Patrícia Regina Barboza Araújo

Alta eficiência diagnóstica do teste IgM-ELISA utilizando múltiplos antígenos peptídicos (MAPs) de *T. gondii* (ESA SAG-1, GRA-1 e GRA-7) na diferenciação de formas clínicas da toxoplasmose

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências
Área de Concentração: Moléstias
Infecciosas e Parasitárias
Orientador: Prof. Dr. Antonio Walter Ferreira

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Araújo, Patrícia Regina Barboza

Alta eficiência diagnóstica do teste IgM-ELISA utilizando múltiplos antígenos peptídicos (MAPs) de *T. gondii* (ESA SAG-1, GRA-1 e GRA-7) na diferenciação de formas clínicas da toxoplasmose / Patrícia Regina Barboza Araújo. -- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientador: Antonio Walter Ferreira.

Descritores: 1.Toxoplasma *gondii* 2.Sorologia 3.Antígenos protozoários
4.ELISA 5.Peptídeos/uso diagnóstico

USP/FM/DBD-275/11

Meu adorado pai,

*De tarde quero descansar
Chegar até a praia e ver
Se o vento ainda esta forte
E vai ser bom subir nas pedras
Sei que faço isso pra esquecer
Eu deixo a onda me acertar
E o vento vai levando
Tudo embora...
Agora está tão longe
ver a linha do horizonte me distrai
Dos nossos planos é que tenho mais saudade
Quando olhávamos juntos
Na mesma direção
Aonde está você agora
Alem de aqui dentro de mim...
Agimos certo sem querer
Foi só o tempo que errou
Vai ser difícil sem você
Porque você esta comigo
O tempo todo
E quando vejo o mar
Existe algo que diz
Que a vida continua
E se entregar é uma bobagem...
Já que você não está aqui
O que posso fazer
É cuidar de mim
Quero ser feliz ao menos,
Lembra que o plano
era ficarmos bem*

Renato Russo

Meu Amor,

*Alma gêmea de minha alma
Flor de luz de minha vida
e estrela caída
Das belezas da amplidão .
Quando eu errava no mundo
Triste e só, no meu caminho ,
Chegaste, devagarinho ,
E encheste-me o coração.
Vinhas na benção das flores
Da divina claridade ,
Tecer-me a felicidade
Em sorrisos de esplendor !
És meu tesouro infinito .
Juro-te eterna aliança
Porque sou tua esperança ,
Como és todo meu amor !
Alma gêmea de minha alma
Se eu te perder algum dia...
Serei tua escura agonia ,
Da saudade nos seus véus...
Se um dia me abandonares
Luz terna dos meus amores,
Hei de esperar-te , entre as flores
Da claridade dos céus .*

Emmanuel

Minha filha,

Antes de ser mãe eu fazia e comia os alimentos ainda quentes.

Eu não tinha roupas manchadas.

Eu tinha calmas conversas ao telefone.

*Antes de ser mãe eu dormia o quanto eu queria e nunca
me preocupava com a hora de ir para cama.*

*Antes de ser mãe eu tinha controle sobre a minha mente, meus pensamentos, meu
corpo e meus sentimentos.*

Eu nunca chorei olhando pequeninos olhos que choravam.

Eu nunca fiquei gloriosamente feliz com uma simples risadinha.

Eu nunca fiquei sentada horas olhando um bebê dormindo.

Eu nunca senti meu coração se despedaçar quando a via chorar

*Eu nunca imaginei que uma coisinha tão pequenina pudesse
mudar tanto a minha vida.*

Eu nunca imaginei que pudesse amar alguém tanto assim.

*Eu não imaginava que algo tão pequenino pudesse
fazer-me sentir tão importante*

Agradecimentos especiais

À **Deus** por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminho nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

À **família Carminato**, que com amor, carinho e compreensão me acolheu... Marli e Toni meus anjos da guarda; Rique, Fabi, Mi e Nitta pela compreensão e carinho de sempre com a nova “agregada” maluquinha.

À **família Araújo**, que sempre esteve direta ou indiretamente presente nesta longa jornada desde o jardim da infância até o doutorado, sempre incentivando....

Ao **Prof. Dr. Antonio Walter Ferreira**, meu orientador, amigo que em 2001 acreditou em mim e me mostrou o caminho da ciência, fez e ainda faz parte da minha vida nos momentos bons e ruins.

Aos **amigos do LIM-48** que direta ou indiretamente me auxiliaram durante todo o longo percurso da pós desde 2001. Em especial para Kelly, Sandra Beck, Sandra Ávila, Fabiana, Janaína, Guita, Carmem e Amanda.

Aos meus grandes **amigos da Colsan** que participaram ativamente do meu crescimento profissional e pessoal desde o mestrado até o doutorado. Em especial para Fabrício, Cristiano, Renata, Luciana, Dani, Flávia, Rosângela, Janaína, Carine, Guilherme, Tânia, Ana Paula, Cláudia, Keane, Aline e Shalon.

Ao **Prof. Dr. Mario Camargo** pela oportunidade de conhecer o pesquisador mais excepcional e ainda poder conviver alguns anos aprendendo sobre sorologia.

Ao **Dr. Paulo Leser** por me ensinar que sorte não existe e sim inteligência para identificar a oportunidade quando ela aparece.

Ao Dr. **Cristóvão Luís Pitangueira Mangueira** pelo apoio e excepcional incentivo oferecido como chefe do laboratório clínico do HIAE no meu crescimento profissional.

Ao **Prof. Dr. Aluísio Augusto Cotrim Segurado** pelo voto de confiança na realização do doutorado e também por ser um exemplo a ser seguido. Sua contribuição foi essencial para a finalização deste trabalho.

Às **secretarias do programa de Pós-Graduação** em Doenças Infecciosas e Parasitárias Roseli e Vânia, pela amizade e auxílio prestado a mim, enquanto estudante.

*“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo,
qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim”*

Emmanuel

SUMÁRIO

Lista de siglas e símbolos

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1.0 INTRODUÇÃO	1
1.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS	1
1.2 <i>T. GONDII</i>	3
1.3 HOSPEDEIROS E CICLO DE VIDA.....	7
1.4. CONTAMINAÇÃO HUMANA.....	10
1.5. GENÓTIPOS DE <i>T. GONDII</i>	11
1.6 PATOGENIA E INTERAÇÃO PARASITO - HOSPEDEIRO.....	13
1.7 RESPOSTA HUMORAL E CELULAR.....	15
1.8 ANTÍGENOS DE <i>T. GONDII</i>	19
1.9 ASPECTOS CLÍNICOS	23
1.10 DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE.....	26
2 JUSTIFICATIVA.....	41
3 OBJETIVOS	43
4.0 MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1. CASUÍSTICA	44
4.2 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA.....	46
4.3. MANUTENÇÃO DA CEPA RH DE <i>T. GONDII</i>	46
4.4. CULTURA DE FIBROBLASTOS HUMANOS (FH).....	47
4.5. OBTENÇÃO DO ANTÍGENO ESA DE <i>T. GONDII</i>	47
4.6. DOSAGEM PROTÉICA DO ANTÍGENO ESA DE <i>T. GONDII</i>	47
4.7. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)	48
4.8. SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS SAG-1, GRA-1 E GRA-7 DE <i>T. GONDII</i>	48
4.9. MAP: COMBINAÇÃO DOS PEPTÍDEOS SAG-1, GRA-1 E GRA-7 DE <i>T. GONDII</i>	50
4.10 PADRONIZAÇÃO DO TESTE IMUNOENZIMÁTICO ELISA.....	52
4.10.1 ESTUDO DA DILUIÇÃO DOS SOROS E CONCENTRAÇÃO DE ANTÍGENOS.....	52
4.10.2 ANTÍGENOS PEPTÍDICOS	52
4.10.3 FASE SÓLIDA	53

4.10.4 DETERMINAÇÃO DO LIMAR DE REATIVIDADE	55
4.10.5 REPRODUTIBILIDADE	57
4.10.6 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE	57
4.10.7 ÍNDICE KAPPA	57
4.10.8 EFICIÊNCIA DIAGNÓSTICA	58
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	58
6 RESULTADOS.....	60
6.1 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO PROTÉICO DO ANTÍGENO ESA DE <i>T. GONDII</i>	60
6.2. PERFIS DE PROTEÍNAS DOS DIFERENTES LOTES DE ANTÍGENOS POR SDS-PAGE.....	61
6.3 ANTÍGENOS PEPTÍDICOS ASSOCIADOS COMO MAP	62
6.4. PADRONIZAÇÃO DO ELISA FRENTE AOS DIFERENTES MAPS E PEPTÍDEOS ISOLADOS (SAG-1, GRA-1 E GRA-7).....	64
6.4.1 REAÇÃO CRUZADA	69
6.4.2 REPRODUTIBILIDADE INTRA-TESTE.....	70
6.4.3 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE	70
6.4.4 CORRELAÇÃO E ÍNDICE KAPPA	74
6.4.5 EFICIÊNCIA DIAGNÓSTICA	78
7.0 DISCUSSÃO	80
8.0 CONCLUSÕES	90
9.0 REFERÊNCIAS	91
Apêndices	

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

µg	Micrograma
µl	Microlitro
µml	Microlitro
Acs	Anticorpos
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
Ala	Alanina
C-18	Ciclofilina
CCR5	Receptor 5 de quimiocina
DAT	Teste de algutinação de taquizoítas com formalina
ELISA	Teste imunoenzimático
ESA	Antígeno de excreção/secreção
fg	Fentograma
FH	Fibroblasto humano
<i>g</i>	Força relativa da gravidade
GPI	Glicosil-inositol-fosfolipídeo
GRA	Antígeno do grânulo denso
IC	Intervalo de confiança
IFAT	Teste de imunofluorescência indireta
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IHAT	Teste de hemaglutinação indireta
IHC	Imunohistoquímica
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
INF-γ	Interferon gama
IR	Índice de reatividade
kDa	KiloDalton
Lys	Lisina
M	Molar
mA	miliAmper
MAP	Múltiplos antígenos peptídicos
MAT	Teste DAT com 2-mercaptoetanol
MGEs	Mobile Genetic Elements
MIC	Antígeno do micronema
ml	Mililitro
N	Normal
NK	Células natural killer
nm	Nanômetros
°C	Grau Celcius
p	Nível-p (Significância estatística)
pb	Pares de base
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase

PVDF	Membrana de polyvinylidene diluoride
r	Correlação de Sperrman
RNI	Intermediário reativo de nitrogênio
ROI	Intermediário reativo de oxigênio
ROP	Antígeno da roptria
rpm	Rotações por minuto
RPMI	Meio de cultura (Roswell Park Memorial Institute)
SAG	Antígeno de superfície
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presence de SDS
SFDT	Teste de Sabin-Feldman
SNC	Sistema nervoso central
Sp	Espécie
STAg	Antígeno solúvel
T	Tween
T CD4+	Linfócito T CD4+
T CD8+	Linfócito T CD8+
Th1	Linfócitos T helper 1
TMB	Tetrametilbenzidine
V	Volts
VP	Vacúolo parasitóforo
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo
x	Veze

