram utilizados, incluindo os genes B1 e o fragmento de 529 pb (LIU et. al., 2015).

Esta técnica apresenta várias vantagens em relação à PCR convencional; é menos laboriosa, já que envolve apenas uma etapa, fornecendo resultados em cerca de duas horas; e por não ter manipulações posteriores ao preparo da reação, diminui a chance de contaminação (CALDERARO et. al., 2006). Além disso esta técnica dispensa a necessidade de confirmação das sequencias amplificadas, quando é utilizada uma sonda fluorescente específica para uma região dos fragmentos amplificados.

Este método proporciona também a quantificação do DNA do parasita por comparação com padrões, permitindo acompanhar o progresso da infecção. Uma vantagem da possibilidade de quantificação é permitir a avaliação da reprodutibilidade e a padronização (SU et. al., 2010). Com a utilização de kits para extração do DNA, ou ainda explorando a automação, esta técnica pode proporcionar a redução da variabilidade nos testes diagnósticos (LIU et. al., 2015).

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Padronizar a metodologia da PCR em tempo real para realizar o diagnóstico molecular da toxoplasmose congênita.

3.1 Objetivos Específicos

- Utilizar o método padronizado para a análise de DNA extraído de amostras de líquido amniótico coletado das gestantes acompanhadas no serviço de pré-natal do Instituto Nacional Fernandes Figueira que apresentaram quadro de toxoplasmose aguda.
- Comparar os resultados obtidos na análise de amostras positivas e negativas utilizando as técnicas de PCR em tempo real e *nested*-PCR.
- Correlacionar os resultados encontrados com os dados sobre os testes sorológicos realizados previamente nas pacientes, obtidos através da análise de seus prontuários.
- Descrever os achados clínicos dos recém-nascidos que tiveram os resultados do PCR em tempo real e *nested*-PCR positivos.

4 Material e Métodos

4.1 Extração e quantificação de DNA

Amostras de líquido amniótico de gestantes atendidas pelo serviço de pré-natal do Instituto Nacional Fernandes Figueira, com suspeita clínica de toxoplasmose aguda foram enviadas ao Laboratório de Alta Complexidade, e testes para diagnóstico molecular da toxoplasmose foram realizados. Estas amostras foram registradas, tomando-se o nome da paciente, a idade, o tempo de gestação e o número do prontuário; até o momento foram analisadas 50 amostras de líquido amniótico.

A primeira etapa consistia na extração de DNA, realizada utilizando o kit de extração QIAamp DNA mini Kit (QIAGEN Inc, Valencia, US). Para cada amostra, foram preparadas três alíquotas de 200 µl em tubos *Eppendorf* de 1,5 ou 2 ml de capacidade; a estas alíquotas foram acrescentadas Proteinase K (20 µl) e 200 µl de Tampão de lise AL. Em seguida as amostras foram vortexadas por 15 segundos e então incubadas a 56°C por 10 minutos; ao final da incubação as amostras foram centrifugadas por alguns segundos para remover gotículas da porção superior do tubo, e então foi adicionado etanol absoluto (200 µl).

As amostras foram vortexadas e novamente centrifugadas por alguns segundos, e todo o material foi aplicado nas colunas *QIAamp Mini spin column*, previamente inseridas em tubos coletores. O conjunto foi centrifugado a 8000 rpm por 1 minuto; após a centrifugação, o tubo coletor e seu conteúdo foram descartados, e a coluna foi inserida em um novo tubo coletor. Em seguida adicionava-se à coluna 500 µl de Tampão AW1, e o sistema foi novamente centrifugado a 8000 rpm por 1 minuto; após esta etapa o conteúdo do tubo coletor foi descartado, adicionava-se à coluna 500 µl de Tampão AW2, e o sistema foi novamente centrifugado, desta vez a 14000 rpm por 3 minutos. Após o descarte do conteúdo do tubo coletor, foi realizada nova centrifugação a 14000 rpm por 1 minuto.

As colunas foram transferidas para tubos *Eppendorf* de 1,5 ou 2 ml de capacidade, e o DNA foi eluído da coluna: primeiramente adicionava-se 50 µl de Tampão de eluição AE (incubando-se por 5 minutos à temperatura ambiente) e em

seguida o conjunto foi centrifugado a 8000 rpm por 1 minuto. As colunas foram descartadas e o eluato obtido foi quantificado.

Para a quantificação utilizou-se o espectrofotômetro *NanoDrop 2000c*; foram utilizados 2 µl de tampão AE como branco, para determinar a absorbância zero nesta medição. Em seguida foram utilizados 2 µl de cada amostra para quantificação, que comumente produz valores de aproximadamente 1 ng/µl de DNA por amostra.

4.2 PCR em tempo real

4.2.1 Curva padrão

Um experimento de PCR em tempo real possibilita a quantificação das amostras, realizada em comparação com os dados de uma curva padrão. Para construção da curva padrão, uma amostra contendo 5×10^6 parasitas foi alíquotada em triplicata e submetida ao protocolo de extração de DNA descrito anteriormente. O material obtido foi quantificado e o tubo 2 foi selecionado para uso, sendo submetido à diluição seriada. Para compor a diluição de 10^6 , 100 µl do DNA do tubo 2 foi transferido para um tubo *Eppendorf* de 2 ml. Deste tubo foram retirados 10 µl, que foram adicionados em um tubo *Eppendorf* contendo 90 µl de água, para obter a diluição de 10^5 . Este procedimento foi repetido para obter as diluições de 10^4 , 10^3 , 10^2 e 10^1 . Não foi utilizada a diluição de 1 porque a quantidade de DNA estimada ficaria abaixo do limite de detecção para as técnicas utilizadas.

Foram preparadas reações em triplicata utilizando 1 µl de cada ponto da curva, mais 1 µl de água, 1 µl de *Mix primer probe* e 3 µl de *TaqMan® Real-Time PCR Master Mix* duas vezes concentrado, totalizado 6 µl. Em seguida as reações foram incubadas no equipamento *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR* por cerca de 90 minutos, tempo necessário para a realização de um primeiro estágio, em que as amostras foram incubadas a 50°C por 2 minutos, e em seguida por 10 minutos a 95°C, e do segundo estágio, que consistia em 40 repetições do seguinte ciclo: 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. Ao final da corrida, realizava-se a análise dos dados através do *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Software*.

