

Otimização da reação de polimerase em cadeia para detecção de *Toxoplasma gondii* em sangue venoso e placenta de gestantes

Recebido em 04/07/01
Aceito para publicação em 28/02/02

Optimization of Toxoplasma gondii detection by PCR in pregnant blood and placenta

Silvia Maria Spalding¹
Maria Regina Reis Amendoeira²
Janice M.C. Coelho³
Sergio O. Anghel⁴

unitermos	resumo
PCR <i>Toxoplasma gondii</i> Gestantes	A detecção de <i>Toxoplasma gondii</i> no sangue venoso e na placenta de gestantes pela reação de polimerase em cadeia pode facilitar o diagnóstico pré-natal da toxoplasmose congênita. Foram avaliadas gestantes IgM-reagentes e os seus filhos. Além das dosagens de IgG, IgM, IgA e reação de avides de IgG (MEIA), foram realizadas a técnica de imunoperoxidase e a inoculação em camundongos. De cada amostra foi efetuada amplificação gênica com <i>primers</i> do gene B1 e novos <i>primers</i> do gene TGR (chamados ABGTg7 C1 e N1). É preciso observar que o tratamento poderia ser responsável por uma diminuição da infecção. Desta forma, o diagnóstico negativo confirmaria a eficiência do tratamento preventivo na replicação parasitária no útero. A reação de polimerase em cadeia mostrou-se sensível e específica; evidenciou a presença de um a dez taquizoítas; pode ser utilizada com segurança e confiabilidade, além de tornar rápido o diagnóstico da toxoplasmose congênita, sendo, assim, ferramenta importante na avaliação pré-natal.

Rio de Janeiro, v. 38, n. 2, p. 105-110, 2002

105

abstract

The Toxoplasma gondii detection in venous blood and placenta of pregnant by polymerase chain reaction may facilitate the diagnosis of congenital toxoplasmosis. We evaluated pregnant with reagent immunoglobulin M (IgM) and their children. Beyond serological toxoplasma-specific immunoglobulins G (IgG), M (IgM), A (IgA) and IgG avidity (MEIA), we did immunoperoxidasis and mice inoculation. Genomic amplification with gene B1 primers and new TgR primers (called ABGTg7 C1 and N1) was conducted for each sample. It's necessary to observe that treatment probably is responsible for the infection decrease, that manner, negative results would confirm uteri therapeutic efficiency. PCR was sensitive and specific, it identified one to ten tachyzoites. Besides being a fast form of congenital toxoplasmosis diagnosis, it may be used safely and trustly, as an important tool for congenital evaluation.

key words

PCR
Toxoplasma gondii
Pregnants

1. Técnico em Saúde e Ecologia Humana; doutor em Biologia Parasitária pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz); Laboratório de Parasitologia; Laboratório Central do Estado (Lacen/RS); Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS); Secretária da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul (SS); professor adjunto da disciplina de Análises Parasitológicas, departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).
2. Pesquisadora titular do departamento de Protozoologia; doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio de Janeiro; Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fiocruz.
3. Centro de Pesquisa do Hospital Evandro Chagas; Fiocruz.
4. Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade de Buenos Aires; investigador Conicet; Departamento de Parasitologia Anlis - Dr. Carlos G. Malbrán.
Este trabalho faz parte da tese de doutorado em Biologia Parasitária *Acompanhamento de Gestantes com Risco de Transmissão de Infecção Congênita por Toxoplasma gondii* Nicolle & Mancosaux, 1909 na Região do Alto Uruguai, RS, Brasil - Diagnóstico e Aspectos Epidemiológicos, apresentada em 19 de setembro de 2000, na Fundação Oswaldo Cruz.

