ARTIGO DE REVISÃO / *REVIEW ARTICLE*

A virulência *versus* diferenciação do parasita *Toxoplasma gondii*

/ **A. Vilares** / **H. Ângelo**
Centro de Parasitologia, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

Correspondência:
Anabela Vilares
Centro de Parasitologia
Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
Av. Padre Cruz
1649-016 Lisboa
Tel.: +351217519295 / Fax: +351217519294
E-mail: anabela.vilares@insa.min-saude.pt
anabela.vilares@clix.pt

/ Resumo

A tipagem de elevada diferenciação em *Toxoplasma gondii* é essencial para compreender as diferentes manifestações de doença e as características de transmissão das estirpes. Os métodos correntes de tipagem dividem as estirpes de *T. gondii* em três linhagens clonais com poucas diferenças entre si. O presente artigo descreve alguns métodos de diferenciação, bem como novos marcadores moleculares ("loci" variáveis) de *T. gondii*. Estes "loci" variáveis, conhecidos como microssatélites, são mais polimórficos do que as enzimas, do que as sequências detectadas por restricção enzimática de fragmentos de ADN e do que a variação encontrada nas sequências de intrões. Estes microssatélites são seis vezes mais diferenciativos do que qualquer outro marcador genético descrito para *T. gondii*, permitindo a diferenciação dos isolados nas três linhagens clonais existentes, bem como em estirpes atípicas e recombinantes. No entanto, ainda não foi possível associar a virulência das estirpes de *T. gondii* na infecção humana com a genotipia deste parasita.

/ *Abstract*

High-resolution typing of Toxoplasma gondii is essential to understand the effect of genetic differences among strains on the variation in disease manifestation and transmission patterns. Current typing methods discern 3 lineages with minimal within-lineage variation. This review describes different methods of typing T. gondii, and new variable loci. These loci, the microsatellites, were more polymorphic than enzymes, restriction fragment length polymorphisms, and sequence variation in introns. Most importantly, these loci revealed, for the first time, substantial within--lineage variation that was over 6-fold higher than that detected by other markers. Genotyping at these loci facilitates classification of isolates beyond the lineage level (atypical and recombinant strains).

/ Introdução

Toxoplasma gondii é o agente etiológico da toxoplasmose, pode infectar a grande maioria dos animais de sangue quente (mamíferos e pássaros) incluindo os humanos.
T. gondii é prevalente em todo o mundo, sendo de grande importância médica e veterinária[1,2].

Na maioria dos indivíduos imunocompetentes, a parasitose é assintomática.
A toxoplasmose pode ser grave ou mesmo levar à morte, quando associada, seja ao hospedeiro imunocomprometido (com infecção por HIV, transplantados, etc.) devido à reactivação dos pseudoquistos, seja à infecção primária materna por

transmissão ao feto durante a gestação por causar aborto ou doenças congénitas graves (encefalites, corioretinites, linfoadenopatias, etc.)[3].
A infecção por *T. gondii* é uma das causas importantes da corioretinite nos Estados Unidos e na Europa, sendo normalmente consequência de uma infecção congénita[4].
Nos Estados Unidos registam-se anualmente 750 mortes por toxoplasmose e cerca de cinquenta por cento destas infecções são de origem alimentar, fazendo da toxoplasmose a terceira causa de morte desta origem nos Estados Unidos e a primeira causa de infecção por ingestão de águas contaminadas ou carnes infectadas[5]. No entanto, na América Central e Sul a prevalência de *T. gondii* apresenta-se ainda mais elevada do que no resto do continente americano[6-11]. Em Portugal, a prevalência desta parasitose na população varia entre 35% no Sul e 60% no Norte do País, estimando-se que se verifiquem, em média, onze casos de infecção congénita por 10.000 nados vivos[12].
A transmissão da infecção toxoplásmica dá-se por ingestão de qualquer uma das formas de resistência, sejam os pseudoquistos contidos nas carnes de animais infectados ou os oocistos expelidos nas fezes dos felinos[3] que contaminam alimentos e águas e também verticalmente por via placentária através da passagem dos taquizoitos da mãe para o feto[2]. Alguns estudos revelaram que, os oocistos são resistentes à inactivação química ou ambiental e podem sobreviver por meses ou mesmo anos no meio ambiente[13].
Nos casos de toxoplasmose, relacionados seja com a infecção congénita ou com a infecção nos imunodeprimidos, são observadas variações substanciais na progressão e severidade da infecção e estas diferenças têm sido atribuídas a factores genéticos do hospedeiro e do parasita[14].
T. gondii tem sido agrupado em três linhagens clonais, nomeadamente tipo I, II e III, com base no estudo das sequências polimórficas de diferentes genes[14-17]. Outros estudos, nomeadamente, genéticos e filogenéticos, demonstraram que *T. gondii* se subdividia em dois grupos clonais[18, 19] que englobavam as três tipologias anteriormente referidas. O tipo I e III estão contidos no grupo clonal dois enquanto que o tipo II está no grupo clonal um[18]. Os três genótipos são predominantes e foram originados pelo cruzamento de duas estirpes parentais[20]. Su *et al.* demonstraram que este cruzamento se realizou há apenas 10.000 anos atrás[21].
Nas linhagens clonais predominantes (tipo I, II, III) as diferenças ao nível das sequências de ADN são inferiores a 2%[20]. Existem algumas explicações para a existência da estrutura clonal das populações de *T. gondii*. Primeiro, o parasita pode ser transmitido entre os hospedeiros intermediários pela via carnívora[21]. Segundo, apesar da transmissão por ingestão de oocistos ser uma das vias de contaminação dos hospedeiros e destas formas resultarem do ciclo sexual onde existe a possibilidade de recombinação tendo esta sido descrita ocasionalmente[16], está confirmado que muitos macrogâmetas do parasita permanecem no intestino do gato sem serem fertilizados, mas conseguem formar oocistos por partenogénese[22]. Terceiro, segundo alguns autores, é raro na natureza, o hospedeiro definitivo infectar-se simultaneamente com diferentes estirpes, o que origina por si só uma barreira temporal à recombinação[23-31].