4.2.2 PCR em tempo real pelo sistema *TaqMan® Real-Time PCR*

As amostras de DNA extraído do líquido amniótico das pacientes foram em seguida utilizadas em reações de PCR em tempo real, utilizando o sistema *TaqMan®*

Real-Time PCR. Neste sistema, como em qualquer reação de PCR, são utilizados iniciadores específicos para amplificar a sequência de interesse. Além destes, é utilizado um terceiro oligonucleotídeo específico, denominado sonda, complementar a uma parte da região que será amplificada. Na extremidade 5' da sonda está ligado um corante fluorescente (repórter), e na extremidade 3' está ligado um composto denominado *quencher*, que absorve a energia do repórter. Apenas quando ocorre amplificação, a polimerase, através de sua atividade de exonuclease, degrada a sonda; o composto repórter fica livre, provocando emissão de fluorescência, que aumenta com a quantidade de produto gerado e é detectada pelo equipamento de PCR em tempo real (HEID et. al., 1996).

Neste trabalho, foi escolhido como alvo o fragmento de 529 pb, presente em 200 a 300 cópias no genoma de *T. gondii*, e que por isso proporciona a detecção de pequenas quantidades no DNA do parasito—em torno de 20fg de DNA, apresentando sensibilidade maior do que ensaios semelhantes para o gene B1 (REISCHL *et al*, 2003). Foram utilizados os pares de iniciadores 318R e 270F, e uma sonda, cuja sequência está apresentada no Quadro 1, e para os quais foi descrito por Robert-Gangneux et. al. (2010) uma sensibilidade de 71 % e uma especificidade de 97 %.

Quadro 1. Conjunto de iniciadores utilizados nas reações de PCR em tempo real.

Primers e sonda utilizados para PCR em tempo real
Primers
270F 5' - AGAGACACCGGAATGCGATCT -3'
318R 5' - TTCGTCCAAGCCTCCGACT - 3'
Sonda
FAM 5' - TCGTGGTGATGGCGGAGAGAATTGA - 3' TAMRA

Para as reações de PCR em tempo real, primeiramente foi preparado o *Mix primer probe*, uma mistura de água (95,75 µl), dos iniciadores 270F e 318R (Quadro 1), específicos para o fragmento de 529pb (1,5 µl de cada iniciador), e 1,25 µl da sonda marcada com os corantes fluorescentes FAM (6-carboxyfluoresceína, repórter) e TAMRA (carboxitetrametilrodamina, *quencher*). Nesta mistura a concentração dos iniciadores e da sonda foi de 1,5 µM e 1,25 µM, respectivamente.

Foi utilizado como controle interno RNase P, um gene *housekeeping* que é constitutivamente expresso em humanos. Para tanto, é utilizada a mistura 20x *RNaseP Primer Probe* da *Applied Biosystems*, contendo iniciadores específicos para o gene da

RNAse P, e uma sonda específica marcada com o corante fluorescente VICTM (repórter) e TAMRA (carboxitetrametilrodamina, *quencher*). Foram utilizados 2 µl do DNA extraído do líquido amniótico das pacientes, aos quais se adicionava 1 µl de *Mix primer probe*, 0,5 µl do *mix* RNAse P e 3,5 µl de *TaqMan® Real-Time PCR Master Mix*. Com a adição da RNAseP o volume final passou a ser de 7 µl.

Em cada experimento, foram incluídos um controle positivo (DNA do parasito) e um controle negativo, sem qualquer amostra de DNA. O Quadro 2 resume o preparo das diferentes reações realizadas. Todas as reações, com DNA de pacientes, controles positivos ou negativos, foram feitas em triplicata, e geralmente eram acondicionadas em duas ou três *strips* de tubos de 200 µl.

Quadro 2. Mistura reacional utilizada nas reações de PCR em tempo real.

Reação de PCR em tempo real (volume total 7 µl)			
Componentes	Amostras	Controle positivo	Controle negativo
DNA do liquido Aminiótico	2 µl	-----	-----
DNA do parasito	-----	1 µl	-----
Água	-----	1 µl	2 µl
<i>Mix primer probe</i>	1 µl	1 µl	1 µl
<i>Mix</i> RNAse P (20x)	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
<i>Taqman Master Mix</i> (2x)	3,5 µl	3,5 µl	3,5 µl

Em seguida as reações foram incubadas no equipamento *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR* por cerca de 90 minutos, tempo necessário para a realização de um primeiro estágio, em que as amostras foram incubadas a 50°C por 2 minutos, e em seguida por 10 minutos a 95°C, e do segundo estágio, que consistia em 40 repetições do seguinte ciclo: 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. Ao final da corrida, realizava-se a análise dos dados através do *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Software*, gerando gráficos de amplificação, tabelas com os valores de C_t (ciclo em que a fluorescência da amostra ultrapassa o nível esperado para o *background*) de cada amostra, dentre outros, que podiam ser exportados em diferentes tipos de arquivos.

4.3 *Nested PCR*

A técnica de *nested-PCR* foi utilizada neste trabalho para confirmação dos resultados obtidos através da PCR em tempo real. Foi selecionado como alvo o gene

B1, presente em 35 cópias no genoma de *T. gondii*, e que por isso proporciona a detecção de pequenas quantidades no DNA do parasito—de 5 a 10 parasitos ou 640fg de DNA (BURG et. al., 1989; LIU et. al., 2015). Foram utilizados os pares de iniciadores B22 e B23, JW62 e JW63, cuja sequência é apresentada no Quadro 3, e para os quais foi descrito por Okay et. al. (2009) uma sensibilidade de 98,3 % e uma especificidade de 90,2 %.

Para a primeira reação, 15 µl de DNA do paciente (na concentração de cerca de 1ng/ µl) foram misturados com 4,05 µl de água, 2,5 µl de tampão 10x para enzima *Taq Platinum*, 0,75 µl de cloreto de magnésio 50mM, 0,5 µl de dNTP mM, 1 µl de cada um dos iniciadores JW62 e JW63 e 0,2 µl da enzima *Taq Platinum*; o volume final da reação foi de 25 µl. Estas reações foram incubadas no termociclador, utilizando uma programação em três estágios: no primeiro estágio a amostra foi incubada a 94°C por 5 minutos; o segundo estágio consistia em 40 repetições do seguinte ciclo: 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 63°C e 45 segundos a 72°C; no terceiro estágio a amostra foi incubada a 72°C por 5 minutos.