Introdução

A toxoplasmose congênita pode ocorrer quando a mulher adquire a infecção, fase aguda, durante a gestação e a transmite ao feto (16, 19). Segundo Wong & Remington (21), 90% destes casos são assintomáticos ou oligossintomáticos. Nos casos subclínicos, o ideal seria a demonstração da parasitemia no neonato, o que

pode ser realizado por meio de isolamento do parasita em animais e/ou PCR de sangue venoso. O isolamento do protozoário, a histologia e a histoquímica da placenta são também de grande valor para o diagnóstico (10). Atualmente, também tem sido utilizada a reação de polimerase em cadeia (PCR), técnica que tem mostrado

Journal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial

maior sensibilidade (92%-97,4%) e especificidade (100%) do que os outros métodos de diagnóstico já citados (6, 11, 14). Com a introdução de diagnóstico sensível e precoce para a avaliação de gestantes, é possível iniciar terapêutica específica que previne a transmissão desta protozoose ou minimiza o desenvolvimento de lesões no feto.

O objetivo deste trabalho foi o estabelecimento de um diagnóstico de PCR *in house*, através de diferentes *primers*, avaliando a sensibilidade e a especificidade em material de sangue total e placenta.

Material e métodos

Pacientes e controles

Foram estabelecidos dois grupos. O primeiro grupo, o controle, era constituído por 31 mulheres soronegativas (IgG e IgM não-reagentes) durante toda a gestação e pelos 31 recém-nascidos respectivos. Foram efetuadas dosagens de IgG (Elisa), de IgG (IFI) e de IgA (MEIA). Nesta mesma data, foi coletado sangue com EDTA para tentar evidenciar o parasito por inoculação em camundongos e PCR. No momento do parto, coletaram-se as placentas de cinco mulheres para realizar a técnica de imunoperoxidase, a inoculação em camundongos e a PCR.

No primeiro contato com as crianças, após o parto, foi coletado sangue com EDTA para a inoculação em animais e PCR e sangue sem EDTA para a realização de dosagens sorológicas através das mesmas metodologias já referidas.

O outro grupo era formado por 50 gestantes soropositivas (IgG e IgM positivas) e seus 51 recém-nascidos (um parto gemelar). No momento do parto, coletaram-se as placentas de 18 mulheres para realizar a técnica de imunoperoxidase, a inoculação em camundongos e a PCR. Efetuaram-se também as mesmas metodologias em quatro cordões umbilicais. Neste grupo, além dos métodos de diagnóstico já citados no grupo-controle, foi realizada a reação de avides de IgG (MEIA).

Todas as mães e seus filhos foram acompanhados clínica e sorologicamente até, no mínimo, o final do primeiro ano de vida da criança.

Metodologia

A metodologia de extração do DNA do *T. gondii* foi realizada conforme Angel *et al.* (1), e a de amplificação gênica, conforme Ho-Yen *et al.* (15), com modificações.

Teste de sensibilidade

A suspensão de taquizoítas de *T. gondii* foi retirada do líquido peritoneal de camundongos previamente infectados, e foram preparados tubos com as concentrações que variaram de 1 a 10^7 taquizoítas. Foram efetuados os procedimentos de extração e quantificação do DNA. Para a execução da reação de amplificação foram utilizados 100ng.

Teste de especificidade

Para o teste de especificidade foram amplificadas amostras de DNA: humano, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania amazonensis*, *Trichuris trichiura*, *Cryptosporidium spp.*, *Plasmodium falciparum*, *Echinococcus granulosus*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Neisseria meningitidis*.

Oligonucleotídeos

Foram utilizados dois pares de *primers* do gene B1 correspondentes aos nucleotídeos 694-714, 887-868, 757-776 e 853-831. Para a realização da PCR simples, os *primers* Toxo-N1 (5' - GGAAGTGCATCCGTTTCATGAG - 3') e Toxo-C1 (5' - TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC - 3'). Para a realização da PCR *nested* fez-se uso dos *primers* Toxo-N2 (5' - TGCATAGGTTGCAGTCACTG - 3') e Toxo-C2 (5' - GGCGACCAATCTGCGAATACACC - 3').