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Taquizoíto – Fotomicrografia eletrônica de taquizoíto de <i>T. gondii</i>	5
Figura 2-	Bradizoíto – Fotomicrografia de bradizoíto de <i>T. gondii</i> em coloração Giemsa, obtidos de corte de fibra muscular humana.....	6
Figura 3-	Oocisto não esporulado; B: Oocisto esporulado contendo dois esporocistos, onde em um deles 4 esporozoítos de <i>T. gondii</i> podem ser vistos.	7
Figura 4-	Ciclo biológico do <i>T. gondii</i>	10
Figura 5-	Taquizoíto invadindo célula Hella (HC).	16
Figura 6-	Desenho esquemático das organelas de <i>T. gondii</i>	22
Figura 7-	Demonstração do método de síntese direta para a construção dos MAPs estudados.....	49
Figura 8-	Estrutura dos dendrímeros (MAP) derivados da combinação dos peptídeos (SAG-1, GRA-1 e GRA-7) de <i>T. gondii</i> ligados ao core de polilisina.....	51
Figura 9	Eletróforese de gel em poliacrilamida (SDS-PAGE a 18%) em condições não redutoras das frações representativas dos 10 lotes produzidos do ESA de <i>T. gondii</i>	61
Figura 10	Análise por espectrometria de massa (MALDI-TOF) das construções de MAP a partir dos peptídeos SAG-1 (30kDa), GRA-1(24kDa) e GRA-7(29kDa).	63
Figura 11	Determinação do limiar de reatividade para a detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA por ELISA com os diferentes antígenos peptídicos isolados.....	66
Figura 12	Determinação do limiar de reatividade para a detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA por ELISA com os diferentes antígenos peptídicos associados na forma de MAPs.....	67
Figura 13	Correlação e índice kappa entre a detecção de anticorpos IgG anti-MAP1 com o teste automatizado VIDAS-IgG nos grupos I,II e III.	75
Figura 14	Correlação e índice kappa entre a detecção de anticorpos IgM anti-MAP1 com o sistema automatizado VIDAS-IgM nos grupos I,II e III.....	76
Figura 15	Correlação e índice kappa entre a detecção de anticorpos IgA anti-MAP1 com a associação entre o sistema automatizado VIDAS-IgM e o teste de avidéz de anticorpos IgG anti- <i>T. gondii</i> -VIDAS nos grupos I,II e III.....	77
Figura 16	Eficiência diagnóstica do teste ELISA para detecção dos anticorpos IgG, IgM e IgA frente a MAP1 e SAG-1 nos grupos I, II e III.	78
Figura 17	Deteção de anticorpos IgM anti-MAP-1 nos grupos I, II e III.	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Relação das seqüências dos peptídeos derivados do ESA de <i>T. gondii</i>	50
Tabela 2-	Interpretação da área sob a curva.....	57
Tabela 3-	A interpretação dos valores escolhida foi a de Pereira (1995).....	58
Tabela 4-	Concentração protéica e volume final obtido para os 10 lotes de antígenos ESA de <i>T. gondii</i>	60
Tabela 5-	Média das densidades ópticas obtidas durante a padronização do teste ELISA para detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA frente aos antígenos isolados.....	65
Tabela 6-	Média das densidades ópticas obtidas durante a padronização do teste ELISA para detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA frente aos diferentes MAPs.....	65
Tabela 7-	Resultados qualitativos dos testes para análise de interferentes em amostras negativas para toxoplasmose na detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA frente aos diferentes MAPs estudados.....	68
Tabela 8-	Resultados qualitativos dos testes para análise de reação cruzada em amostras negativas para toxoplasmose e positivas para outras doenças na detecção de anticorpos IgG-, IgM- e IgA- frente aos diferentes MAPs estudados.....	69
Tabela 9-	Sensibilidade e especificidade de anticorpos IgG específicos para os peptídeos SAG-1, GRA-1 e GRA-7 isolados e combinados como MAP-1, MAP-2, MAP-3 e MAP-4 para o diagnóstico da toxoplasmose humana.....	71
Tabela 10	Sensibilidade e especificidade de anticorpos IgM específicos para os peptídeos SAG-1, GRA-1 e GRA-7 isolados e combinados como MAP-1, MAP-2, MAP-3 e MAP-4 para o diagnóstico da toxoplasmose humana.....	72
Tabela 11	Sensibilidade e especificidade de anticorpos IgA específicos para os peptídeos SAG-1, GRA-1 e GRA-7 isolados e combinados como MAP-1, MAP-2, MAP-3 e MAP-4 para o diagnóstico da toxoplasmose humana.....	73

RESUMO

Araujo PRB. **Alta eficiência diagnóstica do teste IgM-ELISA utilizando múltiplos antígenos peptídicos (MAPs) de *T. gondii* (ESA SAG-1, GRA-1 e GRA-7) na diferenciação de formas clínicas da toxoplasmose.** [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010.

Os principais marcadores sorológicos para o diagnóstico da toxoplasmose aguda ou recente são os anticorpos IgM específicos e anticorpos IgG de baixa avidéz. Entretanto em alguns pacientes, anticorpos IgM e baixa avidéz de anticorpos IgG podem persistir, ultrapassando o período da fase recente aguda contribuindo para erros de interpretação diagnóstica. No presente estudo, a eficiência diagnóstica do ensaio imunoenzimático foi avaliada, com o uso de frações antigênicas ou peptídeos sintéticos originados do antígeno ESA de *T.gondii*, denominados de SAG-1, GRA-1 e GRA-7. Foram estudadas frações isoladas e combinadas em múltiplos peptídeos antigênicos (MAP), visando estabelecer um perfil confiável para definição sorológica de toxoplasmose recente aguda em amostra única de soro. A melhor eficiência diagnóstica do ensaio foi encontrada com o uso da combinação de peptídeos SAG-1, GRA-1 e GRA-7, denominada MAP1. A detecção de anticorpos IgG e IgM anti-MAP1 apresentou a melhor definição entre a fase recente aguda da fase recente não aguda na toxoplasmose. Nossos resultados mostraram que IgM anti-MAP1 poderá se constituir um marcador sorológico importante no aumento da eficiência diagnóstica da toxoplasmose recente aguda.

Descritores: 1.*T. gondii* 2.Sorologia 3.Antígeno excretado e secretado 4. Múltiplos antígenos peptídicos

SUMMARY

Araujo PRB. **High diagnostic efficiency of IgM-ELISA with the use of multiple antigen peptides (MAPS) from *T. gondii* ESA (SAG-1, GRA-1 AND GRA-7 in acute toxoplasmosis.** [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010.

The main serological marker for the diagnosis of recent toxoplasmosis is the specific IgM antibody, along with IgG antibodies of low avidity. However, in some patients these antibodies may persist long after the acute/recent phase, contributing to misdiagnosis in suspected cases of toxoplasmosis. In the present study, the diagnostic efficiency of ELISA was evaluated, with the use of peptides derived from *T. gondii* ESA antigens, named SAG-1, GRA-1 and GRA-7. In the assay referred to, we studied each of these peptides individually, as well as in four different combinations, as Multiple Antigen Peptides (MAP), aiming to establish a reliable profile for the acute/recent toxoplasmosis with only one patient serum sample. The diagnostic performance of the assay using MAP1, with the combination of SAG-1, GRA-1 and GRA-7 peptides, demonstrated better discrimination of the acute/recent phase from non acute/recent phase of toxoplasmosis. Our results show that IgM antibodies to MAP1 may be useful as a serological marker, enhancing the diagnostic efficiency of the assay for acute/recent phase of toxoplasmosis

Descriptors: *T. gondii*, serology, ESA and MAP

1.0 INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma zoonose causada por *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), protozoário intracelular obrigatório capaz de infectar todos os animais vertebrados e alguns invertebrados. A grande importância médica da toxoplasmose decorre de seu aspecto endêmico, traduzido pela elevada prevalência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* na população, em frequências crescentes com as faixas etárias. Em nosso país são comuns porcentagens de adultos soro-reativos da ordem de 37% (região centro-oeste) a 70% (região sudeste) ou mais. Estudos soropidemiológicos têm mostrado níveis significativos de anticorpos anti-*T. gondii* nas populações humanas, representando cerca de 500 milhões a 1 bilhão de pessoas no mundo que já tiveram contato com o parasito (Macedo, 1994).

O laboratório desempenha papel fundamental no diagnóstico das diferentes formas clínicas da toxoplasmose de que se destacam: formas agudas ou recentes adquiridas pelo contato com o parasito, infecções que ocorrem durante a gestação, doença congênita no recém-nascido, manifestações oculares e reagudizações em pacientes imunodeficientes. Para segurança e precisão diagnóstica, torna-se imprescindível a utilização e interpretação adequada dos métodos laboratoriais disponíveis associados à dados epidemiológicos e clínicos.

1.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

T. gondii já foi detectado na maior parte das regiões do globo terrestre. A grande mobilidade dos hospedeiros intermediários infectados e aves em particular

permitiram que o parasito se distribuísse por todas as regiões do mundo não importando o clima ou barreiras geográficas (Frenkel, 1990). Porém, os maiores índices de soroprevalência são encontrados nas áreas tropicais úmidas (Camargo, 1996; Cantos et al., 2000).

Estima-se que entre 30 e 50% da população humana do planeta apresenta anticorpos para o agente etiológico da toxoplasmose, o que indica alta exposição ao parasito, mas não necessariamente o desenvolvimento da doença (Dubey & Beatie, 1988). A faixa de prevalência de toxoplasmose mundial é muito variável encontrando-se dados entre 20 a 90% (Server et al., 1988; Jaqueti et al., 1991; Lappalainen et al., 1992; Lelong et al., 1995; Pelloux et al. 2002; Kasper et al., 2003; Jones et al., 2007; Xiao et al 2010). Esta variação pode estar relacionada a diferentes fatores como: formas de transmissão, hábitos alimentares, infra-estrutura sanitária, clima e idade (Cantos et al. 2000).

Dados de regiões do Brasil que realizaram inquéritos soroepidemiológicos revelam uma alta prevalência da toxoplasmose com variações de 50% (Belo Horizonte/MG) a 76% (Manaus/AM) (Carmo et al., 1997; Bahia-Oliveira et al., 2003; Coelho et al., 2003). Para avaliação de infecção recente, a positividade para anticorpos IgM anti *T.gondii* e títulos crescentes de anticorpos IgG podem indicar doença ativa, e a análise deve ser realizada de maneira criteriosa para a interpretação soroepidemiológica (Bertschinger, 1980). Segundo Camargo (1996) qualquer título de Acs IgM detectados por imunofluorescência indireta traduz infecção recente independentemente da presença ou não de títulos de Acs IgG. Atualmente a presença de Acs IgM pode não significar necessariamente uma infecção ativa. Técnicas de alta

sensibilidade podem detectar resíduos de Acs IgM por mais de 1 ano após o contágio sem nenhum significado clínico (Bader et al., 1997)

A incidência mundial de toxoplasmose aguda na gravidez varia de 0,06 a 1,4% (Remington, 1990), onde aproximadamente 15% das infecções fetais resultam em morte intra-uterina, e em cerca de 90% dos que nascem 80% podem desenvolver lesões diversas ou desordens tardias do sistema nervoso central (SNC) (Cantos et al., 2000).