Para a segunda reação, utilizou-se 1 µl do produto da primeira reação com 18,05 µl de água, 2,5 µl de tampão 10x para enzima *Taq Platinum*, 0,75 µl de cloreto de magnésio 50mM, 0,5 µl de dNTP mM, 1 µl de cada um dos iniciadores B22 e B23 e 0,2 µl da enzima *Taq Platinum*; o volume final da reação foi de 25 µl. Estas reações foram incubadas no termociclador, utilizando uma programação em três estágios: no primeiro estágio a amostra foi incubada a 94°C por 5 minutos; o segundo estágio consistia em 40 repetições do seguinte ciclo: 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 63°C e 45 segundos a 72°C; no terceiro estágio a amostra foi incubada a 72°C por 5 minutos.

Quadro 3. Conjunto de iniciadores utilizados nas reações de *nested* PCR.

Primers utilizados para <i>nested</i> PCR
JW63 5'- GCACCTTTCGGACCTCAACAACCG -3'
JW62 5'- TTCTCGCCTCATTCTGGGTCTAC -3'
B22 5' – AACGGGCGAGTAGCACCTGAGGAGA -3'
B23 5'- TGGGTCTACGTCGATGG ATGACAACT -3'

Ao final da segunda reação as amostras foram analisadas em géis de agarose 1,5%, e fotografadas em câmara digital *Kodak Digital Science Electrophoresis Documentation and Analysis System*, sendo, portanto, digitalizadas para o software *Kds1d*, e em seguida salvas no formato desejado.

5 Resultados e Discussão

5.1 Curva Padrão

A amplificação das amostras da curva padrão produziu dados processados através do *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Software*, apresentados a seguir. A Tabela 2 apresenta os valores de C_t (*threshold cycle*). O C_t significa o ciclo em que ocorre a intersecção entre uma curva de amplificação e uma linha de limiar (background) para cada amostra; como cada amostra foi feita em triplicata, é apresentada a média e o desvio padrão dos valores de C_t . Amostras referentes aos pontos 10^4 , 10^3 , 10^2 da curva apresentaram erros, e assim foram computados apenas dois valores para cada um destes pontos.

Tabela 2. Dados da curva padrão: C_t , médias e desvio padrão.

Diluição do DNA do parasito	C_t	Média dos valores de C_t	Desvio padrão
10^6	16,47525	16,27456	0,184247
	16,23539		
	16,11305		
10^5	19,48619	19,52632	0,128804
	19,42235		
	19,67041		
10^4	23,073	23,16061	0,1239
	23,073		
10^3	26,84398	26,69527	0,210309
	26,54656		
10^2	32,68515	32,54797	0,194005
	32,41079		

O Gráfico 1 apresenta a curva padrão gerada a partir destes dados, sendo no eixo x a concentração do DNA do parasito (em escala logarítmica) e no eixo y os valores de C_t obtidos, esta curva apresenta coeficiente angular de -3,94XXX e coeficiente de relação linear de 0,986.

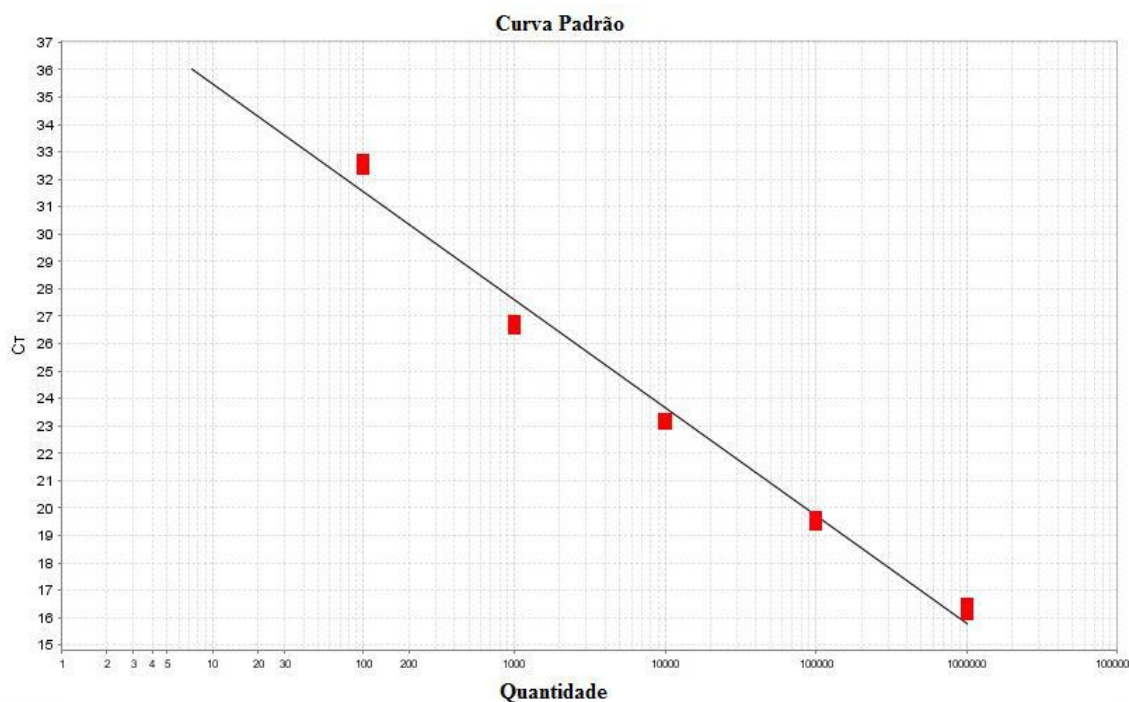


Gráfico 1. Curva padrão. Eixo x - concentração do DNA de *T.gondii* (escala logarítmica); eixo y - valores de C_t .

Para possibilitar a quantificação de amostras nas reações de PCR em tempo real, é necessário que em cada experimento seja utilizada uma série de diluições de uma amostra padrão; são recomendadas entre 5 e 8 diluições, processadas em triplicata (LARIONOV; ANDREAS; WILLIAM, 2005). Este padrão foi adotado neste trabalho, em que a curva padrão foi obtida através da análise em triplicata de cinco diluições seriadas da amostra padrão de DNA de *T. gondii*.