Também foi utilizada a seqüência do elemento repetitivo em tandem TGR (4) através do par de *primers* ABGTg C1 (5' - TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC-3') e N1 (5' - GGAAGTGCATCCGTTTCATGAG-3') em amplificação simples. Estes *primers* foram desenhados a partir do alinhamento de seqüências obtidas dos elementos TGR 1E, 1 A, 2 e 4 (Cristina *et al.*, 1991) e dos elementos ABGTg7 e ABGTg8 (18).

Processamento das amostras

Foram colocados 500µl da amostra de sangue total e, para as amostras de placenta, cortados fragmentos (de 1cm³) de, aproximadamente, 200g de placenta, os quais foram triturados em gral com TE. A mistura obtida foi filtrada e foram realizadas três lavagens com TE (Tris-HCl [10mM], EDTA [1mM], pH 8). O sedimento foi ressuspenso em 300µl de TE, sendo-lhe adicionados 5µl de proteinase K 20mg/ml. Após, o material foi incubado a 56°C durante duas horas. Depois desta incubação, foi iniciada a extração do DNA pela adição de 300µl de fenol tamponado. A fase aquosa foi retirada e adicionaram-se 300µl de fenol: clorofórmio/álcool isoamílico (1:1) e, após, com 300µl de clorofórmio/álcool isoamílico. Foi adicionado etanol a

100%. Em paralelo, foi realizado o controle da extração de DNA. A quantificação do DNA foi realizada em gel de agarose a 1%.

Detecção da PCR

Foi preparada a mistura de reação nas seguintes concentrações: tampão 10µl x 5µl; MgCl (50mM) 1,5µl; *primer* Toxo-N1 (50pmol/µl) 1µl; *primer* Toxo-C1 (50pmol/µl) 1µl; DNTPs (10mM) 1µl; *Taq* polimerase 0,5µl; água Mili-Q q.s.p. 50µl; óleo mineral 30µl. Foram acrescentados em cada bateria de testes três controles positivos, um controle negativo de extração e um de reação.

Foi utilizada a seguinte programação 95°C por 4min para desnaturação, 35 ciclos: numa temperatura de 95°C durante 1min para desnaturação, 55°C por 45s para anelamento, 72°C por 1min para extensão e, finalizando, uma incubação adicional a 72°C durante 10min. O amplicon resultante foi checado em gel de agarose a 2%, colocado em cuba de eletroforese durante um hora a 100V. A visualização foi efetuada através de luz ultravioleta (UV).

PCR *nested* e TGR-PCR

Todas as amostras negativas e controles foram submetidos a PCR *nested*. Para tanto, foi retirado 1µl do produto de PCR simples e adicionado à mistura de reação [tampão 10µl x 5µl; MgCl (50mM) 1,5µl; *primer* Toxo-N2 (50pmol/µl) 1µl; *primer* Toxo-C2 (50pmol/µl) 1µl; DNTPs (10mM) 1µl; *Taq* polimerase 0,5µl; água Mili-Q q.s.p. 50µl; óleo mineral 30µl].

Repetiu-se o processo nas mesmas condições anteriormente citadas.

A metodologia de PCR simples foi repetida utilizando-se o par de *primers* ABGTg C1 e N1 da seqüência do elemento repetitivo TGR, nas mesmas condições de reação, e posterior checagem do material.

Imunoperoxidase

O estudo imunoistoquímico foi realizado pelo método de avidina-biotina-peroxidase (ABP), utilizando-se anticorpo policlonal anti-*T. gondii* (Dako), pré-diluído, e, como revelador, a diaminobenzidina (DAB), marca Dako. As amostras foram previamente emblocadas e identificadas. Foram analisados tecidos placentários, representados por decídua, vilosidades córion e cordão umbilical. Foram realizados cortes histológicos de 3µm cada, colocados em lâminas previamente revestidas com silano (Sigma). Posteriormente, os cortes foram desparafinizados

em estufa a 57°C e submetidos a banhos de imersão sucessivos em xilol, álcool e água corrente. Foi realizada a inibição da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio e metanol durante 10min. Após, foi feita a incubação com anticorpo primário anti-*T. gondii*, por um período de 12 horas *overnight*, empregando-se o método de imunoperoxidase (ABP), com posterior revelação com DAB. Os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Mayer e montados com bálsamo sintético. Foram utilizados casos-controles positivos, previamente analisados e contendo elementos parasitários teciduais de *T. gondii*.