/ Virulência das estirpes

A virulência das estirpes de *T. gondii* tem sido objecto de estudo para muitos investigadores desde longa data. O modelo animal escolhido tem sido, na maioria dos casos, o ratinho de laboratório. Para este animal, os isolados de *T. gondii* exibem diferentes virulências[17, 32]. As estirpes virulentas apresentam um LD_{100} (dose letal) em ratinhos "Swiss outbred" menor que dez taquizoitos, enquanto que as estirpes não virulentas têm um LD_{100} superior a 10^3 taquizoitos[17].
A virulência de *T. gondii* no ratinho de laboratório depende de vários factores, seja do estádio do parasita inoculado, da via de inoculação, da dose, da estirpe do animal usado, e da estirpe do parasita. Das três formas capazes de infectar um hospedeiro (oocistos, bradizoitos e taquizoitos), são os oocistos que apresentam maior infecciosidade. Alguns estudos têm mostrado que as estirpes do genótipo I desenvolvem sempre infecções mortais na inoculação primária em ratinhos de laboratório[33].
A estirpe RH de *T. gondii* (tipo I) é considerada a mais virulenta, matando os ratinhos num período inferior a duas semanas após a inoculação intraperitoneais (i.p.). Esta estirpe foi isolada em 1939 do cérebro de uma criança de seis anos de idade. Desde esta data, tem sido mantida na forma de taquizoito em ratinhos, em diferentes laboratórios, não tendo sido descrita qualquer alteração da sua virulência nos últimos 50 anos[34]. No entanto, os ratinhos originalmente inoculados por via i.p. e intracraniana (i.c.) com o cérebro da criança não morreram até ao vigésimo dia[35].
As sucessivas inoculações i.p. de taquizoitos no ratinho, segundo alguns autores, tornam as estirpes mais virulentas para esse animal qualquer que seja o seu comportamento na inoculação primária[34, 36]. Grigg *et al.* afirmaram, no entanto, que a passagem sucessiva de estirpes avirulentas no mesmo animal não altera as suas características de virulência[20].
Recentemente, Grigg *et al.*[20] levantaram a hipótese de que a virulência de *T. gondii* para os animais de laboratório seja o reflexo da virulência alélica. Estes investigadores referem que o cruzamento de duas estirpes não virulentas dão origem a algumas estirpes recombinantes mais virulentas que as suas progenitoras e associaram-na à combinação dos alelos nos cromossomas III e IV[20] enquanto Howe *et al.* associaram a virulência com marcadores existentes no cromossoma VIII[37].
Outros autores tentaram comprovar esta associação para estirpes do tipo I, sem resultados[1]. Terry *et al.* utilizaram segmentos de ADN repetitivos (REP) para caracterizar a virulência de isolados de *T. gondii*. Os isolados virulentos apresentavam REP's idênticos, enquanto que os não virulentos apresentavam REP's distintos entre si[38].
Nos últimos anos, a diferenciação de estirpes de *T. gondii* tem sido bastante estudada por vários autores. Estes estudos têm sido limitados pelas dificuldades de isolamento e manutenção de certas formas do parasita (ex. taquizoitos).
Os taquizoitos de *T. gondii* têm por vezes dificuldade em infectar culturas de células, *in vitro*, provavelmente devido à perda de receptores

das células em passagens elevadas, e são destruídos com a congelação e inactivados em algumas semanas a 4ºC[2]. Assim, os isolados têm sido mantidos em ratinhos de laboratório ao longo dos anos[34].

