
Resumo

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

Inara Bastos da Silva; Vera Lucia Pereira-Chioccola (orientadora)

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças – Secretaria de Estado da Saúde da Saúde. São Paulo, Brasil – 2016

RESUMO

A toxoplasmose é uma infecção cosmopolita com cerca de 10-20% dos indivíduos infectados desenvolvendo a forma clínica. O estudo de populações de *Toxoplasma gondii* é de importância médica e epidemiológica. Estudos anteriores correlacionam a progressão e a severidade das formas sintomáticas da toxoplasmose com os genótipos de *T. gondii*. Este estudo analisou amostras de necropsias de uma coorte de 15 pacientes que foram a óbito por desenvolverem a toxoplasmose disseminada. Foi um estudo retrospectivo, na qual os dados clínico-laboratoriais eram conhecidos. A hipótese era que estes pacientes poderiam albergar parasitas altamente virulentos pela condição em que eles foram a óbito. As moléculas de DNA isoladas das necropsias foram utilizadas para determinar as características genotípicas de *T. gondii*. O objetivo foi genotipar isolados de *T. gondii*, por PCR-RFLP em “Multilocus”, diretamente de amostras DNA de amostras clínicas de pacientes que foram a óbito por toxoplasmose disseminada. Amostras de 15 pacientes com AIDS, com diagnóstico positivo para toxoplasmose disseminada foram utilizadas para a extração de DNA e PCR. Um total de 30 amostras foi analisado. As genotipagens de *T. gondii* foram realizadas pela PCR-RFLP em multilocus utilizando-se 12 marcadores moleculares (SAG1, 5' e 3'SAG2, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1 e APICO). Os genótipos sugestivos encontrados foram comparados com os existentes no site <http://toxodb.org/>. Todos os 15 pacientes tinham tido toxoplasmose cerebral prévia. As 30 amostras clínicas foram genotipadas com sucesso em 8 ou mais loci gênicos, mas não foram observadas cepas diferentes em um mesmo paciente. Destas, 6 genótipos sugestivos foram identificados. De acordo com as análises realizadas no Toxo DB, um deles é o genótipo sugestivo Toxo DB 11 (Paciente 11). Este genótipo foi identificado previamente em diferentes animais em outros estudos. Estudos anteriores demonstraram que é um genótipo virulento em animais experimentais. Os outros 5 genótipos sugestivos identificados ainda não foram descritos. O genótipo TgHuDis1 foi o mais frequente sendo detectado em 8 pacientes. Os genótipos TgHuDis3 e TgHuDis5 foram presentes em dois pacientes cada. Os demais (TgHuDis2 e TgHuDis4) foram identificados em um paciente cada. Este estudo demonstrou que foi possível realizar genotipagem de *T. gondii* a partir de amostras clínicas provenientes de tecidos parafinados e estocados por muito tempo. O isolamento das cepas em animais experimentais não foi possível. Assim, o uso de animais experimentais não foi necessário, atendendo as boas práticas da pesquisa e ética animal, onde animais de laboratório devem ser utilizados apenas quando são necessários.

PALAVRAS-CHAVE: Toxoplasma, Toxoplasmose, Genótipo, HIV, Epidemiologia molecular

Abstract

Genotypic profile of Toxoplasma gondii isolates from patients with disseminated toxoplasmosis

Inara Bastos da Silva; Vera Lucia Pereira-Chioccola (orientadora)

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças – Secretaria de Estado da Saúde da Saúde. São Paulo, Brasil – 2016

ABSTRACT

Toxoplasmosis is a cosmopolitan infection. Around 10-20% of infected individuals develop the clinical form. The study of *Toxoplasma gondii* populations is medical and epidemiological importance. Previous studies correlated the progression and severity of the symptomatic forms in toxoplasmosis with *T. gondii* genotypes. This study analyzed necropsy samples from a cohort of 15 patients who died due to develop disseminated toxoplasmosis. In this retrospective study the clinical and laboratory data from patients were known. The hypothesis was that these patients were infected with highly virulent parasites by the condition in which they died. DNA molecules isolated from patient necropsies were used to determine *T. gondii* genotypes. The present study was aimed to genotype *T. gondii* isolates by PCRRFLP -Multilocus, directly in DNA extracted from clinical samples from patients who died by disseminated toxoplasmosis. Samples from 15 AIDS patients with diagnosis for disseminated toxoplasmosis were used for DNA extraction and PCR. A total of 30 samples was analysed. *T. gondii* genotyping was performed by PCR-RFLP multilocus using 12 molecular markers (SAG1, 5' and 3'SAG2, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, and PK1 APICO). The suggestive genotypes were compared with existing in site <http://toxodb.org/>. The 15 patients had had previous cerebral toxoplasmosis at least 6 months before the disseminated toxoplasmosis episode. The 30 clinical samples were genotyped successfully in 8 or more gene loci, but were not observed different strains in the same patient. Six suggestive genotypes were identified. According to ToxoDB analysis, one of them was Toxo DB genotype #11 (Patient 11). This suggestive genotype was previously identified in different domestic animals in other studies. Previous studies had shown that genotype #11 was virulent in experimental animals. The other five suggestive genotypes identified in 14 patients were not described. TgHuDis1 was the most frequent and was determined in 8 patients. TgHuDis3 and TgHuDis5 were identified in two patients each. TgHuDis2 and TgHuDis4 have been identified in one patient each. This study demonstrated that it was possible to perform *T. gondii* genotyping in DNA extracted from of brain and lung samples in paraffin embedded and stored for long time. The *T. gondii* strain isolation in experimental animals has not been possible. Thus, the use of experimental animals was not necessary in view of the good practices of research and animal ethics, where laboratory animals should only be used when they are needed.

KEYWORDS: Toxoplasma, Toxoplasmosis, Genotype, HIV, Molecular epidemiology.