Resultados

A PCR apresenta elevada sensibilidade (de um a dez parasitas), especificidade de 100% com os DNAs testados, além de rapidez na liberação do resultado do teste. Como vários autores já relataram, maior sensibilidade (92,9%) e total especificidade, com o resultado em 24 horas, são obtidas pela PCR, principalmente no diagnóstico da infecção fetal (3, 11, 14).

No trabalho executado, para dar confiabilidade à metodologia implantada, foi testada a especificidade utilizando-se amostras de DNA de várias origens, não ocorrendo reações cruzadas (**Figura 1**).

Para testar a sensibilidade da PCR simples com os *primers* B1 foi utilizada curva de taquizoítas de *T. gondii*, observando-se o aparecimento de uma banda de 194pb, com dez taquizoítas; fazendo-se o *nested*, observou-se uma banda de 97pb, com um taquizoíta (**Figuras 2 e 3**). Através da PCR simples, com dois pares de *primers* ABGTg, observou-se o aparecimento de uma banda específica de 145pb com um taquizoíta (**Figura 4**).

Uma vez estabelecidas as condições ótimas de amplificação com os *primers* B1 e ABGTg, realizou-se o ensaio de PCR no DNA obtido das amostras dos pacientes, sendo que todas foram negativas no ensaio de amplificação.

Discussão

Apesar de a metodologia estar bem estabelecida e observando-se todos os resultados negativos das amostras, há a possibilidade da presença de resultados falso-negativos. Várias poderiam ser as causas disso: haver a presença de inibidores da *Taq* polimerase, o período entre a infecção e a coleta da amostra ser muito longo, a parasitemia ser fugaz e as pacientes terem iniciado seu tratamento antes de efetuar a coleta. Estes fatos, mais a