1.2 *T. gondii*

DESCOBERTA, HISTÓRIA E DEFINIÇÃO

T. gondii foi descrito no Brasil, em 1908, por Splendore parasitando coelhos em laboratório e por Nicole & Manceaux, no mesmo ano, em um roedor da espécie *Ctenodactylus gondii*, no Instituto Pasteur da Tunísia (Neves, 2000; Cimerman, 1999). Inicialmente foi chamado de “*Leishmania gondii*” por sua similaridade com protozoários do gênero *Leishmania sp.* A adequação da nomenclatura ocorreu em 1909 (Nicolle & Manceaux, 1908).

A espécie *T. gondii* (Nicolle & Manceaux, 1908) pertence ao gênero *Toxoplasma* (Nicolle & Manceaux, 1909), Filo *Protozoa*, Sub-filo *Apicomplexa*, Classe *Sporozoa*, Família *Sarcocystidae* e, Sub-família *T. gondiitinae*. O nome genérico *T. gondii* (toxon = arco, plasma = forma) é decorrente de sua forma crescente (ou em arco) da fase mais comumente observada. Todavia, o parasito possui diferentes formas que recebem diferentes denominações, dependendo do estágio evolutivo ou do tecido parasitado.

A primeira descrição de infecção humana foi feita por Jankü, em 1923, relatando um caso de uma criança falecida em Praga (Cimerman, 1999). Torres et al., em 1927, descreveram no Rio de Janeiro a presença de microrganismos que identificaram como *T. gondii*, em cortes histológicos de cérebro, miocárdio e músculo esquelético de um recém nascido falecido no 29º dia de vida. Wolf & Cohen, em 1937, foram os primeiros autores a descrever a infecção congênita no homem, relatando a ocorrência de toxoplasmose em recém nascido com encefalite, meningite e mielite. Pinkerton & Weinman, em 1940, e Pinkerton & Henderson, em 1941, nos Estados Unidos, registraram a ocorrência da toxoplasmose em adultos, com o isolamento do parasito. Mas, somente após o desenvolvimento do teste do corante (dye test) de Sabin & Feldman, em 1948, é que foi possível demonstrar a alta prevalência desta doença em todo mundo. (Neves, 2000). Frenkel et al., 1970 demonstraram que os oocistos representam a fase sexuada do agente. Miller et al., 1972, provaram que os únicos mamíferos capazes de suportar o ciclo sexuada intestinal do *T. gondii* e excretar os oocistos são os felinos, tanto os domésticos quanto os selvagens.

FORMAS DE *T. gondii*

TAQUIZOÍTOS

Os taquizoítos foram às primeiras formas de *T. gondii* descritas (Figura 1 A e B). É um organismo em forma de arco com 4 a 8 µm de comprimento por 2 a 4 µm de largura (Dubey et al., 1998). Sua estrutura possui uma extremidade mais afilada a qual apresenta um complexo apical composto de róptrias, micronemas, conóide e anel polar que é característico do filo Apicomplexa (Figura 1A).

A outra extremidade é mais arredondada, geralmente, apresentado o núcleo e organelas. Taquizoítos são formas de multiplicação rápida do parasito causando destruição das células infectadas (sistema fagocitário mononuclear) e sua disseminação via hematogênica (Dubey, 1987, 1997; Sibley et al., 2004).

Figura 1: A: Taquizoíto – Fotomicrografia eletrônica de taquizoíto de *T. gondii*. Referência: (www.columbia.edu/.../slide0061.html). B: Fotomicrografia de taquizoítos de *T. gondii*, em coloração Giemsa, obtidos de lavado peritoneal de camundongo inoculado com cepa RH de *T. gondii* (aumento de 1.000x).

BRADIZOÍTOS

O bradizoito é um taquizoíto que reduz sua velocidade de multiplicação (forma de multiplicação lenta) e encontra-se no interior do cisto que representam a forma de resistência do *T. gondii*. É uma fase evolutiva do ciclo iniciada independentemente do controle da infecção pelo sistema imune do hospedeiro. Esses cistos geralmente apresentam de 10 a 100 μm de diâmetro, cada um podendo conter até 1.000 bradizoítos (Huskinson-Mark et al., 1991). Geralmente são encontrados em células nervosas, cardíacas e musculares.

Figura 2: Bradizoíto – Fotomicrografia de bradizoíto de *T. gondii* em coloração Giemsa, obtidos de corte de fibra muscular humana. Referência: (www.iv.ufrj.br/.../sarcocystis.jpg) (aumento de 1.000x).

ESPOROZOÍTOS

São estágios morfológicamente semelhantes aos taquizoítos, porém apresentam micronemas, roptrias e grânulos de amilopectina mais abundantes e estão contidos em esporocistos no interior dos oocistos. Os oocistos não esporulados de *T. gondii* apresentam dimensões aproximadas de 12 μm x 10 μm , com formato aproximadamente esférico, cujas paredes são formadas por duas camadas incolores (Figura 3B). A esporulação ocorre no ambiente em torno de 1-5 dias após sua liberação nas fezes de felídeos infectados. Oocistos esporulados são subesféricos, medindo aproximadamente 13 μm x 11 μm e contêm dois esporocistos elipsóides, cada um medindo 8 μm x 6 μm , e cada esporocisto contém quatro esporozoítos (Dubey et al., 1998). Durante a fase aguda, um gato com infecção primária pelo parasito libera milhões de oocistos por um período de até 28 dias (Montoya & Liesenfeld, 2004).

OOCISTOS

O oocisto é arredondado e mede de 10 a 12 μ m de diâmetro. É a forma infectante altamente resistente produzida no intestino do gato após a singamia dos gametas. É excretado com as fezes (Figura 3). No meio externo após sofrer esporulação contém dois esporocistos cada qual contendo quatro esporozoítos (Dubey, 1997, Cimerman, 1999, Sibley et al., 2004).

Figura 3. A: Oocisto não esporulado; B: Oocisto esporulado contendo dois esporocistos, onde em um deles 4 esporozoítos de *T. gondii* podem ser vistos. (Dubey *et al.*, 1998).

1.3 HOSPEDEIROS E CICLO DE VIDA

O parasito pode infectar todas as espécies de animais de sangue quente, mamíferos e aves (Tenter et al., 2000), mas apenas os felídeos podem excretar oocistos, quando são infectados (Frenkel et al., 1970; Miller et al., 1972).

Hospedeiros definitivos: este parasito é específico de felinos que são considerados hospedeiros completos e representam os únicos hospedeiros definitivos conhecidos. O ciclo do parasito se completa no intestino delgado e termina com a

excreção de oocistos. Além do gato doméstico, outras 17 espécies de felídeos selvagens são descritas como hospedeiros definitivos (Dubey & Odening, 2001).

Hospedeiros intermediários: uma grande gama de animais domésticos, animais selvagens, aves e o homem são listados como hospedeiros intermediários (Amato Neto, 1995; Howe et al., 1997; Dubey et al., 1998; Sibley et al., 2004). Os roedores são altamente receptivos à infecção (Dubey et al., 1997) enquanto que entre os animais domésticos os eqüinos e bovinos são considerados poucos receptivos (Dubey, 2001). Nos hospedeiros intermediários o parasito está presente em líquidos somáticos, exceto em hemácias, com tropismo por células embrionárias e tecido nervoso (de Carli, 2001).

O *T. gondii* apresenta um ciclo heteroxênico (fase assexuada ou extra – intestinal e sexuada ou enteroepitelial). A fase sexuada ocorre no gato que é o hospedeiro definitivo, portador e excretor do oocisto (Dubey, 1987; Dubey et al., 1998; Cimerman, 1999; Black & Boothroyd, 2000). A fase assexuada ocorre nos hospedeiros intermediários (Figura 4).

Nos felídeos a contaminação ocorre por ingestão de oocistos contendo esporozoítos em material fecal ou por carnivorismo de cistos contendo bradizoítos. A seguir ocorre a digestão dos cistos ou oocisto e liberação dos bradizoítos ou esporozoítos. A partir de então se dá à penetração nas células epiteliais podendo seguir dois caminhos:

- 1- Reprodução assexuada ou extra-intestinal, por endodiogenia que resulta na formação de taquizoítos. Os enterócitos se degeneram e liberam os taquizoítos que penetrarão em novas células, que asseguram a difusão e manutenção da parasitose. Portanto, o gato se comporta nesta fase como hospedeiro intermediário.

2- Reprodução sexuada, as formas taquizoítos se transformam no interior dos enterócitos em gametócitos masculinos e femininos seguidos de fecundação e formação do oocisto imaturo que será eliminado para o exterior com as fezes. A eliminação geralmente ocorre em média de 10 a 12 dias após a ingestão de oocisto com esporozoítos e de três a sete dias após a ingestão de cistos com bradizoítos.

Os hospedeiros intermediários se contaminam a partir de oocistos esporulados ou por carnivorismo (cistos com bradizoítos) (Dubey, 1987, 1997, 1998). A fase de parasitemia dura de 8 a 10 dias. As formas esporozoítas ou bradizoítas livres se transformam em taquizoítos e passam para a circulação geral, invadindo mucosa intestinal e macrófagos. Segue-se uma fase mesenquimatosa (multiplicação por endodiogenia) e posterior fase parenquimatosa (bradizoítos no interior de cistos se multiplicando lentamente) (Black & Boothroyd, 2000).

Figura 4. Ciclo biológico do *T. gondii*.