Além dos cuidados na preparação do experimento, os dados gerados devem estar em conformidade com alguns parâmetros para permitir a quantificação correta das amostras a partir da curva padrão. Um destes parâmetros é o desvio padrão, que reflete o desvio dos valores de C_t de cada tubo da triplicata em relação ao valor da média dos C_t s. Os valores de desvio padrão costumam seguir uma distribuição normal, o que significa que 68% das medidas equivalem à média \pm o desvio padrão; para englobar mais valores, deve-se considerar os intervalos média \pm 2x desvio padrão (95% dos valores) ou média \pm 3x desvio padrão (99,7 % dos valores). Idealmente, deve-se englobar a maior parte dos valores (99,7%), e por isso o valor ideal do desvio é de até 0,167 (1/6, em que seis equivale aos desvios para baixo e para cima da média). Os dados apresentados na Tabela 2 permitem observar que os valores do desvio padrão para as amostras com concentração de 10^5 e 10^4 apresentam-se dentro deste limite; os valores do desvio padrão para os demais pontos da curva estão até 0,05 maiores que o

valor ideal de 0,167. Possivelmente este aumento da variação entre as triplicatas de cada ponto está associado aos pequenos volumes utilizados, o que aumenta a possibilidade de erros de pipetagem (THERMO FISHER SCIENTIFIC).

O software do aparelho *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR* calcula o coeficiente de relação linear, e para esta curva indicou o valor de 0,986, bem próximo do valor ideal (>0,99). Novamente, este índice poderia ser melhorado com o aumento dos volumes e redução de erros de pipetagem.

Outro parâmetro importante é a eficiência; idealmente a eficiência da PCR em tempo real deveria ser de 100%, ou seja, ao final de cada ciclo a quantidade de produto deveria dobrar. A eficiência da curva padrão é calculada a partir do coeficiente angular da reta pela fórmula $E = 10(-1/\text{coeficiente angular}) - 1$; para eficiência igual a 2, o valor do coeficiente angular deve ser de -3.3. A faixa de valores ideais fica entre 90 e 110 % de eficiência, correspondentes a coeficientes angulares entre -3.58 e -3.10. Aplicando o valor do coeficiente angular à equação apresentada, obtém-se um valor de eficiência de 89,70%, bem próximo à faixa de valores ideais (THERMO FISHER SCIENTIFIC).

5.2 PCR em tempo real

A Tabela 3 lista as 50 pacientes analisadas, identificadas através de seu número de cadastro no registro interno das amostras analisadas para detecção de *T. gondii* no Laboratório de Alta Complexidade (NÚMERO PACIENTE), e do número de seu prontuário no Instituto Nacional Fernandes Figueira (PRONTUÁRIO). Se houve amplificação do DNA do parasito no DNA extraído da amostra de líquido amniótico da paciente é apresentado resultado positivo, e se não houve, negativo, na terceira coluna da Tabela 3 (RESULTADO).

Tabela 3. Avaliação da presença do DNA de *Toxoplasma gondii* nas amostras extraídas do líquido amniótico das 50 pacientes.

NÚMERO PACIENTE	PRONTUÁRIO	RESULTADO	NÚMERO PACIENTE	PRONTUÁRIO	RESULTADO
1	177448	NEGATIVO	26	174892	NEGATIVO
2	177810	NEGATIVO	27	182742	NEGATIVO
3	177805	NEGATIVO	28	185131	NEGATIVO
4	178063	NEGATIVO	29	183290	NEGATIVO
5	178619	NEGATIVO	35	173821	NEGATIVO
6	178740	NEGATIVO	36	185021	POSITIVO
7	177666	NEGATIVO	37	184470	NEGATIVO

8	179480	NEGATIVO	39	185552	NEGATIVO
9	178230	NEGATIVO	40	185713	NEGATIVO
10	179214	NEGATIVO	105	186539	NEGATIVO
11	178068	NEGATIVO	106	186368	NEGATIVO
12	179298	NEGATIVO	107	186559	NEGATIVO
13	180005	NEGATIVO	108	187019	NEGATIVO
14	179082	NEGATIVO	109	187187	NEGATIVO
15	179802	NEGATIVO	110	185881	NEGATIVO
16	179801	NEGATIVO	111	188270	NEGATIVO
17	180348	NEGATIVO	112	188390	NEGATIVO
18	180223	NEGATIVO	113	188266	NEGATIVO
19	180025	NEGATIVO	114	188273	NEGATIVO
20	180026	NEGATIVO	115	189057	NEGATIVO
21	181150	NEGATIVO	116	189058	NEGATIVO
22	181165	NEGATIVO	118	188496	POSITIVO
23	181515	NEGATIVO	124	190460	NEGATIVO
24	182261	NEGATIVO	125	190835	NEGATIVO
25	182451	NEGATIVO	126	192649	NEGATIVO

Conforme pode ser observado, apenas duas pacientes apresentaram resultados positivos: número 36 e 118, indicando a presença do parasito no tecido fetal e que houve transmissão materno-fetal da toxoplasmose. Estes dados foram posteriormente confirmados pela técnica de *nested*-PCR (em que ambas apresentaram resultados positivos) e pelas características clínicas observadas em sua prole. Os Gráficos 2 e 3 apresentam os perfis de amplificação para estas amostras, e o Quadro 4 apresenta os valores de C_t , as médias destes valores e desvio padrão para cada amostra.