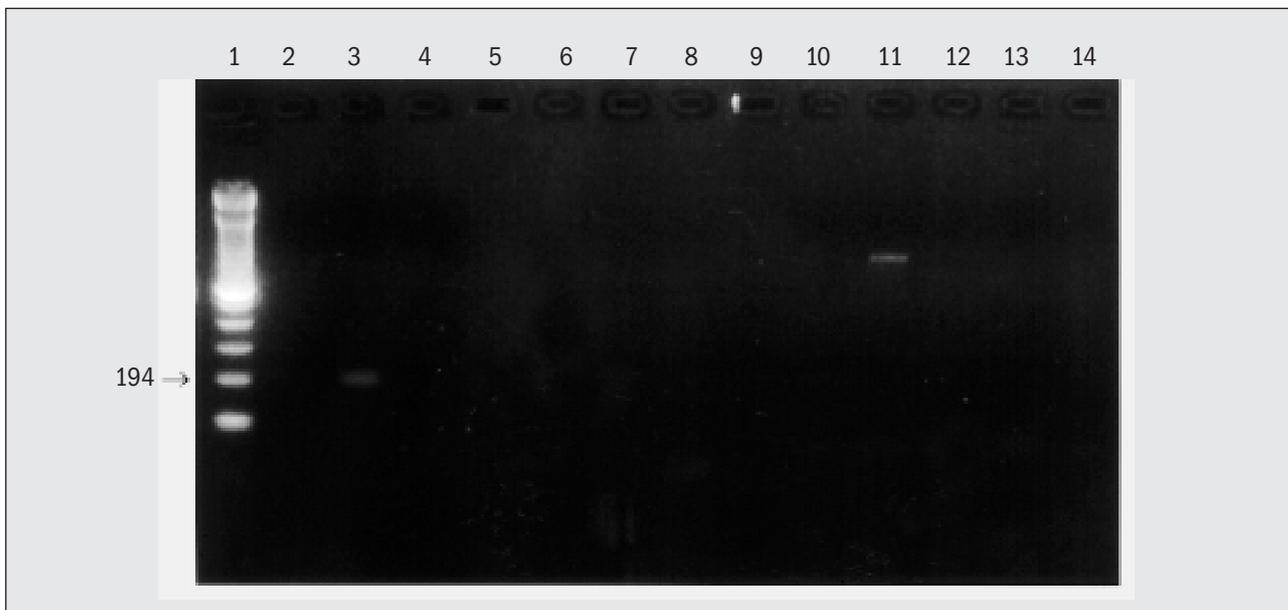


Figura 1 – Produtos de amplificação através de PCR simples com primer B1. Eletroforese em gel de agarose a 2% com brometo de etídio. 1) Marcador de 100pb; 2) um taquizoíta + 1µg de DNA humano; 3) dez taquizoítas + 1µg de DNA; 4) DNA humano; 5) DNA humano; 6) DNA de *Mycobacterium tuberculosis*; 7) DNA de *Neisseria meningitidis*; 8) DNA de *Echinococcus granulosus*; 9) DNA de *Trichuris trichiura*; 10) DNA de *Plasmodium falciparum*; 11) DNA de *Trypanosoma cruzi*; 12) DNA de *Leishmania amazonensis*; 13) DNA de *Cryptosporidium spp.*; 14) controle negativo de reação

sensibilidade, também poderiam explicar o isolamento parasitário negativo obtido pela inoculação em animais. É preciso observar que o tratamento poderia ser responsável por uma diminuição da infecção, em crianças, da ordem de 40% a 60%. Desta forma, o diagnóstico negativo confirmaria a eficiência do tratamento preventivo da pirimetamina e sulfadiazina na replicação parasitária no

útero. Deve-se salientar também que, nas avaliações dos resultados pela PCR das placentas, a espiramicina age reduzindo a carga parasitária neste local (2, 17, 20). Como o tratamento pode induzir a liberação do DNA do parasita, a PCR pode manter-se positiva por alguns dias (quatro a, no máximo, 12 dias) após o início da terapia (5). Diante do exposto, sugere-se que as coletas sejam feitas antes do início do tratamento, o que, por razões éticas, não foi possível executar neste trabalho.

Por razões práticas, é impossível a avaliação de toda a placenta, e a extração do DNA de tecidos é mais difícil que de líquidos. Porém, mesmo que a placenta seja um material biológico de fácil obtenção, ela não é o mais indicado para a identificação do genoma parasitário pela baixa sensibilidade (8, 9).

A PCR de amostras de sangue é mais sensível que a inoculação em camundongos. Quando se faz uso de inoculação, junto com as células utilizadas podem estar presentes fatores inibitórios. Da mesma forma, frações do genoma do parasita são identificadas por PCR, porém não são viáveis para a proliferação em camundongos (5, 13).

A obtenção de sangue em gestantes é um método menos invasivo e não requer um especialista, porém apresenta baixa sensibilidade (1). A PCR em líquido amniótico apresenta alta sensibilidade e confirma que o parasita está invadindo o feto, porém sua obtenção requer um especialista e, como qualquer técnica invasiva, apresenta riscos à gestação.