/ Diferenciação de estirpes

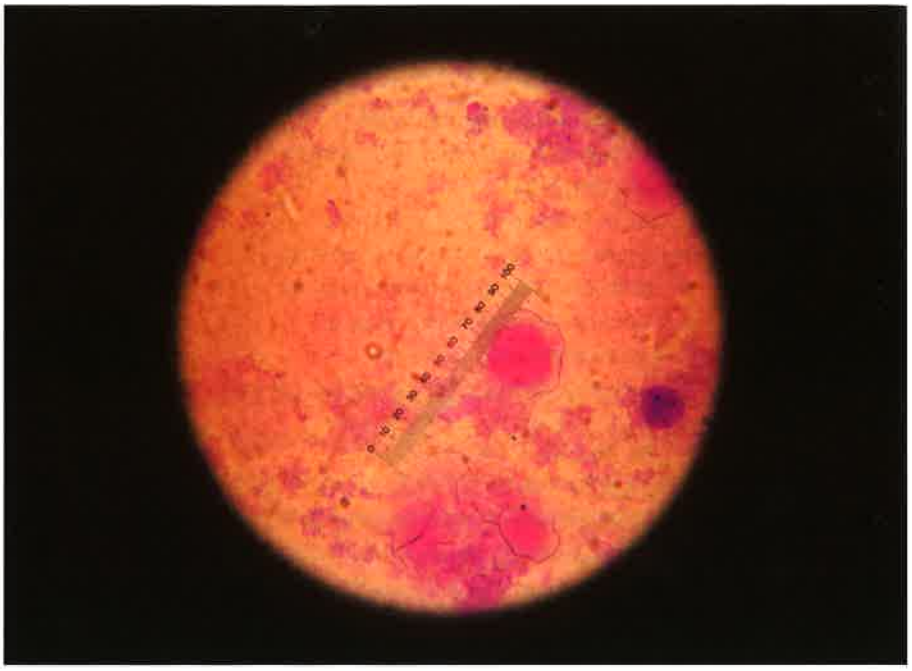
Recentemente, várias técnicas utilizando marcadores fenotípicos, serológicos, e genéticos têm sido utilizadas para diferenciar as estirpes de *T. gondii* na tentativa de correlacionar a diferenciação de estirpes com a virulência.

Electroforese enzimática

Esta técnica utiliza as isoenzimas extraídas dos taquizoitos, e consiste na análise de perfis electroforécticos após uma corrida em gel de poliacrilamida ou de agarose. O valor da electroforese multilocus de enzimas como técnica de análise tem sido largamente demonstrado. A diversidade alélica tem como vantagem o facto de ser bastante baixa na maioria dos marcadores genéticos (dois a quatro alelos) que têm sido utilizados, no entanto, para a sua execução são necessários cerca de $7x10^6$ taquizoitos, o que é um factor limitante da técnica. Estas concentrações de taquizoitos purificados são difíceis de obter em estirpes de divisão lenta, o que implica diversas passagens levando ao sacrifício de vários animais. Os sistemas isoenzimáticos polimórficos (marcadores isoenzimáticos) mais utilizados nesta técnica são os: amilase, aminotransferase de aspartato, esterase propionílica, fosfatase ácida, isomerase fosfato-glucose, glutationa redutase[23, 39].

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

A RFLP, como o nome indica, é realizada com enzimas de restrição directamente no ADN total do parasita. No entanto subsiste o mesmo problema na obtenção e purificação do material, e os padrões genéticos obtidos são de difícil interpretação. Esta técnica tem sido descrita por alguns autores na tipagem por "fingerprints" de isolados selvagens e de laboratório, fornecendo um perfil específico para cada estirpe[17, 40-42].



Dado o problema da concentração do material que as duas técnicas referidas anteriormente apresentam, tem sido usada a técnica de "Polymerase Chain Reaction" (PCR) para amplificação de fragmentos de ADN, que posteriormente possibilitam a diferenciação das estirpes de *T. gondii* por outras técnicas de biologia molecular.

"Random Amplified Polymorphic ADN Polymerase Chain Reaction" (RAPD-PCR)

A RAPD-PCR é uma dessas técnicas e consiste na amplificação de fragmentos de ADN, por PCR, com "primers" não específicos que discriminam os perfis de estirpes virulentas das não virulentas para o ratinho de laboratório[43]. Com o desenvolvimento dos estudos genéticos sobre o parasita, as técnicas que utilizam "primers" específicos têm sido mais frequentemente utilizadas tais como PCR--RFLP, sequenciação e microssatélites.