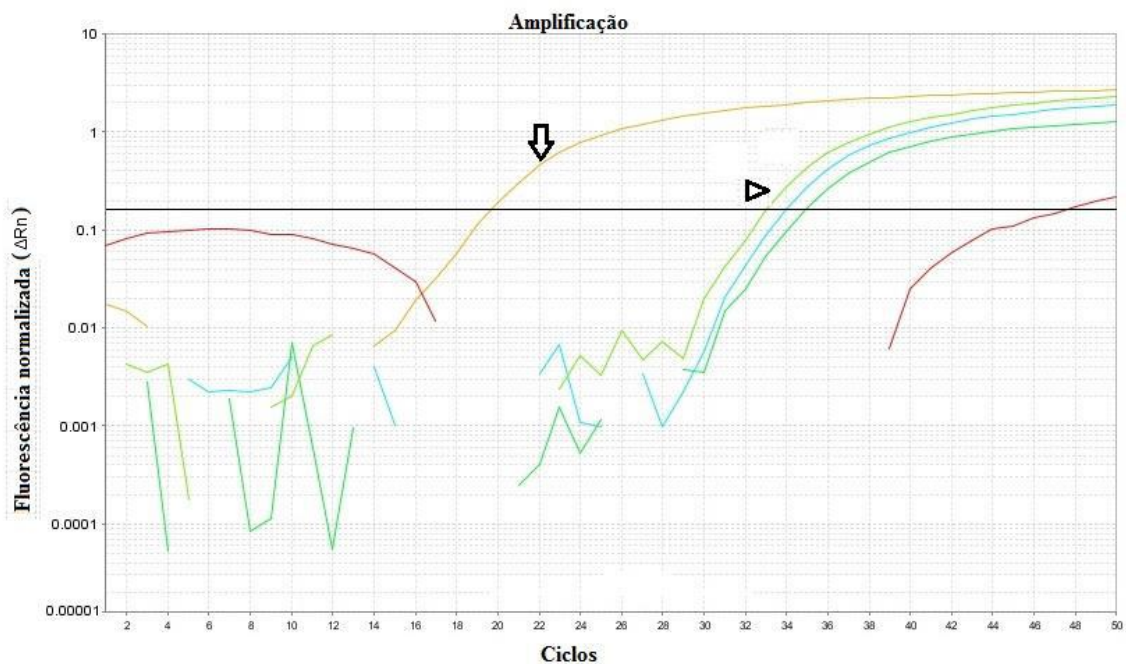


Gráfico 2. Gráfico de amplificação da amostra de DNA extraído do líquido amniótico da paciente 36. Eixo x - ciclos; eixo y – valores de fluorescência normalizada (ΔRn). A seta indica a curva de amplificação do controle, e a cabeça de seta indica as curvas referentes à triplicata da amostra.

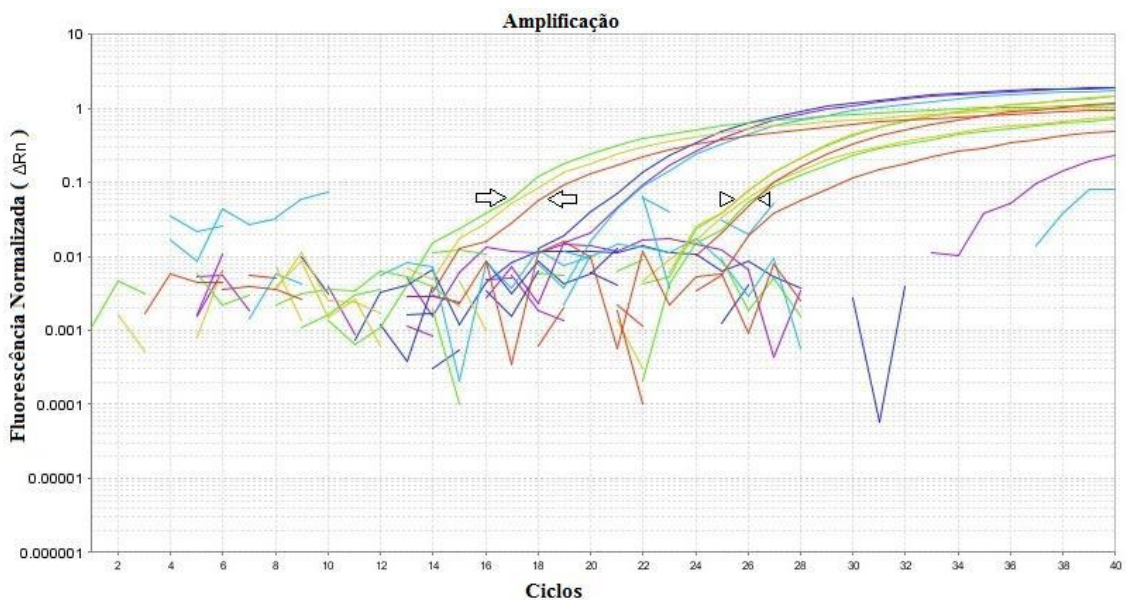


Gráfico 3. Gráfico de amplificação da amostra de DNA extraído do líquido amniótico da paciente 118. Eixo x - ciclos; eixo y – valores de fluorescência normalizada (ΔRn). As três primeiras curvas (entre as setas) correspondem à amplificação da triplicata de amostras, e as três últimas (entre as cabeças de seta) correspondem às curvas de amplificação da triplicata de controles positivos.

Quadro 4. Dados de amplificação das amostras das pacientes 36 e 118.

Paciente 36		Paciente 118	
Valores de C_t	33,0594 34,9579 33,9982	Valores de C_t	17,25738 16,45531 16,09246
Média dos valores de C_t	34,00518	Média dos valores de C_t	16,60172
Desvio padrão	0,949093	Desvio padrão	0,596098
Controle positivo C_t	19,72476	Controle positivo C_t	25,88241

Conforme mencionado anteriormente, a chance de transmissão materno-fetal da toxoplasmose é menor no primeiro trimestre da gestação; isso se deve à maior eficiência da barreira placentária neste período (ROBERT-GANGNEUXA; DARDÉ, 2012; AMENDOEIRA; CAMILLO-COURA, 2010). No segundo e terceiro trimestres, a probabilidade de transmissão aumenta. As gestantes cujo líquido amniótico foi analisado neste trabalho encontravam-se no segundo (41) ou terceiro trimestre (7) de gestação; as duas gestantes que apresentaram resultado positivo, comprovando que houve a transmissão materno-fetal da toxoplasmose, encontravam-se no final do segundo trimestre da gestação (paciente 118, 25 semanas) e no terceiro trimestre (paciente 36, 29 semanas), dado que está em acordo com o citado anteriormente.

Apesar do pequeno número de gestantes apresentando resultados positivos para detecção de *T. gondii* no líquido amniótico, todas apresentavam sorologia positiva em algum momento da gestação, com exceção das pacientes 35 (avaliada por anencefalia do feto) e 29, (dados de sorologia indisponíveis) conforme pode ser observado no Quadro 5. Durante o acompanhamento da gestante no pré-natal, em caso de sorologia positiva para toxoplasmose, é iniciado o tratamento com espiramicina, com o objetivo de evitar a transmissão materno-fetal da toxoplasmose (MONTROYA; REMINGTON, 2008). Os dados aqui apresentados sugerem que esta abordagem foi eficaz em 46 das 48 pacientes com sorologia positiva (95,8%), e sendo assim a transmissão materno fetal da toxoplasmose foi evitada; portanto, a transmissão vertical ocorreu em apenas 4,2 % dos casos. Estes dados estão de acordo com a taxa de infecção congênita observada em dois estudos realizados no Mato Grosso do Sul (4 e 3,9 %) e próximos da taxa de 6% observada no Rio Grande do Sul (SOUZA-JÚNIOR et. al., 2010)

Quadro 5. Dados de sorologia para *Toxoplasma gondii* das 50 pacientes analisadas.