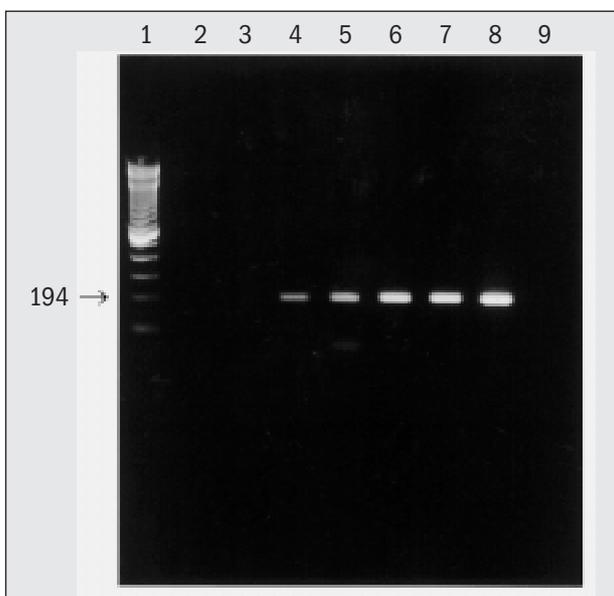


Figura 2 – Produtos de amplificação através de PCR simples com primer B1, curva de parasitas para avaliação da sensibilidade. Eletroforese em gel de agarose a 2% com brometo de etídio. 1) Marcador de 100pb; 2) controle negativo de reação; 3) um taquizoíta de *T. gondii*; 4) dez taquizoítas; 5) cem taquizoítas; 6) 10^3 taquizoítas; 7) 10^4 taquizoítas; 8) 10^5 taquizoítas; 9) controle negativo de extração

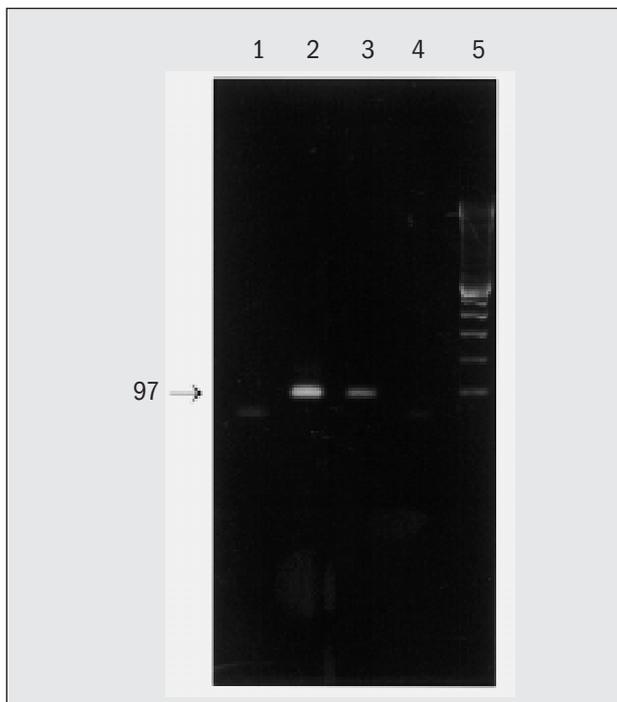


Figura 3 – Produtos de amplificação através de PCR nested com primer B1. Eletroforese em gel de agarose a 2% com brometo de etídio. 1) Controle negativo de extração; 2) dez tachizoitas de *T. gondii*; 3) um tachizoita; 4) controle negativo de reação; 5) marcador de 100pb

Em trabalho executado por Guy & Johnson (12) para identificação de infecção ativa por *T. gondii* no sangue periférico utilizando PCR *nested*, foram obtidos resultados

negativos em pacientes com infecção crônica, o que recomenda o uso deste material para o diagnóstico de infecção aguda e sugere que a detecção de DNA parasitário pode ser rara no sangue periférico durante a fase crônica da infecção. É importante salientar, porém, que uma PCR negativa não exclui a infecção recente.

O diagnóstico da toxoplasmose é geralmente baseado em argumentos indiretos (sorológicos); todavia, em casos de imaturidade ou depressão imunológicas, a evidência do parasita deve ser obtida.