PCR-RFLP

A tipagem de *T. gondii* por PCR-RFLP consiste na utilização de enzima(s) de restrição sobre um produto de PCR. Esta técnica tem sido aplicada em diversos genes de *T. gondii* e é a técnica mais utilizada para a tipagem deste parasita em genes de apenas uma cópia[14, 16, 17, 44-47]. Os genes mais usados na tipagem de *T. gondii* são aqueles que codificam para os antigénios granulosos (GRA6, GRA8), para os antigénios de superfície (SAG1, SAG2) e outros antigénios (ROP1)[48].

Sequenciação

A sequenciação de ADN pode ser utilizada directamente como um método de genotipagem na detecção de deleções, de polimorfismos nucleotídicos numa sequência de pares de bases[20, 26, 49-53] ou como um método de detecção de zonas polimórficas de restrição de endonucleases para desenvolver ou confirmar as técnicas de PCR-RFLP. Na sequenciação são utilizados diferentes genes de uma única cópia, como os que codificam para antigénios, os que codificam para outros produtos como a actina, α-tubulina, β-tubulina, dihidrofolato redutase, trifosfatase nucleosídica e alfa DNA polimerase[26, 45, 54] e ainda, aqueles em que não é conhecida a sua função, como o C19, L328, 226, 850 e o 62B[16, 20, 55].
A maior capacidade discriminativa deste método é exemplificada no estudo do GRA6: na técnica de PCR-RFLP desenvolvida para este gene apenas se diferenciam três linhagens do parasita, mas

na sequenciação verifica-se que este gene é bastante mais polimórfico, revelando nove sequências alélicas[53].
A técnica de PCR-RFLP e sequenciação também têm sido realizadas em genes de múltiplas cópias, com funções desconhecidas, como é o caso do gene B1[55, 56] ou as TGR. As TGR são uma família de sequências que estão repetidas no genoma de *T. gondii* e que após a análise por PCR-RFLP revelaram dez perfis diferentes numa população de vinte e dois isolados de *T. gondii* onde foram estudados[40, 42]. No entanto, após a sequenciação, cada isolado revelou uma sequência de TGR única e própria[57]. Assim a sequenciação dos perfis dos isolados originados pelos marcadores, TGR e REP, já anteriormente referidos, facilitam estudos epidemiológicos em surtos humanos e/ou animais[58].

"Enzyme Linked Immunosorbent Assay" (ELISA)

Este método imunoenzimático permite a tipagem das estirpes utilizando como produto o soro do paciente, tirando vantagem dos perfis distintos gerados pela infecção com diferentes estirpes. A utilização desta técnica tem a vantagem de ser rápida, barata, relativamente não invasiva e evita o viés que pode ser originado com as múltiplas inoculações nos ratinhos de laboratório. No entanto, é pouco discriminatória, distinguindo apenas estirpes do tipo II e não II, porque as estirpes do tipo I e III processam alelos idênticos para algumas proteínas utilizadas (GRA2, GRA3, GRA6 e GRA7) nesta diferenciação[59].

Microssatélites

Os microssatélites pertencem a outra classe de marcadores genéticos. Os microssatélites são pequenas sequências repetidas de dois a seis nucleotídeos. Estas sequências repetidas são muito polimórficas devido à grande variação de tamanho que apresentam, consequentemente exibem múltiplos alelos, fazendo destes óptimos marcadores para os estudos genéticos. Os microssatélites polimórficos podem ser amplificados por PCR, com pequenas concentrações de ADN, e o tamanho dos alelos é calculado por sequenciação automática com "primers" fluorescentes. Esta técnica assegura resultados reprodutíveis e fidedignos[60, 61].
A origem genética da variabilidade destes marcadores é diferente da dos outros marcadores genéticos citados anteriormente. A hipervariabilidade genética dos microssatélites é explicada pela acumulação de mutações em extensão originada pela polimerase intra alélica na sequência do microssatélite durante a replicação.
A identificação dos microssatélites é considerada como a técnica mais informativa no estudo de polimorfismos de ADN. Ajzenberg *et al*[18] calcularam, através do Índex de Simpson, que o poder discriminatório da associação de oito marcadores de microssatélites numa população de oitenta e três isolados de *Toxoplasma* é de 0,997 (o máximo é igual a um), o que indica a elevada capacidade da técnica para a classificação das estirpes.
Uma vantagem desta técnica, relacionada com o poder discriminatório, é que ao contrário da análise de monolocus permite a identificação de alelos atípicos ou recombinantes. Outra particularidade, é permitir a identificação de infecções mistas. Como *T. gondii* é um parasita haploide, origina apenas um pico na análise dos microssatélites e quando se obtêm mais picos, isso indica que estamos perante uma infecção mista[61].
O poder discriminatório da associação destes oito microssatélites pode ainda ajudar em estudos epidemiológicos e no controlo genotípico de estirpes no laboratório.