NÚM.	PRONTUÁRIO	SOROLOGIA NOS TRIMESTRES	
1	177448	Positiva para IgG (baixa avidéz) e IgM	Trimestres: 2º e 3º
2	177810	Positiva para IgG e IgM	Trimestres: 2º
3	177805	Positiva para IgG (baixa avidéz) e IgM	Trimestres: 2º e 3º
4	178063	Positiva para IgG (avidéz intermediária) e IgM	Trimestres: 2º
5	178619	Positiva para IgG e IgM	Trimestres: 2º
6	178740	Positiva para IgG (baixa avidéz) e IgM	Trimestres: 2º e 3º
7	177666	Positiva para IgG (baixa avidéz) e IgM	Trimestres: 1º e 2º
8	179480	Positiva para IgG e IgM	Trimestres: 2º
9	178230	Positiva para IgG (avidéz intermediária) e IgM	Trimestres: 1º
10	179214	Positiva para IgG (alta avidéz) e IgM	Trimestres: 2º e 3º
11	178068	Positiva para IgG (baixa avidéz) e IgM	Trimestres: 1º
12	179298	Positiva para IgG (baixa avidéz) e IgM	Trimestres: 1º, 2º e 3º
13	180005	Positiva para IgG (alta avidéz) e IgM	Trimestres: 2º
14	179082	Positiva para IgG (baixa avidéz) e IgM	Trimestres: 1º
15	179802	Positiva para IgG e IgM	Trimestres: 1º e 2º
16	179801	Positiva para IgG (baixa avidéz) e IgM	Trimestres: 2º
17	180348	Positiva para IgG (alta avidéz) e IgM	Trimestres: 1º e 2º
18	180223	Positiva para IgG e IgM	Trimestres: 1º e 2º
19	180025	Positiva para IgG (baixa avidéz) e IgM	Trimestres: 1º e 2º

		IgM	
20	180026	Positiva para IgG (avidez intermediária) e IgM	Trimestres: 1º e 2º
21	181150	Positiva para IgG e IgM	Trimestres: 1º e 2º
22	181165	Positiva para IgG (alta avidez) e IgM	Trimestres: 2º
23	181515	Positiva para IgG (alta avidez) e IgM	Trimestres: 2º e 3º
24	182261	Positiva para IgG (avidez intermediária) e IgM	Trimestres: 1º
25	182451	Positiva para IgG e IgM	Trimestres: 3º
26	174892	Positiva para IgG e negativa para IgM	Trimestres: 2º
27	182742	Positiva para IgG (baixa avidez) e IgM	Trimestres: 2º
28	185131	Positiva para IgG (alta avidez) e IgM	Trimestres: 2º
29	183290	Não há dados de sorologia disponíveis	
35	173821	Negativa para IgG e IgM	Trimestres: 2º e 3º
36	185021	Positiva para IgG (baixa avidez) e IgM	Trimestres: 2º e 3º
37	184470	Positiva para IgG (alta avidez) e negativa para IgM	Trimestres: 3º
39	185552	Positiva para IgG (baixa avidez ou intermediária) e IgM	Trimestres: 2º e 3º
40	185713	Positiva para IgG (alta avidez) e IgM	Trimestres: 1º e 2º
105	186539	Positiva para IgG (baixa avidez) e IgM	Trimestres: 1º
106	186368	Positiva para IgG (baixa avidez) e IgM	Trimestres: 2º
107	186559	Positiva para IgG (alta avidez) e IgM	Trimestres: 1º, 2º e 3º
108	187019	Positiva para IgG (baixa avidez) e IgM	Trimestres: 2º
109	187187	Positiva para IgG (alta avidez) e	Trimestres: 1º e 2º

		IgM	
110	185881	Positiva para IgG (baixa avidéz) e IgM	Trimestres: 1º, 2º e 3º
111	188270	Positiva para IgG (baixa avidéz) e IgM	Trimestres: 2º
112	188390	Positiva para IgG (alta avidéz) e IgM	Trimestres: 2º e 3º
113	188266	Positiva para IgG (baixa avidéz) e IgM	Trimestres: 1º e 2º
114	188273	Positiva para IgG (baixa avidéz) e IgM	Trimestres: 1º
115	189057	Positiva para IgG (alta avidéz) e IgM	Trimestres: 1º e 2º
116	189058	Negativa para IgG e positiva para IgM	Trimestres: 1º e 2º
118	188496	Positiva para IgG e IgM	Trimestres: 2º
124	190460	Positiva para IgG (baixa avidéz) e IgM	Trimestres: 2º
125	190835	Positiva para IgG (alta avidéz) e IgM	Trimestres: 3º
126	192649	Positiva para IgG e IgM	Trimestres: 1º e 2º

Quando ocorre a transmissão materno-fetal, o tratamento com espiramicina é substituído por uma combinação de pirimetamina, sulfadiazina e ácido folínico, para combater a infecção fetal, já que a maior parte da espiramicina não atravessa a barreira placentária (MONTROYA; REMINGTON, 2008). No caso das gestantes participantes do estudo que apresentaram resultado positivo, este tratamento foi iniciado após o resultado do teste de PCR em tempo real.

A paciente 36 levou a gestação a termo, e sua filha é acompanhada pelo serviço de pediatria do Instituto Nacional Fernandes Figueira. Quando recém nascida, a menina não apresentava alterações oculares, mas apresentava sorologia positiva para IgG e IgM, sendo tratada com pirimetamina e sulfadiazina. Aos oito meses a menina apresentava tomografia com focos de calcificação e atraso no desenvolvimento motor.

A paciente 118 não levou a gestação a termo, sofrendo abortamento espontâneo na vigésima quinta semana de gestação. O laudo da necropsia confirmou o diagnóstico de toxoplasmose congênita, revelando a presença de formas livres de *T. gondii* na

placenta, no cérebro e fígado; o feto apresentava encefalite necrótica, com calcificações e hidrocefalia, e hepatomegalia com necrose e calcificações. Além disso o feto apresentava pneumonia intersticial difusa, esplenomegalia, hipoplasia tímica, hidropisia, endocardite, epicardite e miocardite crônica leve.