Referência: www.icb.ufmg.br/biq/prodap/2000/toxo/ciclo.gif

1.4. CONTAMINAÇÃO HUMANA

A infecção humana pode ocorrer através de quatro formas:

- a) Ingestão de cistos presentes em carne crua ou mal cozida, especialmente de porco e carneiro. Este hábito alimentar é o principal responsável pela transmissão da infecção em países desenvolvidos, como a França (Baril et al., 1999; Rai et al., 1999). Vários relatos de literatura apontam surtos bem documentados onde em geral a fonte de contaminação é carne crua ou mal passada contendo cistos de *T. gondii* (Masur et al., 1978; Choi et al., 1997). O conteúdo dos cistos permanece viável mesmo após ter passado pelo estômago e intestino, porém é destruído pelo congelamento (-12°C) e descongelamento, aquecimento após 66° C e dessecação. Entretanto, pode permanecer viável por até 2 meses a 4°C no refrigerador. O processo de defumação de carnes não garante a destruição de cistos porventura presentes.
- b) Ingestão de oocistos contidos nas fezes de gatos, que contaminam água, solo, jardins, caixas de areia, lixo podem ser encontrados em vegetais mal lavados ou mesmo serem disseminados através de hospedeiros transportadores tais como baratas, moscas e minhocas (Ruiz & Frenkel, 1980). Existem relatos de surtos atingindo grande número de pessoas, comprometendo bairros, inclusive no Brasil. Nestes a fonte comum foi a água contaminada com oocistos (de Moura et al., 2006; Bowie et al., 1997). A ingestão de oocistos parece ser a forma de transmissão mais importante nos países subdesenvolvidos.
- c) transmissão vertical: transferência de taquizoítas da mãe para o feto através da placenta principalmente na fase aguda da infecção;

d) formas menos comuns de transmissão: Transfusão de sangue de doador infectado já foi descrita, uma vez que *T. gondii* pode sobreviver em sangue citratado estocado a 4°C por até 50 dias (Raisanen, 1978); transplante de órgãos de doadores infectados contendo cistos para receptores não imunes, principalmente transplante de coração (Gallino et al., 1996).

1.5. GENÓTIPOS DE *T. gondii*

T. gondii é haplóide, exceto durante a fase de reprodução sexuada que ocorre no interior das células intestinais de seus hospedeiros definitivos e contém cerca de 8×10^7 pares de nucleotídeos (Montoya & Liesenfeld, 2004). Apresenta uma estrutura populacional altamente clonal, compreendendo três genótipos designados como: tipo I, II e III, (Howe et al., 1995, 1997) que apresentam alta similaridade, mas que diferem geneticamente em uma taxa de aproximadamente 1% ou menos de seus genes. Genótipos recombinantes (atípicas ou exóticas) são ainda mais raros, representando menos de 5% dos genótipos até agora caracterizados (Su et al., 2003). Entretanto, estes genótipos diferem quanto à virulência em modelos animais e acometem diferentes espécies por todo o mundo.

Os três genótipos clonais de *T. gondii* diferem na virulência e nos padrões epidemiológicos de ocorrência. Genótipos do tipo I (RH) são altamente virulentos para camundongos e humanos, enquanto os Genótipos do tipo II (ME49 e seus derivados) são avirulentos. Os genótipos do tipo III (CEP e VEG) são considerados moderadamente virulentos (Howe et al., 1995, 1997). Em geral, os genótipos do tipo II são cistogênicos, enquanto os genótipos do tipo I têm uma capacidade bem

reduzida de formar cistos em cultura de células ou em animais infectados, sendo a formação de cistos específica ao genótipo e influenciada pela sua forma de propagação (Kim & Weiss, 2004; Saeij et al., 2005; Switaj et al., 2005).

Dos genótipos de pacientes infectados cronicamente, genótipos do tipo II são encontrados em pacientes norte-americanos, enquanto que genótipos do tipo I parecem ser mais freqüentes entre os pacientes brasileiros. Genótipos de pacientes com toxoplasmose congênita ou toxoplasmose ocular são do tipo I e genótipos do tipo III são predominantemente genótipos de animais (Montoya & Liesenfeld, 2004).

Em estudo recente de tipificação dos genótipos de *T. gondii* em pacientes imunocomprometidos (HIV positivos) observou-se uma alta prevalência do genótipo do tipo I (Khan et al., 2005). Mais recentemente, foi demonstrado que parece haver uma predominância (em torno de 94%) do genótipo de *T. gondii* do tipo I circulando tanto em humanos como em animais da América do Sul (Gallego et al., 2006). Estes resultados confirmam os achados anteriores de vários outros estudos em gatos (Dubey et al., 2004; Pena et al., 2006) e galinhas caipiras (Dubey et al., 2002; 2003a,b,c; 2005) da América do Sul, mostrando a predominância dos tipos I e III e ausência do tipo II, em contraste à grande predominância de genótipos do tipo II em países da América do Norte.

A rápida disseminação destes três genótipos de *T. gondii* tem sido atribuída à capacidade deste parasito ser transmitido diretamente de um hospedeiro intermediário para outro, tornando seu ciclo de reprodução sexuada não obrigatória para a sua transmissão. Esta característica o torna um parasito atípico entre os demais integrantes do filo Apicomplexa, os quais requerem o ciclo sexual para uma transmissão efetiva entre seus hospedeiros (Su et al., 2003).

1.6 PATOGENIA E INTERAÇÃO PARASITO - HOSPEDEIRO

Os principais fatores que interferem na patogênese de *T. gondii* em hospedeiros humanos e animais são o tamanho do inóculo, a virulência do genótipo do parasito, o “background” genético e sexo do hospedeiro, bem como seu estado imunológico (Roberts et al., 1995; Suzuki et al., 1996).

Uma vez o parasito tendo sido ingerido por via oral, invade ativamente as células epiteliais do intestino delgado de modo ativo, iniciando o ciclo de reprodução (Liesenfeld, 1999; Barragan & Sibley, 2002). Deste modo, o processo de invasão ativa da célula hospedeira é o principal evento da infecção pelos parasitos do filo Apicomplexa. Tal processo é muito semelhante entre todos os integrantes deste filo e envolve a participação de receptores específicos presentes na superfície da membrana da célula hospedeira e uma série de proteínas liberadas consecutivamente pelas roptrias, micronemas e grânulos densos do parasito (Buxton et al., 2002).

A invasão celular pode ser resumida em três etapas consecutivas, esquematizadas na figura 6 (Hegab & Al-Mutawa, 2003; Sibley, 2004; Keeley & Soldati, 2004):

- 1) A adesão inicial do parasito à célula hospedeira ocorre sem qualquer orientação especial e envolve antígenos imunodominantes da superfície do parasito. Após a adesão inicial, os parasitos reorientam-se de modo que a extremidade anterior se posiciona para a extrusão do conóide, seguida por invaginação da membrana da célula hospedeira para dar origem ao vacúolo parasitóforo (VP), onde várias proteínas dos parasitos são secretadas. Entre elas, as adesinas secretadas pelos micronemas são responsáveis pela espessa zona de adesão e formação da junção de movimento, que juntamente com o

citoesqueleto do parasito, força-o para o interior do vacúolo parasitóforo em formação. A membrana plasmática da célula hospedeira é também usada para formar a membrana do vacúolo parasitóforo, o qual não se funde com lisossomos, impedindo, portanto, a degradação intracelular do parasito.

2) Em seqüência, proteínas de roptrias são liberadas dentro do vacúolo parasitóforo, as quais estendem sua membrana para formar uma associação com organelas da célula hospedeira, de modo que mitocôndrias e retículo endoplasmático são posicionados adjacentes ao vacúolo parasitóforo.

3) Proteínas dos grânulos densos são secretadas e modificam a membrana do vacúolo parasitóforo, contribuindo para a remodelação e maturação intravacuolar metabolicamente ativa para a reprodução e desenvolvimento do parasito.

A penetração de *T. gondii* em suas células hospedeiras é um processo ativo, por meio de um complexo de adesão-movimentação, sendo um processo diferente da fagocitose, uma vez que ocorre a reorientação do parasito em direção à membrana da célula e rearranjo do citoesqueleto do mesmo. Após a penetração, o parasito é encontrado no interior do vacúolo parasitóforo, cuja membrana é lisa, formada por cerca de 20% de membrana fornecida pelo parasito durante a invasão e 80% de membrana da célula hospedeira. O vacúolo parasitóforo não funde com lisossomos da célula hospedeira e, portanto, não se torna um meio ácido, pois marcadores necessários para esta fusão são excluídos pelo parasito durante a invasão (Mordue et al., 1999).

No interior do vacúolo parasitóforo, os parasitos replicam sincronicamente, de forma assexuada, sendo encontrados agrupado uns aos outros, em números múltiplos de 2 (Hegab & Al-Mutawa, 2003).

Figura 5. Taquizoíto invadindo célula Hella (HC). Exocitose da roptria próximo ao citoesqueleto apical (AC). A membrana do vacúolo parasitóforo (PVM) derivada da membrana da célula hospedeira encontrada ao redor do parasita no momento da invasão. A barra de escala representa 0.5 μm . Referência: www.nature.com/.../n1/images/nrmicro1800-f2.jpg

1.7 RESPOSTA HUMORAL E CELULAR

Como parasito intracelular obrigatório, a resposta protetora é fundamentalmente mediada por células, mas a resposta imune humoral participa diretamente na neutralização e destruição de taquizoítos extracelulares e, assim, é capaz de auxiliar no controle da disseminação da infecção (Hegab & Al-Mutawa, 2003).

Anticorpos IgM são indicativos de infecção recente e não de re-infecção, podendo ser detectados logo nos primeiros 7 dias após a infecção, aumentando

gradualmente até atingir um pico cerca de 1-2 meses depois, diminuindo gradativamente até níveis não detectáveis por volta de 8 meses. Porém, em muitos casos, anticorpos IgM podem permanecer por muitos meses e, até anos, tornando problemático o diagnóstico da infecção primária por *T. gondii* baseado na detecção de IgM específica (Remington & Montoya, 2004).

Anticorpos IgA são produzidos durante o contato do parasito com a mucosa intestinal, quando linfócitos sensibilizados circulam pela lâmina própria do trato digestivo do hospedeiro. Esses anticorpos são produzidos apenas durante a fase aguda, circulantes no sangue por cerca de 8-9 meses após a infecção primária, não sendo observados durante a infecção pregressa, constituindo, portanto, um bom marcador imunológico de infecção recente. Níveis persistentes de anticorpos IgM na ausência de anticorpos IgA indica uma imunidade já estabelecida de uma infecção mais tardia, caracterizando um período de transição no perfil imunológico de resposta à infecção.

Apesar de ser secretado no colostro, anticorpos IgA não atravessam a barreira placentária, mas podem ser detectados em recém-nascidos, quando a infecção congênita ocorre no terceiro trimestre de gestação. Se a infecção congênita ocorre no primeiro trimestre de gestação, esta imunoglobulina estará ausente no sangue do recém-nascido (Hegab & Al-Mutawa, 2003).

Anticorpos IgG específicos aparecem dentro de 1 ou 2 semanas após a infecção, atingindo títulos máximos em aproximadamente 6 semanas, declinando gradualmente ou permanecendo com baixos títulos indefinidamente. Em infecções recentes, anticorpos IgG estão presentes, mas apresentam baixos índices de avidéz para os antígenos correspondentes. Com o transcorrer da infecção e a maturação da

resposta imune, estes anticorpos vão apresentando avidéz crescente de modo que nas infecções de longa duração encontra-se um predomínio marcante de anticorpos com alta avidéz (Camargo et al., 1991). Assim, enquanto anticorpos IgG específicos de baixa avidéz nem sempre identificam uma infecção recente, anticorpos de alta avidéz têm sido considerados úteis marcadores para excluir infecções primárias (Hegab & Al-Mutawa, 2003).