/ Epidemiologia

Qualquer um dos três genótipos tem a capacidade de causar infecções humanas. Contudo, o genótipo II predomina na toxoplasmose humana e nos infectados por HIV[14, 16, 27].
Em França e nos EUA, o genótipo II tem sido identificado como maioritário nas colecções de estirpes isoladas de infecções humanas e animais[14-16, 42, 47].
Em Inglaterra, de dezanove casos de toxoplasmose congénita, 32% (6) pertenciam ao tipo I enquanto que 37% (7) pertenciam ao tipo II e em 31% (6) dos casos foram identificadas infecções mistas do tipo I e II[62]. Estudos efectuados em Espanha demonstraram que 75% das estirpes responsáveis por infecções congénitas pertencem ao genótipo I[63]. Em Portugal, até 2004, em casos humanos de toxoplasmose congénita, apenas tinham sido classificadas estirpes do tipo I, pelo gene SAG2[64]. Num estudo recente efectuado em São Paulo no Brasil, de uma população de vinte e cinco galinhas assintomáticas 64% (16) pertenciam ao tipo I e 36% (9) ao tipo III, não tendo sido isolada e identificada nenhuma estirpe do tipo II[65].
O número de isolados do tipo I em Portugal, em Espanha, Inglaterra e no Brasil é superior ao número encontrado em França e nos Estados Unidos. Esta diferença pode ter várias explicações, tais como a origem geográfica dos isolados, os hospedeiros envolvidos, a situação clínica e o número de amostras das colecções estudadas[62-66].
Genótipos recombinantes ou com alelos atípicos representam apenas cerca de 5 a 10% na maioria dos isolados[16, 23], sendo encontrados maioritariamente em África e no Brasil e em diferentes espécies de hospedeiros[20, 23-25, 27, 67].

/ Infecção humana *versus* genótipo

Em França, na infecção congénita apenas foram isoladas estirpes do tipo II. Estes isolados foram encontrados em infecções congénitas de diferente gravidade desde infecção letal, envolvimento neurocular severo, coriorretinites e toxoplasmose latente[15, 60]. A severidade da toxoplasmose congénita, depende essencialmente da idade de gestação na data da contaminação materna e do tempo de exposição do feto ao parasita. As estirpes do tipo II que não são virulentas para o ratinho podem ser extremamente agressivas para o feto. Algumas estirpes do tipo I e atípicas são muito virulentas para o Homem, nomeadamente na infecção congénita[58].
No imunodeprimido, as genotipagens têm sido efectuadas pelo estudo de genes de uma só cópia e por técnicas como a PCR-RFLP[16, 68].
No entanto, como já foi referido esta técnica não permite identificar estirpes recombinantes ou atípicas, o que pode originar uma classificação incompleta e equívoca. Das estirpes estudadas foram identificadas.maioritariamente estirpes do tipo II (75%), contudo as restantes 15% de estirpes foram classificadas como tipo I, o que

sugere que as estirpes deste genótipo podem formar pseudoquistos[58].
No imunocompetente, a infecção por *T. gondii* pode originar adenopatias e toxoplasmose ocular. Dardé descreveu que nas linfoadenopatias apenas se isolaram estirpes do tipo II[39], mas outros autores referem que em coriorretinites foram isoladas estirpes do tipo I e recombinantes[20, 40, 52].
Na Guiana Francesa, indivíduos imunocompetentes apresentaram falência de múltiplos órgãos, após o consumo de gamos infectados com estirpes atípicas o que sugere uma menor adaptação do sistema imunitário humano as estas estirpes[66, 67, 69].

/ Conclusões

Vários marcadores moleculares têm sido utilizados para diferenciar o parasita *T. gondii*. O desenvolvimento do projecto "*Toxoplasma* genome" tem facilitado a descoberta destes marcadores moleculares[70, 71]. Neste momento, mais de 73.000 genes e "expressed sequence tags" (EST) estão disponíveis no GenBank[72].
Apesar de todos estes estudos, ainda não foi possível associar a virulência das estirpes das infecções humanas com a genotipia do parasita, ou seja, ainda não foram encontrados os genes/proteínas responsáveis pelas patologias associadas ao comportamento da infecção no Homem. No entanto, de todos os marcadores moleculares descritos, são os microssatélites os mais informativos, permitindo a identificação de infecções mistas, de estirpes recombinantes e atípicas, sendo por isso, cada vez mais utilizados para a diferenciação de *T. gondii*.

/ Referências Bibliográficas

1) Su, C., D. Howe, J. Dubey, J. Ajioka et D. Sibley. 2002. Identification of quantitative trait loci controlling acute virulence in *Toxoplasma gondii*. PNAS. 99:10753-8.