5.3 *Nested* PCR

Conforme mencionado anteriormente, os resultados foram confirmados por *nested*-PCR. Ao final da segunda reação as amostras eram analisadas em gel de agarose, cuja imagem foi digitalizada. A Figura 3 apresenta uma destas imagens, em que se pode observar um fragmento cuja migração foi semelhante à do fragmento de 123 pares de base do padrão de peso molecular utilizado (123 DNA *ladder*; lane 1); o tamanho do fragmento está bem próximo ao esperado, já que o produto da amplificação com os iniciadores B22 e B23 seria um fragmento de 115pb. Este fragmento pode ser observado no controle positivo (lane 2), e nas amostras das pacientes 36 e 118 (lanes 3 e 4, respectivamente).

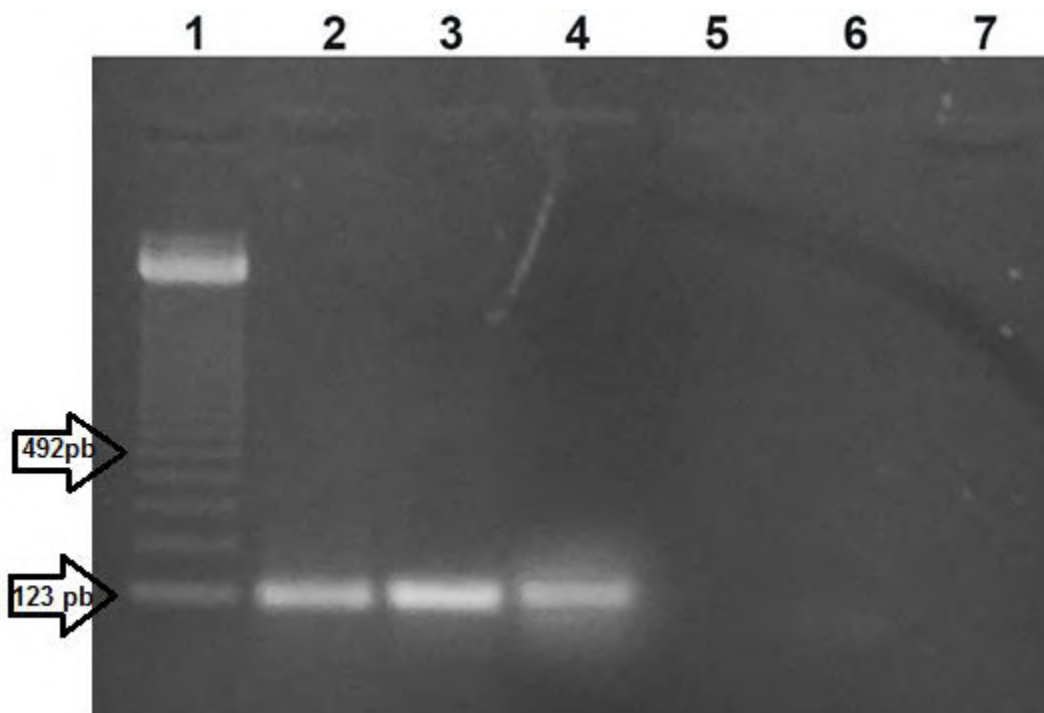


Figura 3. Fotografia digitalizada de gel de agarose ilustrando o resultado de amostras submetidas à *nested*-PCR. 1 – padrão de peso molecular; 2 – controle positivo; 3 – amostra da paciente 36; 4 – amostra da paciente 118; 5 – amostra da paciente 111; 6 – amostra da paciente 115; 7 – controle negativo. Nas lanes 2 (controle positivo), 3 e 4 observa-se uma banda de aproximadamente 100 pb.

Nenhuma das pacientes testadas com resultados negativos por PCR em tempo real apresentou resultados positivos através desta técnica; pode -se observar isso na figura 3, em que o fragmento não é detectado no controle negativo (lane 7), e também em amostras das pacientes 111 (lane 5) e 115 (lane 6). Este dado comprova os resultados obtidos através da PCR em tempo real e reforça a confiabilidade do método e das condições utilizadas. Este dado também está de acordo com o observado por alguns autores, que ao analisar amostras de pacientes por *nested*-PCR e PCR em tempo real, observaram que na maioria das vezes os resultados obtidos são semelhantes através das duas técnicas; ou seja, as técnicas teriam a mesma sensibilidade (TEIXEIRA et. al., 2013); outros autores atribuem maior sensibilidade à PCR em tempo real (SU et. al., 2010; WALLON et. al., 2010; LIU et. al., 2015).

6 Conclusões

Os dados apresentados neste trabalho demonstram que foi possível padronizar as condições do experimento de PCR em tempo real utilizando diluições do DNA controle, já que os dados obtidos por esta metodologia mostram-se concordantes com aqueles obtidos pela metodologia de *nested*-PCR.

Esta metodologia foi utilizada com êxito para avaliação da possibilidade de transmissão materno-fetal da toxoplasmose entre as gestantes acompanhadas no serviço de pré-natal do Instituto Nacional Fernandes Figueira.

Apesar das gestantes participantes do estudo apresentarem sorologia positiva para toxoplasmose e encontrarem-se no período de maior risco para transmissão materno-fetal, este evento foi evitado para a maioria (95,8%) das gestantes com sorologia positiva, pelo tratamento com espiramicina, tendo sido verificada a ocorrência de toxoplasmose congênita em apenas 4,2 % dos casos.

A observação da prole das pacientes que obtiveram o PCR em tempo real positivo para toxoplasmose revelou uma recém-nascida com quadro clínico de toxoplasmose e um caso de abortamento devido à toxoplasmose congênita.

Referências

AMENDOEIRA, M. R. R. ; CAMILLO-COURA, L. F. Uma breve revisão sobre toxoplasmose na gestação. **Scientia Medica**, Porto Alegre, v. 20, n. 1, p. 113-119, 2010.

BEGHETTO, E.; SPADONI, A.; BRUNO, L.; BUFFOLANO, W.; GARGANO, N. 2006. Chimeric Antigens of *Toxoplasma gondii*: Toward Standardization of 116 Toxoplasmosis Serodiagnosis Using Recombinant Products. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 2133 – 2140.