A reação de polimerase em cadeia mostrou-se sensível quando foram utilizados dois jogos de *primers* do gene B1 e um novo jogo de *primers* da seqüência TGR (ABGTg C1 e N1), sendo específica com amostras de DNA humano e de diferentes agentes infecciosos com os quais não apresentou reação cruzada. Salientamos que os *primers* TGR foram mais sensíveis, portanto poderiam ser excelentes candidatos como alternativa à utilização dos *primers* B1. Desta forma, esta metodologia pode ser utilizada com segurança e confiabilidade, além de tornar rápido o diagnóstico da toxoplasmose congênita, servindo de ferramenta importante na avaliação pré-natal. Todavia é necessário que seja otimizada a coleta das amostras. Para tanto sugerimos que seja efetuada uma coleta de sangue com EDTA antes do início da terapêutica específica e, quando possível, em dois, quatro, oito e 12 dias do tratamento.

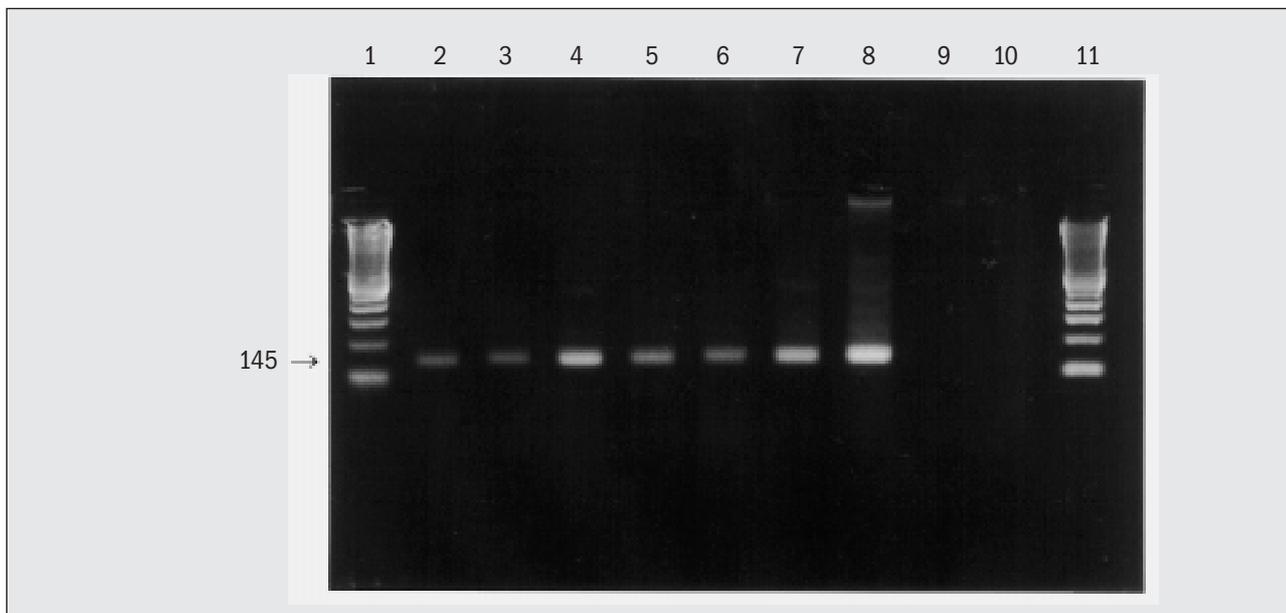


Figura 4 – Produtos de amplificação através de PCR com primer ABGTg⁷ C1 e N1, curva de sensibilidade. Eletroforese em gel de agarose a 2% com brometo de etídio. 1) Marcador de 100pb; 2) um tachizoita; 3) dez tachizoitas; 4) cem tachizoitas; 5) 10³ tachizoitas; 6) 10⁴ tachizoitas; 7) 10⁵ tachizoitas; 8) 10⁶ tachizoitas; 9) controle negativo de extração; 10) controle negativo de reação; 11) marcador de 100pb