2) Tenter, A., A. Heckeroth et L. Weiss. 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int. J. Parasitol. 30:1217-58.

3) Luft, B. et J. Remington. 1992. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. Clin. Infect. Dis. 15:211-22.

4) Montoya, J. et J. Remington. 1996. Toxoplasmic chorioretinitis in the setting of acute acquired toxoplasmosis. Clin. Infect. Dis. 23:277-82.

5) Mead, P., L. Slutsker, V. Dietz *et al.* 1999. Food-related illness and death in the United States. Emerg. Infect. Dis. 5:607-25.

6) Lamb, G. et H. Feldman. 1968. A nationwide serum survey of Brazilian military recruits, 1964. III. Toxoplasma dye test antibodies. Am. J. Epidemiol. 87:323-8.

7) Remington, J. S., B. Efron, E. Cavanaugh, J. Simon et A. Trejos. 1970. Studies on toxoplasmosis in El Salvador. Prevalence and incidence of toxoplasmosis as measured by the Sabin-Feldman dye test. Transactions RSTMH. 64:252-67.

8) Frenkel, J. K. et A. Ruiz. 1980. Human toxoplasmosis and cat contact in Costa Rica. Am. J. Trop. Med. Hyg. 29: 1167-80.

9) Coutinho, G., W. de Souza, L. Coura, M. Marzochi et M. Amendoeria. 1981. Levantamento dos resultados das reações de imunofluorescência indireta para toxoplasmose em 6079 pacientes de ambulatório ou gestantes no Rio de Janeiro realizadas durante os anos de 1971 a 1977. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. 23:48-56.

10) Frenkel, J., K. Hassanein, R. Hassanein, E. Brown, P. Thulliez et R. Nunez. 1995. Transmission of *Toxoplasma gondii* in Panama City, Panama: a five--year prospective cohort study of children, cats, rodents, birds, and soil. Am. J. Trop. Med. Hyg. 53:458-68.

11) Jones, J., D. Moran, M. Wilson, G. McQuillan, T. Navin et J. McAuley. 2001. *Toxoplasma gondii* infection in the United States: seroprevalence and risk factors. Am. J. Epidemiol. 154:357-65.

12) Ângelo, H. 2003. Dispositions légales et stratégies préventives de la toxoplasmose congénitale au Portugal. Archives de pédiatrie. 10:25-6.

13) Yilmaz, S. et S. Hopkins. 1972. Effects of different conditions on duration of infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts. J. Parasitol. **58:**938-9.

14) Howe, D., S. Honoré, F. Derouin et L. Sibley. 1997. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. J. Clin. Microbiol. 35: 1411-4.

15) Dardé, M. et D. Ajzenberg. 2003. Toxoplasmosis polymorphism and its clinical consequences. Archives de pédiatrie. 10:45-6.

16) Howe, D. et L. Sibley. 1995. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with humann disease. J. Infect. Dis. 172: 1561-6.

17) Sibley, L. et J. Boothroyd. 1992. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. Nature. 359:85-8.

18) Ajzenberg, D., A. Banuls, N. Tibayrenc et M. Dardé. 2002. Microssatellite analysis of *Toxoplasma gondii* of population shows a high polymorphism structured into two main clonal groups. Int. J. Parasitol. 32:37-8.

19) Lehmann, T., C. Blackston, S. Parmley, J. Remington et J. Dubey. 2000. Strain typing of *Toxoplasma gondii*: comparison of antigencoding and housekeeping genes. J. Parasitol. 86:960-71.

20) Grigg, M., S. Bonnefoy, A. Hehl, Y. Suzuki et J. Boothroyd. 2001a. Success and virulence in *Toxoplasma* as result of sexual recombination between two distinct ancestries. Science. 294:161-5.

21) Su, C., D. Evans, R. Kissinger, J. Ajioka et L. Sibley. 2003. Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. Science. 299:414-6.

22) Ferguson, D. 2002. *Toxoplasma gondii* and sex: essential or optional extra? Trends of Parasitol. 18:355-9.

23) Dardé, M. 1996. Biodiversity in *Toxoplasma gondii*. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 219:27-41.

24) Bossi, P., E. Caumes, L. Paris, M. Dardé et F. Bricaire. 1998. *Toxoplasma gondii* - associated Guillain Barré syndrome in an immunocompetent patient. J. Clin. Microbiol. 36:3724-5.

25) Cole, R., D. Lindsay, D. Howe *et al.* 2000. Biological and molecular characterizations of *Toxoplasma gondii* strains obtained from southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). J. Parasitol. 86:526-30.

26) Lehmann, T., D. Graham, E. Dahl *et al.* 2003. Transmission dynamics of *Toxoplasma gondii* on a pig farm. Infect. Genet. Evol. 3:135-41.