Além destas classes principais de anticorpos envolvidas na infecção por *T. gondii*, também são observados anticorpos IgE. Poucos estudos têm explorado a importância desta imunoglobulina na resposta humoral contra este parasito, principalmente no que se refere ao seu valor no diagnóstico e na determinação da fase da infecção (Ashburn et al., 1998). Porém na reativação de toxoplasmose anticorpos IgE mostram-se significativamente associados ao aparecimento de coriorretinite e encefalite toxoplásmica (Wong et al., 1993; Ashburn et al., 1998).

A imunidade mediada por células é o mais importante mecanismo na regulação da infecção por *T. gondii*, com a participação das células T CD4+ e T CD8+, macrófagos e células *natural killer* (NK). Durante a fase aguda da infecção, macrófagos e células dendríticas (CDs) produzem e secretam altos níveis de interleucina-12 (IL-12), em resposta a alguns antígenos e proteínas liberados por taquizoítos tal como a proteína ciclofilina-18 (C-18) ligante do receptor 5 de quimiocinas CC (CCR5). A IL-12 estimula as células NK a produzir e secretar altos níveis de interferon- γ (IFN- γ), induzindo a diferenciação de células T CD4+ na subpopulação Th1 produtora de IL-2 e IFN- γ , que são citocinas críticas para a sobrevivência do hospedeiro. Células T CD8+ também são ativadas pela secreção de IL-12 e contribuem significativamente para controlar a infecção aguda, uma vez que

produzem IFN- γ , levando à ativação de macrófagos. Células infectadas são destruídas por células T CD8+, liberando taquizoítos que ficam acessíveis a vários mecanismos imunológicos (anticorpos, complemento, macrófagos ativados e células NK). A formação de cistos depende primariamente de mecanismos imunes mediados por IFN- γ (Denker & Gazzinelli, 1998; Hegab & Al-Mutawa, 2003; Aliberti, 2005).

IFN- γ representa o principal mediador de resistência a *T. gondii* por meio da ativação de macrófagos, os quais inibem a replicação dos parasitos pela produção de intermediários reativos do oxigênio (ROI) e do nitrogênio (RNI), que promovem a inativação de enzimas fundamentais para o metabolismo do parasito (Aliberti, 2005).

Outra citocina importante na regulação da resposta imune celular é a IL-10, produzida por alguns tipos celulares em locais com alta carga parasitária, apresenta efeitos inibitórios sobre a atividade microbicida de macrófagos, sobre a diferenciação de clones Th1 de células T, sobre a produção de IFN- γ por células NK e linfócitos T e sobre a produção de IL-12 por células acessórias.

Alguns mecanismos podem ser usados pelo *T. gondii* para evadir da resposta imune do hospedeiro e garantir uma infecção bem sucedida, como: a prevenção da união do vacúolo parasitóforo com lisossomos da célula hospedeira e a invasão ativa de macrófagos (Hegab & Al-Mutawa, 2003). Muitos estudos têm sido conduzidos com o objetivo de decifrar outras vias de evasão imune desenvolvidas por *T. gondii*, tais como a secreção de fatores imunossupressores, que podem limitar a secreção de citocinas pró-inflamatórias, interferência nas vias de sinalização intracelular de células imunes e, mesmo, prevenir a apoptose de células infectadas (Montoya & Liesenfeld, 2004; Aliberti, 2005).

1.8 ANTÍGENOS DE *T. gondii*

Diferentes genótipos de *T. gondii* expressam diferentes antígenos, os quais afetam a extensão (número de órgãos afetados) e a gravidade da infecção. Estudos de polimorfismos de DNA entre diferentes genótipos de *T. gondii* resultaram na identificação de diferentes grupos de antígenos do parasito: antígenos comuns, que determinam a patogenicidade, antígenos específicos aos diferentes estágios do ciclo de vida, antígenos específicos ao tecido ou ao órgão parasitado, além de um grupo de antígenos correspondentes à infecção em pacientes com AIDS (Hegab & Al-Mutawa, 2003).

ANTÍGENOS DE EXCREÇÃO/SECREÇÃO DE *T. GONDII*

De modo geral os componentes secretórios de *T. gondii* são denominados antígenos secretado-excretado (ESA), sendo constituído por antígenos de superfície (SAG) e antígenos organela específicos (Hughes & Van Kanpen, 1981). O ESA destaca-se como importante marcador sorológico da toxoplasmose por representar 90% dos antígenos circulantes no soro logo após o início da infecção (Hughes & Van Kanpen, 1981). Entre os antígenos de superfície, a glicoproteína de 30 kDa (SAG1) juntamente com SAG2 (22kDa), p23, p35 e SAG3 (43kDa), representam o maior componente de superfície dos taquizoítos. SAG1 é o antígeno mais abundante e o principal alvo da resposta imune do hospedeiro (Kasper & Khan, 1983) sendo referida como o principal antígeno de superfície envolvido nos processos de invasão e juntamente a SAG3 no processo de adesão a célula hospedeira (Mineo et al., 1993).

SAG1 é uma proteína exclusiva das formas taquizoítas, de multiplicação

rápida, e uma potente ferramenta nos testes para diagnóstico de infecção recente (Acebes et al., 1994). No entanto, anticorpos anti-SAG1 são detectados tanto na fase pregressa quanto na fase aguda da toxoplasmose (Potasman et al., 1986; Decoster et al., 1988).

Em estudo recente em nosso laboratório, utilizando antígeno ESA obtido a partir de cultura de fibroblastos humanos, observamos reatividade dos anticorpos IgG anti-ESA nos grupos com infecção recente aguda, recente não aguda e crônicos. Porém, surpreendentemente, quando avaliamos a avidéz dos anticorpos IgG anti-ESA, observamos reatividade estágio específica, ou seja o grupo com infecção recente aguda apresentava baixa avidéz para P30, provavelmente SAG-1 e o grupo com infecção recente não-aguda e crônicos apresentavam alta avidéz frente a proteína P30 (Araujo, PRB & Ferreira AW, 2008).

Entre os antígenos organelas específicos estão as proteínas dos grânulos densos, GRA1 (22 - 27 kDa), GRA2 (28,5 kDa), GRA3 (30 kDa), GRA4 (40 kDa), GRA5 (21 kDa), GRA6 (32 kDa) e GRA7 (29 kDa), as roptrias representadas por ROP1 (60.5 kDa), ROP 2 (55 kDa), ROP 3 (59 kDa), ROP 4 (60 kDa), ROP 5 (59.5 kDa), ROP 6 (42 kDa), ROP 7 (57 - 60 kDa) e ROP 8 (200 kDa) e os micronemas representados por MIC 1 (60 kDa), MIC 2 (120 kDa) e MIC 3 (90 kDa). Proteínas organelas-específicas tais como, GRA1, GRA7 e ROP1 tem sido relatada em literatura como alvo da resposta humoral em pacientes com toxoplasmose aguda, associadas ou não a SAG-1.

Proteínas de baixo peso molecular variando entre 4-14 kDa presentes no ESA, têm sido consideradas como importantes marcadores de fase aguda da toxoplasmose, sendo reconhecidas com grande intensidade por anticorpos IgM e

fracamente por anticorpos IgG por immunoblot (Remington et al., 2004). No entanto, os anticorpos IgG podem reconhecer proteínas de 14kDa após 1 ano de infecção (Bessieres et al., 1992). Em trabalho anterior, nosso grupo observou reatividade de anticorpos IgG frente as proteínas de baixo peso molecular do ESA nas diversas fases da toxoplasmose (Araujo PRB & Ferreira, AW, 2008).

Figura 6 – Desenho esquemático das organelas de *T. gondii*. Este esquema modificado apresenta as principais organelas presentes em taquizoítos de *T. gondii* responsáveis pelos processos de ecreção/secreção de antígenos. **Fonte:** jcb.rupress.org/content/157/4/557/F2.small.gif

MÚLTIPLOS ANTÍGENOS PEPTÍDICOS (MAP)

O advento de técnicas para a obtenção de peptídeos sintéticos e a construção de MAP (antígenos peptídicos múltiplos), obtidos via biologia molecular tem se mostrado uma alternativa promissora para diminuir as limitações inerentes dos antígenos provenientes de formas taquizóitos utilizados nos testes sorológicos atuais, principalmente nos testes para a detecção de anticorpos IgM específicos.

A construção de MAPs representa um sistema com grande potencial. Os MAPs são peptídeos ramificados, sintetizados com um núcleo de polilisina, que substituem a proteína carreadora e cujos grupos amina são utilizados como pontos de partida para a síntese de cadeias peptídicas selecionadas, formando um composto macromolecular contendo diversas ramificações que podem conter múltiplos epítomos de células T e B selecionados de um ou mais antígenos (Tam., 1988). Entre as vantagens do MAPs, podemos citar: a imunogenicidade mesmo na ausência de proteína carreadora, devido ao seu tamanho relativamente grande e grande densidade de epítomos, possibilidade de definição de tamanho, número, relação e posição relativa dos epítomos de células B e T, o que auxilia na determinação da influência desses fatores na imunogenicidade e antigenicidade dos antígenos. Outra vantagem é que os MAPs podem ser utilizados como antígenos na análise das ligações antígeno/anticorpo em ensaios qualitativos e quantitativos.

No diagnóstico de doenças infecciosas, a natureza multimérica do MAP apresenta papel principal no aumento da reprodutibilidade, sensibilidade e especificidade quando comparados a antígenos de outra natureza utilizados nos testes ELISA (Tam and Zavala, 1989).

A combinação de diversos antígenos diminui o limite de detecção das concentrações de anticorpo, detectando principalmente ACs IgM de baixa afinidade (Tam, 1996).

Tam em 1996, demonstrou boa eficiência diagnóstica para doenças infecciosas com um aumento de $>10^8$ quando comparados aos antígenos peptídicos por ELISA.

Diversos peptídeos sintéticos têm sido produzidos a partir dos antígenos de superfície (SAG-1 e SAG-2), antígenos dos grânulos densos (GRA-1, GRA-2, GRA-4, GRA-6 e GRA-7) e antígenos das roptrias (ROP-1 e ROP-2). Entretanto a exata composição e combinação destes peptídeos sintéticos para a utilização em imunoenaios para o diagnóstico da toxoplasmose é ainda uma questão em aberto. Anticorpos IgG e IgM têm sido freqüentemente testados frente às diversas combinações de peptídeos sintéticos, com bons resultados, porém ainda não confirmatórios.

1.9 ASPECTOS CLÍNICOS

Clinicamente, a infecção por *T. gondii* pode ser assintomática ou apresentar alguns sinais e sintomas que variam enormemente, dependendo do estado imunológico do hospedeiro e do tipo da infecção.