Referências

1. Angel, S.O. et al. Screening for active toxoplasmosis in human patients by DNA hybridizations with ABGTg7 probe in blood samples. *J. Clin. Microbiol.*, 35: 591-5, 1997.
2. Beazley, D.M. & Egerman, R.S. Toxoplasmosis. *Semin. Perinato.*, 22(4): 332-8, 1998.
3. Camargo, M.E. Alguns aspectos atuais do diagnóstico de laboratório da toxoplasmose. *Am. Acad. Nac. Med.*, 155(4): 236-9, 1995.
4. Cristina, N. et al. A family of repeated DNA sequences in *Toxoplasma gondii*: cloning, sequence analysis and use in strain characterization. *Exp. Parasitol.*, 73: 73-81, 1991.
5. Dupouy-Camet, J. et al. Detection of *Toxoplasma gondii* in venous blood from AIDS patients by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 31: 1866-9, 1993.
6. Forestier, F. et al. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis by PCR: extended experience. *Prenat. Diagn.*, 18(4): 407-9, 1998.
7. Frenkel, J.K. Pathology and pathogenesis of congenital toxoplasmosis. *Bull. NY Acad. Med.*, 50: 182-91, 1974.
8. Fricker-Hidalgo, H. et al. Detection of *Toxoplasma gondii* in 94 placentae from infected women by polymerase chain reaction, *in vivo* and *in vitro* cultures. *Placenta*, 19: 545-9, 1998.
9. Fricker-Hidalgo, H. et al. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: comparative value of fetal blood and amniotic fluid using serological techniques and cultures. *Prenat. Diagn.*, 17: 831-5, 1997.
10. Garcia, A. Aspectos morfológicos feto-placentários na infecção congênita pelo *Toxoplasma gondii*. *Am. Acad. Nac. Med.*, 155: 229-31, 1995.
11. Grover, C.M. et al. Rapid prenatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid. *J. Clin. Microbiol.*, 28: 2297-301, 1990.
12. Guy, E.C. & Joynson, H.M. Potential of the polymerase chain reaction in the diagnosis of active *Toxoplasma* infection by detection of parasite in blood. *J. Infect. Dis.*, 172: 319-22, 1995.
13. Hitt, J.A. & Felice, G.A. Detection of *Toxoplasma gondii* parasitemia by gene amplification, cell culture, and mouse inoculation. *J. Clin. Microbiol.*, 30: 3181-4, 1992.
14. Hohlfeld, P. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase chain reaction test on amniotic fluid. *N. Engl. J. Med.*, 331: 695-9, 1994.
15. Ho-Yen, D.O. et al. Use of the polymerase chain reaction to detect *Toxoplasma gondii* in human blood samples. *J. Clin. Pathology*, 45: 910-3, 1992.
16. Jacobs, L. *Toxoplasma* and toxoplasmosis. *Ann. Rev. Microbiol.*, 17: 429-50, 1963.
17. Lynfield, R.; Hsu, H.W. & Guerina, N.G. Screening methods for congenital *Toxoplasma* and risk of disease. *Lancet*, 353: 1899-900, 1999.
18. Matrajt, M. et al. Arrays of repetitive DNA elements in the largest chromosomes of *Toxoplasma gondii*. *Genome*, 42: 265-9, 1999.
19. McCabe, R.E. & Remington, J.S. Toxoplasmosis: the time has come. *The N. England. J. Med.*, 318(5): 313-5, 1988.
20. Robert-Gangneux, F. et al. Value of prenatal diagnosis and early postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: retrospective study of 110 cases. *J. Clin. Microb.*, 37(9): 2893-8, 1999.
21. Wong, S.Y. & Remington, J.S. Toxoplasmosis in pregnancy. *Clin. Infect. Dis.*, 18: 853-62, 1994.

Endereço para correspondência

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Av. Ipiranga 2753
CEP 9610-000 - Porto Alegre-RS
e-mail: spalding@farmacia.ufrgs.br