27) Grigg, M., J. Ganatra, J. Boothroyd et T. Margolis. 2001b. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. J. Infect. Dis. 184:633-9.

28) Carme, B., F. Bissuel, D. Ajzenberg *et al.* 2002. Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. J. Clin. Microbiol. 40:4037-44.

29) Ghosn, J., L. Paris, D. Ajzenberg *et al.* 2003. Atypical toxoplasmic manifestation after discontinuation of maintenance therapy in a human immunodeficiency virus type 1-infected patient with immune recovery. Clin. Infect. Dis. 37:112-4.

30) Miller, M., M. Grigg, C. Kreuder *et al.* 2004. An unusual genotype of *Toxoplasma gondii* is common in California sea otters (*Enhydra lutris nereis*) and is a cause of mortality. Int. J. Parasitol. 34:275-84.

31) Ajzenberg, D., A. Bañuls, C. Su *et al.* 2004. Genetic Diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. Int. J. Parasitol. 34:1185-96.

32) Suzuki, Y, F. Conley et J. Remington. 1989. Differences in virulence and development of encephalitis during chronic infection vary with the strain of *Toxoplasma gondii*. J. Infect. Dis. 159:790-4.

33) Sibley, L., D. Mordue et D. Howe. 1999.

Experimental approach to understanding virulence in toxoplasmosis. Immunobiology. 201:210-24.

34) Dubey, J. P. 1977. "*Toxoplasma, Hammondia, Besnoitia, Sarcocystis*, and other tissue cyst-forming coccidian of man and animals". In: Kreier, J. P. (Ed.). Parasitic Protozoa, Academic Press, New York, 101-237.

35) Sabin, A. 1941. Toxoplasmic encephalitis in children. J. Am. Med. Associat. 116:801-7.

36) Jacobs, L. et M. Melton. 1954. "Modifications in virulence of a strain of *Toxoplasma gondii* by passage in various hosts. Am. J. Trop. Med. Hyg. 3:447-57.

37) Howe, D., B. Summers and L. Sibley. 1996. Acute virulence in mice associated with markers on chromosome VII in *Toxoplasma gondii*: analysis. Infect. immun. 64:5193-8.

38) Terry, R., J. Smith, P. Duncanson et E. Petersen. 2001. MGE-PCR: a novel approach to the analysis of *Toxoplasma gondii* strain differentiation using mobile genetic elements. Int. J. Parasitol. 31:155-61.

39) Dardé, M., B. Bouteille et M. Perstreal. 1992. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiologic implications. J. Parasitol. 78:909-12.

40) Cristina, N., M. Liaud, F. Santoro, B. Oury et P. Thomas. 1991. A family of repeated DNA sequences in *Toxoplasma gondii*: cloning, sequence analysis, and use in strain characterization. Exp. Parasitol. 73:73-81.

41) Howe, D. et L. Sibley. 1994. *Toxoplasma gondii*: analysis of different laboratory stocks of the RH strain reveals genetic heterogeneity. Exp. Parasitol. 78:242-5.

42) Literák, I., I. Rychilk, V. Svobodova et Z. Pospisil. 1998. Restriction fragment length polymorphism and virulence of Czech *Toxoplasma gondii* strains. Int. J. Parasitol. 28:167-74.

43) Guo, Z., U. Gross et A. Johnson. 1997. *Toxoplasma gondii* virulence markers identified by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. Parasitol. Res. 83:458-63.

44) Parmley, S., U. Gross, A. Sucharczuk, T. Windeck, G. Sgarlato et J. Remington. 1994. Two alleles of the gene encoding surface antigen P22 in 25 strains of *Toxoplasma gondii*. J. Parasitol. 80:293-301.

45) Binas, M. et A. Johnson. 1998. A polymorphism in a DNA polymerase alpha gene intron differentiates between murine virulent and avirulent strains of *Toxoplasma gondii*. Int. J. Parasitol. 28:1033-40.

46) Mondragon, R., D. Howe, J. Dubey et L. Sibley. 1998. Genotypic analysis of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs. J. Parasitol. 84:639-41.

47) Owen M. et A. Trees. 1999. Genotyping of Toxoplasma gondii associated with abortion in sheep. J. Parasitol. 85:382-4.

48) Lin, A., E. Shin, T. Kim et J. Park. 2005. Genetic characteristics of the Korean isolate KI-1 of *Toxoplasma gondii*. Korean J. Parasitol. 43:27-32.

49) Luton, K., M. Gleeson et A. Johnson. 1995. rRNA gene sequence heterogeneity among *Toxoplasma gondii* strains. Parasitol. Res. 81:310-5.

50) Rinder, H., A. Thomschke, M. Dardé et T. Löscher. 1995. Specific DNA polymorphisms discriminate between virulence and non-virulence to mice in nine *Toxoplasma gondii* strains. Mol. Biochem. Parasitol. 69:123-6.