TOXOPLASMOSE EM ADULTOS E CRIANÇAS IMUNOCOMPETENTES

A infecção primária por *T. gondii* em adultos e crianças imunocompetentes é assintomática na maioria dos pacientes, causando uma infecção auto-limitada e com

sintomas não específicos, que raramente demandam tratamento. A manifestação clínica mais típica neste grupo de pacientes é uma linfadenopatia cervical ou occipital discreta e isolada, na qual os linfonodos podem permanecer aumentados por, no máximo, 6 semanas. Em casos muito raros, já foram relatadas miocardite, polimiosite, pneumonia, hepatite ou encefalite em indivíduos imunocompetentes durante infecção primária (Remington et al., 2001).

TOXOPLASMOSE EM PACIENTES IMUNOCOMPROMETIDOS

Apesar de causar uma infecção assintomática na maioria dos indivíduos imunocompetentes, *T. gondii* pode causar doença grave, muitas vezes fatal, em indivíduos imunocomprometidos, como aqueles com AIDS ou em tratamento com drogas imunossupressoras. Nestes indivíduos, a toxoplasmose geralmente resulta da reativação de uma infecção pregressa e afeta preferencialmente o sistema nervoso central, levando ao quadro típico de encefalite toxoplásmica (Martino et al., 2000). As manifestações clínicas mais comuns são: confusão mental, déficits motores focais, distúrbios dos nervos cranianos, anormalidades sensoriais, sinais cerebelares, desordens dos movimentos e sinais neuropsiquiátricos. Os achados neurológicos mais típicos são hemiparesia e distúrbios da fala. Deve ser feito o diagnóstico diferencial das lesões da encefalite toxoplásmica com linfoma do sistema nervoso central, leucoencefalopatia multifocal progressiva, ventriculite e encefalite causadas por citomegalovírus, abscessos cerebrais bacterianos e lesões focais causadas por outros organismos, como *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* sp., *Mycobacterium tuberculosis* e *Nocardia* sp. A toxoplasmose em indivíduos imunocomprometidos também pode se apresentar com coriorretinite, pneumonia e envolvimento de

múltiplos órgãos (Porter & Sande, 1992; Luft et al., 1993; Montoya & Liesenfeld, 2004).

TOXOPLASMOSE CONGÊNITA

A toxoplasmose congênita raramente pode ser diagnosticada por meio de exames ultrassonográficos, mas alguns sinais sugestivos de infecção por *T. gondii* no feto visualizáveis pela ultra-sonografia são calcificações intracranianas, dilatação ventricular, aumento do fígado e aumento da espessura da placenta. As manifestações clínicas da toxoplasmose congênita variam de acordo com a fase da gestação em que ocorre a transmissão do parasito para o feto. Deste modo, as conseqüências mais comuns são: aborto espontâneo e morte fetal no interior do útero, ou nascimento de crianças com hidrocefalia, microcefalia, calcificações intracranianas, coriorretinite, estrabismo, cegueira, epilepsia, retardamento mental e motor, trombocitopenia e/ou anemia. Nenhum dos sinais descritos anteriormente em recém-nascidos com doença congênita é patognomônico para toxoplasmose, uma vez que pode ocorrer com infecções congênicas por outros patógenos, como o citomegalovírus, o vírus herpes simples, o vírus da rubéola e em casos de sífilis congênita (Swisher et al., 1994; Montoya & Liesenfeld, 2004; Kravetz & Federman, 2005).

TOXOPLASMOSE OCULAR

Coriorretinite toxoplásmica é um quadro comum na toxoplasmose adquirida ou na doença congênita, como resultado de uma infecção aguda ou reativação de

uma infecção pregressa. Os principais sinais de uma coriorretinite toxoplásmica são lesões focais brancas visíveis, com uma intensa reação inflamatória associada. Geralmente, manifestações de coriorretinite em adultos têm sido associadas a uma manifestação tardia ou à reativação de uma infecção congênita ocorrida, principalmente, no terceiro trimestre de gestação (Montoya & Remington, 1996; Burnett et al., 1998; Holland, 1999; Hegab & Al-Mutawa, 2003).

1.10 DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE

A toxoplasmose aguda em indivíduos imunocompetentes pode ser diagnosticada por métodos diretos, na prática, pouco usados como exame microscópico, isolamento do parasito, histopatologia e detecção do DNA de *T. gondii* e por métodos sorológicos, que demonstram a presença de anticorpos específicos no soro (IgG, IgM, IgA e IgE) dos pacientes. A sorologia é o método de escolha para o diagnóstico de infecção aguda, por oferecer as vantagens de um exame não invasivo e de realização rápida.

A necessidade de diagnosticar infecção aguda se dá principalmente em duas situações clínicas: a) quando o paciente é sintomático e há necessidade de confirmação diagnóstica, como é o caso da doença ocular, das linfadenopatias e de condições sistêmicas graves onde a toxoplasmose é levantada como possível causa (diagnóstico diferencial) e b) em gestantes, nas quais em geral a sorologia será a única fonte de informação a ser analisada para a tomada de decisões.

Na assistência pré-natal, a avaliação sorológica pode ser feita de forma sistemática ou aleatória. Em países desenvolvidos da Europa com alta prevalência da

infecção, como França, Áustria, Espanha, Bélgica, Itália e Portugal, as gestantes seguem um protocolo de triagem universal no início da gestação, sendo as soronegativas reavaliadas a cada mês ou trimestre, o que facilita o diagnóstico de soroconversão. Países onde a soroprevalência é baixa, como os Estados Unidos e países do norte europeu, não recomendam a triagem universal, justificando a medida pelo alto custo do seguimento sorológico das soro negativas e pequeno benefício devido ao baixo risco de soroconversão na gravidez. Nestes países, é comum a realização de uma avaliação sorológica em algum momento da gravidez, o que dificulta a tomada de decisões em casos diagnósticos duvidosos.

O Brasil, até o momento, não dispõe de uma política nacional unificada de triagem para toxoplasmose em gestantes ou recém-nascidos. Existem programas de abrangência estadual, como o do Paraná (mãe curitibana), Mato Grosso do Sul e Minas Gerais, e de algumas cidades isoladas.

A utilização de testes sorológicos para o diagnóstico de toxoplasmose depende do controle de qualidade de kits comerciais e dos laboratórios que executam estes testes e da acurácia e habilidade dos profissionais a cargo de interpretar os resultados de acordo com a circunstância clínica especificada (Remington et al., 2004).

Existem vários métodos sorológicos para o diagnóstico da toxoplasmose e cada um deles tem uma aplicabilidade diferenciada quanto ao tipo de anticorpo que detecta. Para avaliação de IgG, IgM, IgA e IgE os mais utilizados são ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), ISAGA (*Immunosorbent Agglutination Assay*), imunofluorescência indireta (IFI), hemaglutinação indireta (HAI), MEIA (*microparticle enzyme immunoassay*) e ELFA (*enzyme linked fluorescence assay*). O

teste de Sabin & Feldman se destina a avaliar principalmente anticorpos IgG, embora detecte também anticorpos IgM e IgA. Existem ainda dois testes que avaliam características qualitativas da IgG, que são o teste de avidéz e aglutinação diferencial, utilizados como ferramenta adicional para inferir o tempo decorrido do início da infecção.

O primeiro teste específico utilizado na detecção de anticorpos anti-*T. gondii* foi o teste do corante (*dye test*) ou reação de Sabin & Feldman, descrito por Albert Bruce Sabin e Harry Arthur Feldman em 1948. Trata-se de um teste de neutralização em que organismos vivos são lisados na presença do complemento e anticorpos (Sabin & Feldman, 1948). O teste mede a presença de anticorpos específicos totais, incluindo IgA e IgM, além da IgG. Ainda é o padrão ouro para diagnóstico de infecção toxoplásmica, contra o qual todos os outros testes deveriam ser comparados (Reiter- Owona et al., 1999; Pertersen et al., 2005). O soro a ser testado é diluído de forma seriada e incubado com taquizoítos vivos na presença de complemento (soro humano de doador soronegativo). O azul de metileno (corante vital) utilizado na reação é captado se o parasita estiver vivo, corando-o. O título (*end-point*) é estabelecido pela contagem do número de parasitas mortos (não corados) e vivos (corados) e o resultado reportado é a diluição na qual 50% ou mais dos parasitos estão lisados. Apresenta execução trabalhosa. Taquizoítas vivos são infectantes e demandam a existência de biotério. A leitura em microscópio é subjetiva e requer recursos humanos treinados. Sua padronização é difícil e o teste está disponível apenas em laboratórios de referência. Tem sido tradicionalmente utilizado para estimar o tempo de infecção, uma vez que aumenta por aproximadamente 8 semanas após o início da mesma. Uma mudança “significativa” dos títulos (pelo menos de

quatro vezes) em amostras pareadas coletadas com intervalo de 3 semanas auxilia no diagnóstico de infecção recente.

Por ser mais prática, a IFI substituiu a reação de Sabin-Feldman, permitindo a identificação de anticorpos IgG, IgM e demais classes de imunoglobulinas, em soros incubados sobre taquizoítas fixados em lâminas de microscopia. O parasita utilizado nesta reação é mantido íntegro, inativado pela fixação feita com formaldeído. Se o soro do paciente apresenta anticorpos específicos, estes serão identificados a partir da reação do antissoro contra imunoglobulina ligado à fluoresceína. O soro do paciente é incubado em diluições seriadas, os resultados expressos pela maior diluição reagente (título). Uma reação positiva é detectada pela fluorescência verde-amarela brilhante na periferia total do parasito ao microscópio. A Organização Mundial de Saúde padronizou soro referência, para anticorpos IgG anti-*T. gondii*, indispensável para corrigir diferenças entre resultados do teste de imunofluorescência, frequentemente observados entre laboratórios. Os testes IgM não são padronizados e podem apresentar resultados falso-positivo na presença de anticorpos anti-nucleares ou fator reumatóide (IgM anti-IgG). Resultados falso-negativos podem ocorrer devido ao bloqueio por anticorpos IgG específicos. O teste de IFI é mais seguro e econômico quando comparado ao DT, fornecendo resultados comparáveis. Entretanto, sua interpretação também é subjetiva.

O teste de Hemaglutinação Indireta (HAI) descrito originalmente por Jacobs & Lunde em 1957 com hemácias de carneiro recobertas por componentes do parasito, principalmente citoplasmáticos, apresentava baixa sensibilidade. Este teste não detectava IgM ou IgG de baixa avidéz, além de sofrer a interferência de anticorpos heterófilos com conseqüente resultado falso-positivo. Tais falhas foram

solucionadas ao se utilizarem hemácias de aves recobertas com antígenos completos do parasito aglutináveis por anticorpos IgG e IgM, tornando o teste altamente sensível. É considerado um teste prático de baixo custo, não exigindo equipamento sofisticado e um bom método para triagem da toxoplasmose. Ocasionalmente, observam-se resultados falsos-positivos por interferência de anticorpos IgM “naturais”, aglutininas IgM não-específicas, em geral de títulos baixos. Distingue-se de reações específicas por permanecer com títulos inalterados, enquanto aquelas se elevam em poucos dias na fase aguda da toxoplasmose (Camargo et al., 1977).