BURG, J. L. et. al. Direct and Sensitive Detection of a Pathogenic Protozoan, *Toxoplasma Gondii*, by Polymerase Chain Reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 8 p. 1787–1792, 1989

CALDERARO, A. et. al. Comparison between two real-time PCR assays and a nested-PCR for the detection of *Toxoplasma gondii*. **Acta Biomed.**,v. 77, n. 2, p.75-80, ago. 2006.

CARVALHO, F. R.; SILVA, D. A.; CUNHA-JÚNIOR, J. P.; SOUZA, M. A.; OLIVEIRA, T. C.; BÉLA, S. R.; FARIA, G. G.; LOPES, C. S.; MINEO, J. R., 2008. Reverse Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Monoclonal Antibodies Against SAG1-Related Sequence, SAG2A, And P97 Antigens From *Toxoplasma gondii* To Detect Specific Immunoglobulin G (IgG), IgM, And IgA Antibodies In Human Sera. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 8, p. 1265 – 1271

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 267–299, abr. 1998.

FERGUSON, D. J. P. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 2, p. 133-148, mar. 2009.

HEID, C. A. et. al. Real Time Quantitative PCR. **Genome Research**, Nova Iorque, v. 6, n. 10, p. 986-994, out. 1996.

HILL, D. E.; CHIRUKANDOTH, S., DUBEY J. P. . Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. **Anim Health Res Rev.**, n. 6, v. 1, p. 41-61, jun. 2005.

HOLEC-GAŞIÖR, L. ; KUR, J., 2010. *Toxoplasma gondii*: Recombinant GRA5 antigen for detection of immunoglobulin G antibodies using enzyme-linked immunosorbent assay. **Experimental Parasitology** v. 124, n. 3, p. 272 – 278.

LARIONOV, A.; ANDREAS, K.; WILLIAM, M. A Standard Curve Based Method for Relative Real Time PCR Data Processing. **BMC Bioinformatics** 6 : 62. 2005.

LIU, Q.; GAO, S.; JIANG, L.; SHANG, L.; MEN, J.; WANG, Z.; ZHAI, Y.; XIA, Z.; HU, R.; ZHANG, X.; ZHU, X. Q., 2008. A recombinant pseudorabies virus expressing TgSAG1 protects against challenge with the virulent *Toxoplasma gondii* RH strain and pseudorabies in BALB/c mice. **Microbes and Infection** n. 10, p. 1355 – 1362.

LIU, Q. et. al. Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. **Parasites & Vectors**, Londres, v. 8, 292, maio 2015.

MONTOYA, J. G. ; REMINGTON, J. S. Management of *Toxoplasma gondii* Infection during Pregnancy. **Clin Infect Dis**, Oxford, v. 47, n. 4, p. 554-566, ago. 2008.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Humana**. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 163-172.

OKAY, T. S. *et al.* Significant performance variation among PCR systems in diagnosing congenital toxoplasmosis in São Paulo, Brazil: analysis of 467 amniotic fluid samples. **Clinics**, São Paulo , v. 64, n. 3, p. 171-176, mar. 2009.

PRIGIONE, I., FACCHETTI, P.; LECORDIER, L.; DESLÉE, D.; CHIESA, S.; CESBRON-DELAUW, M. F.; PISTOIA, V., 2000. T Cell Clones Raised from Chronically Infected Healthy Humans by Stimulation with *Toxoplasma gondii* Excretory-Secretory Antigens Cross-React with Live Tachyzoites: Characterization of the Fine Antigenic Specificity of the Clones and Implications for Vaccine Development. **The Journal of Immunology** n. 164, p. 3741 – 3748.

REISCHL, U. *et al.* Comparison of Two DNA Targets for the Diagnosis of Toxoplasmosis by Real-Time PCR Using Fluorescence Resonance Energy Transfer Hybridization Probes. **BMC Infectious Diseases** 3: 7. 2003.

RORMAN, E; ZAMIR, C. S.; RILKIS, I.; BEN-DAVID, H. 2006. Congenital toxoplasmosis—prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. **Reproductive Toxicology**, n. 21, p. 458 – 472.

ROBERT-GANGNEUXA, F. *et. al.* Clinical relevance of placenta examination for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. **Pediatr Infect Dis J**. v. 29, n.1, p. 33-8, jan. 2010

ROBERT-GANGNEUXA, F. ; DARDÉ. M. L. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.25, n. 2, p. 264-296, abr. 2012.

SAADATNIA, G. ; GOLKAR, M. A review on human toxoplasmosis. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, Londres, v. 44, n. 11, p. 805–814, nov. 2012.

SOUZA-JÚNIOR, V. G. et. al. Toxoplasmose e gestação: resultados perinatais e associação do teste de avidéz de IgG com infecção congênita em gestantes com IgM

anti-Toxoplasma gondii reagent. **Scientia Medica**, Porto Alegre, v. 20, n. 1, p. 45-50, 2010.

SU, C. *et. al.* Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of Toxoplasma gondii. **Parasitology**, v. 137, n. 1, p. 1-11, jan. 2010 .

SUKTHANA, Y., 2006. Toxoplasmosis: beyond animals to humans. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 3, p. 137 – 142.

TEIXEIRA, L. E. *et. al.* The performance of four molecular methods for the laboratory diagnosis of congenital toxoplasmosis in amniotic fluid samples. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 46, n. 5, p. 584-8, set.-out. 2013.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. 2000. Toxoplasma gondii: from animals to humans. **International Journal for Parasitology** n. 30, p. 1217 – 1258.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Real-Time PCR: Understanding Ct Application Note**. Disponível em <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/qpcr-education/pcr-understanding-ct-application-note.html>> Acesso em 05 jul. 2016.

TORTOTA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiology: Un introduction. 8 ed. São Francisco: Pearson, 2004. p 662.

WALLON, M. *et. al.* Accuracy of real-time polymerase chain reaction for Toxoplasma gondii in amniotic fluid. **Obstet Gynecol.**, v. 115, n. 4, p. 727-33, abr. 2010.

WYROSDICK, H. M. ; SCHAEFER, J. J. Toxoplasma gondii: history and diagnostic test development. **Animal Health Research Reviews**, v. 16, n. 2, p. 150–162, dez. 2015.

ZHOU, P.; ZHANG, H.; LIN, R. Q.; ZHANG, D. L.; SONG, H. Q.; SU, C.; ZHU, X. Q., 2009. Genetic characterization of Toxoplasma gondii isolates from China. **Parasitology International** n. 58, p. 193 – 195.