51) Meisel, R., S. Stachelhaus, M. Mévélec, G. Reichmann, J. Dubremetz et H. Fischer. 1996. Identification of two alleles in the GRA4 locus of *Toxoplasma gondii* determining a differential epitope which allows discrimination of type I versus type II and III strains. Mol. Biochem. Parasitol. 81:259-63.

52) Windeck, T. et U. Gross. 1996. *Toxoplasma gondii* strain-specific transcript levels of SAG1 and their association with virulence. Parasitol. Res. 82:715-9.

53) Fazaeli, A., P. Carter, M. Dardé et T. Pennington. 2000. Molecular typing of *Toxoplasma gondii* strains by GRA6 gene sequence analysis. Int. J. Parasitol. 30:637-642.

54) Asai, T., S. Miura, L. Sibley, H. Okabayashi et T. Takeuchi. 1995. Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hydrolase isoenzymes from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. J. Biol. Chem. 270:11391-7.

55) Grigg, M. et J. Boothroyd. 2001c. Rapid identification of virulent type I strains of the protozoan pathogen *Toxoplasma gondii* by PCR--Restriction fragment length polymorphism analysis at the B1 gene. J. Clin. Microbiol. 39:398-400.

56) Burg, J., C. Grover, P. Pouletty et J. Boothroyd. 1989. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 27:1787-92.

57) Hogdall, E., J. Vuust, P. Lind et G. Hide. 2001. Characterisation of *Toxoplasma gondii* isolates using polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) of the non-coding *Toxoplasma gondii* (TGR)-gene sequences. Int. J. Parasitol. 30:853-8.

58) Dardé, M. 2004. Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. Annali dell'Istituto Superiore di Sanita. 40:57-63.

59) Kong, J., M. Grigg, L. Uyetake, S. Parmley and J. Boothroyd. 2003. Serotyping of *Toxoplasma gondii* infections in humans using synthetic peptides. J. Infect. Dis. 187:1484-95.

60) Costa, J., M. Dardé, B. Assouline, M. Vidaud et S Bretagne. 1997. Microssatellite in beta-tubulin gene of *Toxoplasma gondii* as new genetic marker for use in direct screening of amniotic fluids. J. Clin. Microbiol. 35:2542-5.

61) Ajzenberg, D., A. Dumètre et M. Dardé. 2005. Multiplex PCR for typing strains of *Toxoplasma gondii*. J. Clin. Microbiol. 43:1940-3.

62) Aspinall, T., E. Guy, K. Roberts *et al.* 2002. Molecular evidence for multiple *Toxoplasma gondii* infections in individual patients in England and Wales: public health implications. Int. J. Parasitol. 33:97-103.

63) Fuentes, I., J. Rubio, C. Ramírez et J. Alvar. 2001. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human Toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. J. Clin. Microbiol. 39:1566-70.

64) Vilares, A., L. Reis et H. Ângelo. 2003. Genetical characterization of portuguese strains of *Toxoplasma gondii* from human congenital infections. Acta Parasitológica Portuguesa. 10:58-9.

65) Dubey, J., D. Graham, C. Blackston *et al.* 2002. Biological and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from São Paulo, Brazil: unexpected findings. Int. J. Parasitol. 32:99-105.

66) Bossi, P., P. Luc, E. Caumes, C. Katlama et F. Bricaire. 2001. Severe acute disseminated toxoplasmosis acquired by an immunocompetent patient in French Guiana. Scan. J. Infect. Dis. 34:311-4.

67) Dardé, M., I. Villena, J. Pinon et I. Beguinot. 1998. Severe toxoplasmosis caused by a *Toxoplasma gondii* strain with a new isoenzyme type acquired in French Guiana. J. Clin. Microbiol. 36:324.

68) Honoré, S., A. Couvelard, Y. Garin *et al.* 2000. Génotypage des souches de *Toxoplasma gondii* chez des patients immunodéprimés. Pathologie Biologie. 48:541-7.

69) Debord, T., P. Eono, J. Rey et R. Roué. 1996. Les risques infectieux chez les militaries en operation. Méd. Mal. Infect. 24:402-7.

70) Ajioka, J., J. Boothroyd, B. Brunk *et al.* 1998. Gene discovery by EST sequencing in *Toxoplasma gondii* reveals sequences restricted to the apicomplexa. Gen. Res. 8:18-28.

71) Manger, I., A. Hehl, S. Parmley *et al.* 1998. Express sequence tag analysis of the bradizoite stage of *Toxoplasma gondii*: identification of developmentally regulated genes. Infect. Immun. 66:1632-167.

72) Khan, A., S. Taylor, C. Su *et al.* 2005. Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. Nucleic Acids Res. 33:2980-92.