Atualmente, as técnicas imunoenzimáticas para detecção de anticorpos são utilizadas na maioria dos laboratórios, por apresentarem alta sensibilidade e especificidade, baixo custo, técnica simples, versátil e de leitura objetiva. São disponíveis em *Kit* comerciais. Extratos ou frações antigênicas do *Toxoplasma* adsorvidos em placas de microtitulação ou microesferas são incubados com soros suspeitos, e, em seguida, incubados com conjugados enzimáticos antiglobulina G, M, A ou E. Após colocação do substrato enzimático, haverá aparecimento de cor nos casos positivos, vista a olho nu ou medida através de espectrofotometria. É importante lembrar que não há correspondência entre resultados de testes imunoenzimáticos realizados por diferentes metodologias. Na avaliação longitudinal o ideal é analisar no mesmo momento as diferentes amostras coletadas com intervalo de tempo mínimo de 2 a 3 semanas (amostras pareadas).

A técnica ISAGA é utilizada para detecção de anticorpos IgM, IgA e IgE. Esta técnica apresenta maior sensibilidade e especificidade quando comparada à aglutinação direta e ELISA captura. Não requer a utilização de conjugado enzimático e a leitura é fácil, semelhante ao teste de aglutinação direta. Não apresenta resultados

falso-positivos relacionados à presença de fator reumatóide e/ou fator anti-nuclear e é mais sensível e específico que a IFI e ELISA para IgM. Muito utilizado para o diagnóstico de infecção congênita. Em geral é disponível apenas em laboratórios de referência.

Do ponto de vista prático, a avaliação sorológica da toxoplasmose aguda começa com a dosagem de anticorpos IgG e IgM, os quais apresentam uma cinética específica que deve ser conhecida. Existem várias técnicas para detecção destes anticorpos, que foram desenvolvidas e aprimoradas ao longo das décadas, algumas inclusive já abandonadas. Várias podem ser encontradas comercialmente e totalmente automatizadas, como os testes ELISA.

Anticorpos IgM são os primeiros a aparecerem, aproximadamente 14 dias após a infecção primária por *T. gondii*, declinando a níveis indetectáveis meses a anos depois (Dunn et al., 1999; Gras et al., 2004).

As técnicas utilizadas para detecção de IgM devem merecer atenção especial na análise dos resultados encontrados. Enquanto o teste de IFI apresenta baixa sensibilidade e alta especificidade, levando a resultados falso-negativos, os testes imunoenzimáticos disponíveis comercialmente apresentam grande variabilidade. Avaliando seis testes comerciais para detecção de anticorpos IgM contra *T. gondii* em uso nos Estados Unidos, Wilson et al., (1997) encontraram especificidade entre 77-99% quando comparados ao ELISA de referência, ressaltando um percentual importante de resultados falso-positivos. A persistência da IgM por longos períodos de tempo é um outro ponto problemático (Bobic et al., 1991). Estudando uma coorte de 446 mulheres que soroconverteram durante a gravidez, Gras et al., (2004) mostraram que anticorpos IgM permaneceram positivos por mais de 10 e 12 meses

em média, quando utilizou-se a IFI e ISAGA respectivamente. Kodym et al., (2007) encontraram anticorpos IgM positivo por ELISA em 21,4% de amostras coletadas mais de 3 anos após o início de sintomas de toxoplasmose aguda. A persistência prolongada de anticorpos IgM é cada dia mais comum, à medida em que se utilizam testes laboratoriais de alta sensibilidade.

Desta forma, resultados IgM positivos em uma única amostra não confirmam infecção aguda na gestação, principalmente se levarmos em conta que uma série de medidas diagnósticas e terapêuticas deverão ser instituídas a partir deste diagnóstico. Por outro lado, um resultado negativo para anticorpos IgM em gestante com títulos baixos de IgG praticamente afasta a possibilidade de soroconversão na gravidez, especialmente se obtida no primeiro trimestre.

Nos Estados Unidos, o FDA (*Food and Drug Administration*) recomenda que os testes ELISA-IgM sejam utilizados como triagem e confirmados, em laboratório de referência.

Os anticorpos IgG são detectados uma a três semanas após o início da infecção, depois do aparecimento de anticorpos IgM, atingindo pico em 6 a 8 semanas, dependendo da técnica sorológica utilizada. Permanecem com títulos elevados por vários meses e persistem detectáveis por toda a vida. São muito utilizados na triagem de infecção passada (Remington *et al*, 2004).

Os anticorpos IgA são detectáveis em cerca de 80% dos casos de infecção aguda e são utilizados como um dos marcadores de infecção recente em vários centros de referência para o diagnóstico de toxoplasmose (Liesenfeld et al., 2001; Roberts et al., 2001). Podem permanecer positivos por meses ou até por mais de 1 ano (Stepick- Biek, 1990).

Os anticorpos IgE aparecem nas primeiras semanas de infecção, e juntamente com a IgA compõe o painel de testes em laboratórios de referência (Roberts *et al.*, 2001).

Sua vantagem em estudos com a técnica ISAGA foram o aumento precoce dos títulos simultaneamente dos anticorpos IgA e IgM e o desaparecimento destes anticorpos em torno dos quatro meses (Gron *et al.*, 1992).

Os anticorpos da classe IgA e IgE são mais utilizados em conjunto com outros testes, compondo um painel sorológico. Assim ajudam a configurar um perfil agudo ou crônico e são aplicados na análise de casos suspeitos de infecção aguda (Wong *et al.*, 1993; Montoya, 2002). Contudo, alguns autores pontuam que estes anticorpos não acrescentam informações adicionais devido às limitações ligadas à sensibilidade dos testes, ao rápido desaparecimento do soro (anticorpos IgE em torno de 4 meses), a persistência além de 12 meses (Foudrinier *et al.*, 1995; Ashburn *et al.*, 1998) e grande variação individual (Derouin *et al.*, 1987; Candolfi *et al.*, 2007) no caso de anticorpos IgA. Ambos são raramente disponíveis para o diagnóstico sorológico de gestantes na prática clínica pública ou privada no Brasil.

Vale a pena ressaltar que testes sorológicos diferentes geralmente medem anticorpos diferentes, os quais mostram um padrão único de ascensão e queda de seus títulos em relação ao início da infecção. Este conhecimento deve ser dominado tanto por médicos quanto pelos laboratórios para que possam juntos buscar solução em casos duvidosos.

A técnica ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) é um teste automatizado no sistema VIDAS da Bio-Mérieux usada para detecção de anticorpos da classe IgG e IgM anti *T. gondii*. O princípio da reação associa o método

imunoenzimático com uma detecção final em fluorescência. Os anticorpos da classe IgM são pesquisados por imunocaptura. As imunoglobulinas IgM antitoxoplasma são detectadas especificamente graças a um imunocomplexo marcado com fosfatase alcalina. Este método quando comparado com o método ISAGA apresentou sensibilidade de 93,5%, especificidade de 99,3% e concordância de 98,9% (Camargo et al., 1991). Falso-positivos são encontrados, porém com baixa frequência (Araujo & Ferreira, 2008).

A técnica MEIA (Microparticle Enzyme Immunoassay) é usada para a determinação quantitativa de anticorpos da classe IgG e IgM antitoxoplasmano soro ou plasma humano. A reação é realizada no analisador de imunoensaio, com acesso randômico e contínuo, AXSYM da Abbott. As amostras usadas para pesquisa dos anticorpos da classe IgM são tratadas com tampão de neutralização do Fator Reumatóide (FR), para remover os anticorpos de interferência (se presentes) do complexo antígeno-anticorpo, a fim de se evitar resultados falsamente positivos. Ao final da reação, o complexo imune ligado ao conjugado marcado com a fosfatase alcalina reage com o substrato 4-Metil Umbeliferil Fosfato (MUP). A fosfatase alcalina cataliza a hidrólise do MUP a MU (Metil Umbeliferil). A quantidade de fluorescência é proporcional à concentração de anticorpos da amostra analisada (Camargo et al., 1991). Falso-positivos para anticorpos IgG e falso-positivos para anticorpos IgM são observados na prática laboratorial com baixa frequência (Araujo & Ferreira et al., 2008).

Hedman et al. (1989) aplicaram em toxoplasmose o conceito, utilizado até então para doenças virais, de que ocorre maturação na afinidade de ligação entre antígeno e anticorpo da classe IgG (avidez) de acordo com a evolução temporal da

resposta imune. Eles mostraram que havia diferença significativa na avidéz dos anticorpos IgG em soros coletados nos primeiros 3-4 meses de infecção quando comparados àqueles com 1 ano ou mais, sugerindo que o teste pode ser útil em discriminar infecção recente daquela ocorrida no passado distante. Durante a infecção aguda os anticorpos IgG se ligam de forma fraca ao antígeno e à medida que o processo “matura” por semanas ou meses, a avidéz da ligação antígeno-anticorpo (Ag-Ac) aumenta, como decorrência da seleção clonal dirigida pelos linfócitos B. Quanto maior a afinidade, mais forte a ligação Ag-Ac, mais tempo transcorrido desde o início da infecção.

Reagentes que desnaturam proteínas, incluindo uréia, são utilizados para dissociar o complexo Ag-Ac. A dissociação da ligação do complexo Ag-Ac por meio de uma solução contendo uréia 6M é medida através do ELISA para detecção de anticorpos IgG modificado. O soro do paciente é incubado na placa. Esta é lavada com solução de uréia e em seguida prossegue-se a reação pela incubação com o conjugado enzimático. O resultado é expresso como percentual de anticorpos que resistem à eluição pela uréia e é dado através do cálculo: (título após uréia / título original) x 100.

Em toxoplasmose, resultados mostrando alta avidéz de anticorpos IgG geralmente indicam que a infecção ocorreu antes de três a cinco meses. O teste está particularmente indicado no primeiro trimestre da gestação em mulheres com anticorpos IgM positivo. Nesta idade gestacional, um resultado mostrando anticorpos IgG de alta avidéz nos permite afastar infecção aguda recente (Cozon et al., 1998), com chances praticamente nulas de transmissão fetal. Testes em uso na Europa estendem esta possibilidade até o quarto mês de gestação.

Relatando a experiência de um laboratório americano de referência em diagnóstico de toxoplasmose, Liesenfeld et al. (2001) avaliou o uso do teste de avidéz de anticorpos IgG em casos sugestivos ou equívocos com relação à infecção aguda. Demonstraram que 55.9% dos pacientes com resultado positivo ou indeterminado no ELISA para detecção e anticorpos IgM apresentaram alta avidéz de anticorpos IgG e que a utilização deste teste pode diminuir significativamente o número de testes adicionais, acompanhamento sorológico, tratamento medicamentoso ou propedêuticas fetais invasivas, tais como a análise da cadeia de reação em cadeia de polimerase (PCR) no líquido amniótico.

Inicialmente, o teste de avidéz de anticorpos IgG foi proposto para diagnosticar infecção recente por *T. gondii* (Lappalainen et al., 1993). Estudos posteriores demonstraram que anticorpos de baixa avidéz podem persistir por vários meses após a infecção aguda e, portanto, não seriam fidedignos para o diagnóstico de infecção aguda (Pelloux et al., 1998; Cozon et al., 1998). Por outro lado, parece haver um consenso de que resultados de alta avidéz, obtidos no primeiro trimestre do pré-natal, afastam a possibilidade de infecção aguda adquirida na gravidez (Petersen et al., 2005). O que ocorre é que a maioria dos estudos confronta os resultados de avidéz de anticorpos IgG obtidos em apenas dois grupos de pacientes com tempo de infecção muito distantes. O grupo de pacientes com infecção aguda em geral é bem documentado, constituindo-se de pacientes que soroconverteram ou apresentaram sintomas, com menos de 3-5 meses de duração. O grupo com infecção antiga, em contrapartida, é constituído de pacientes com tempo de infecção bastante variável, mais de 6 meses até anos. É evidente a falta de dados sobre o comportamento da

avidez de anticorpos IgG no intervalo de tempo entre a fase aguda e pregressa da infecção, por alguns chamada de convalescente.

Alguns questionamentos ainda são levantados com relação à utilização sistemática do teste de avidez no auxílio do diagnóstico de infecção aguda na gravidez (Lefevre-Pettazzoni et al., 2006): a maturação da resposta de anticorpos IgG é variável de indivíduo para indivíduo, os índices não estão padronizados entre laboratórios e não se conhece muito acerca de sua variabilidade, reprodutibilidade e curva ao longo do tempo. A definição de pontos de corte para baixa e alta avidez também é variável entre os laboratórios e o tratamento antimicrobiano pode influenciar a maturação, atrasando-a (Petersen et al., 2001). Nos Estados Unidos, ao contrário da Europa, os testes comerciais ainda não estão disponíveis fora do centro de referência de Palo Alto, Califórnia, permanecendo sem a liberação do FDA.

Outro teste disponível apenas em laboratórios de referência, produzido *in house*, é o teste de aglutinação diferencial (AD-IgG) para anticorpos IgG anti-*T. gondii*. Baseia-se no fato de que uma alteração química provocada na membrana do taquizoíta produz um padrão único de aglutinação quando este é fixado por formalina ou acetona (Suzuki *et al.*, 1988). O teste AD-IgG compara títulos de anticorpos obtidos com taquizoítas de *T. gondii* fixados pela formalina com aqueles obtidos com taquizoítas fixados com acetona. Altos títulos de anticorpos no preparado com acetona estão relacionados com infecção aguda recente enquanto altos títulos encontrados quando o parasito é fixado pela formalina estão associados com infecção passada. Dannemman et al. (1990) demonstraram que o teste AD-IgG é útil na confirmação da toxoplasmose aguda em pacientes com anticorpos IgM e IgG positivos. Num grupo de 33 pacientes com toxoplasmose aguda (19 grávidas que

oroconverteram na gravidez e 14 pacientes com linfadenopatia toxoplásmica), os autores mostraram que o teste ADIgG identificou corretamente todas as 19 grávidas e 12 dos 14 pacientes com adenopatia. Por outro lado, um padrão AD-IgG de infecção aguda foi encontrado em 5 de 8 pacientes avaliados após 14-21 meses do episódio inicial de adenopatia e 2 de 14 indivíduos que se infectaram há mais de 2 anos. Resultados semelhantes foram encontrados por Suzuki et al. (2001), onde 97% de 31 pacientes com infecção aguda recente apresentaram padrão AD-IgG compatível com infecção aguda. Contudo, o mesmo padrão de infecção recente também foi detectado em 45% de 33 pacientes com infecção latente, deixando claro a limitação do teste em confirmar infecção aguda, de forma semelhante ao que acontece com a adividez de anticorpos IgG. Também não resolve todas as pendências diagnósticas como ferramenta única na confirmação da infecção aguda recente.

Na maioria dos estudos publicados, as avaliações de testes diagnósticos são baseadas em comparações com métodos de referência, como exemplificado no levantamento feito por Liesenfeld et al. (1997) acerca de testes ELISA-IgM. Entretanto, o real motivo para a realização de testes sorológicos em toxoplasmose é inferir sobre o tempo de infecção, em outras palavras, definir se o paciente está ou não na fase aguda da infecção. Acontece que vários estudos evitam incluir pacientes que se encontram em fase intermediária entre infecção aguda e latente, justamente os que trazem maiores dúvidas diagnósticas (Kodym et al., 2006). Roberts et al. (2001), por exemplo, não incluíram os soros convalescentes (entre 3 e 12 meses) enquanto Suzuki et al. (2001) compararam os resultados obtidos com soros de fase aguda (1-3 meses) e latente (13-38 meses). Holec-Gasior et al. (2009), por outro lado, analisaram a reatividade a proteínas recombinantes de *T. gondii*, GRA3 e ROP1, em

dois grupos de pacientes, classificados com base critérios sorológicos como agudo (presença de IgM ELISA, IgM/IgA ISAGA e baixa avidéz de anticorpos IgG) e crônico (anticorpos IgM negativo e alta avidéz de anticorpos IgG).

A reação de Western blot tem mostrado que o soro materno e o da criança reconhecem diferentes antígenos do *T. gondii*, quando a criança está congenitamente infectada (Magi & Miglioli, 2011). Hofflin & Remington em 1998 já tinham reconhecido antígenos diferentes por anticorpos das classes IgG e IgM pela mãe e filho congenitamente infectado. Anticorpos das classes IgM e IgA podem ser identificados contra a principal proteína de superfície do *T. gondii*, a proteína P30, pela técnica de Western blot. Além de auxiliar no diagnóstico da toxoplasmose congênita o teste de western blot também auxilia no diagnóstico da toxoplasmose cerebral dos pacientes com AIDS (42). No paciente com HIV e encefalite, o uso dessa reação mostra diversidade antigênica entre diferentes cepas do *T. gondii*.

A partir de 2008, foi padronizado na França por Franck J, Garin YJ, Dumon H. o teste de western blot LDBio-Toxo II IgG test, que utiliza antígenos de processo secretório e excretor do toxoplasma para auxílio do diagnóstico da toxoplasmose em pacientes imunossuprimidos, gestantes e neonatos. Mais tarde em 2010, Maudty e cols aplicaram o western blot LDBio-Toxo II IgG test em imunodeficientes e gestantes e não encontrou boa sensibilidade, com grande número de seguimentos sorológicos desnecessários.

2 JUSTIFICATIVA

A discriminação entre infecção ativa e pregressa é especialmente importante em doenças como a toxoplasmose, onde a infecção é comum na população, podendo levar ao desenvolvimento de patologia importante em indivíduos imunocomprometidos e gestantes.

Apesar da variedade de testes automatizados disponíveis atualmente com alta sensibilidade e especificidade, uma sorologia positiva em amostra isolada, sem uma demonstração de soroconversão, representa um problema para o clínico, uma vez que a detecção de anticorpos IgM por longo período após a infecção tem se mostrado freqüente com a utilização de técnicas de grande sensibilidade.

Dentro deste contexto, mesmo com a associação do teste de avidéz para anticorpos IgG na elucidação destes casos, existem infecções agudas com resultados negativos para anticorpos IgM associados a anticorpos IgG de baixa avidéz, assim como, infecções agudas com anticorpos IgM positivo associado a anticorpos IgG de alta avidéz.

Recentes avanços têm sido feitos na utilização dos antígenos excretados e secretados (ESA) por formas taquizoítas de *T. gondii* no diagnóstico da toxoplasmose. Em nosso laboratório avaliamos a avidéz dos anticorpos IgG anti-SAG-1 do ESA por Western blotting como marcador de toxoplasmose recente aguda, obtendo resultados promissores (Araújo, PRB & Ferreira, AW). A partir desses resultados, associamos as frações protéicas do ESA– GRA-1 e GRA-7, principais alvos da resposta imune em pacientes com toxoplasmose recente aguda (Kato et al., 2006; Beguetto et al., 2007 e Souza et al., 2009) a SAG-1 na forma de MAPs (antígenos peptídicos múltiplos), para a padronização de um teste imunoenzimático

para detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA, que apresente uma melhor eficiência diagnóstica comparada aos testes atualmente utilizados no diagnóstico da toxoplasmose humana.

3 OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficiência diagnóstica do teste imunoenzimático (ELISA) com antígenos sintéticos excretados e secretados de *T. gondii* associados na forma de múltiplos antígenos peptídicos no diagnóstico da toxoplasmose adquirida.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar as frações protéicas do ESA de *T. gondii* – GRA-1, GRA-7 e SAG-1, obtidas em cultura de fibroblastos humanos.
- Associar as frações protéicas do ESA de *T. gondii* – GRA-1, GRA-7 e SAG-1 na forma de diferentes antígenos peptídicos múltiplos (MAPs) e padronizar o teste imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos IgG-, IgM- e IgA-
- Comparar o desempenho diagnóstico dos MAPs com testes manuais de imunofluorescência e hemaglutinação indireta e sistema automatizado (Sistema ELFA-VIDAS) no diagnóstico da toxoplasmose.

4.0 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. CASUÍSTICA

300 amostras de soros provenientes da soroteca do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, foram analisadas por método automatizado (ELFA-VIDAS) e métodos sorológicos manuais (Imunofluorescência indireta (IFI) e Hemaglutinação indireta (HAI) (bioMérieux-Brasil) para detecção de anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii* e avides de anticorpos IgG específicos. Para compor os diferentes grupos de estudo, as amostras de soros foram selecionadas como descrito por Ferreira & Camargo, 2002; baseados em dados clínicos, sorológicos e epidemiológicos. Cinco grupos foram selecionados:

GRUPO I (Toxoplasmose recente “aguda”) – 25 amostras de soros de pacientes apresentando dados clínicos e sorológicos compatíveis com toxoplasmose “recente aguda”. Este grupo apresentou anticorpos IgM específicos com títulos $\geq 1/64$, anticorpos IgG com títulos $\leq 1/128$ nos métodos manuais e baixa avides de anticorpos IgG anti-*T. gondii*. Positividade de anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii* foram obtidos no teste comercial automatizado.

GRUPO II (Toxoplasmose recente “não aguda”) – 25 amostras de soro de pacientes sem dados clínicos e perfil sorológico compatível com toxoplasmose “recente não aguda”. Este grupo apresentou anticorpos IgM específicos com títulos $\leq 1/64$, anticorpos IgG com títulos $\geq 1/128$ nos métodos manuais e alta avides de

anticorpos IgG anti-*T. gondii*. Positividade de anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii* foram obtidos no teste comercial automatizado.

GRUPO III (Toxoplasmose pregressa ou pregressa)– 100 amostras de soro de indivíduos sem dados clínicos e perfil sorológico compatível com toxoplasmose pregressa. Este grupo apresentou anticorpos IgG de alta avidéz e com títulos $\geq 1/128$ nos métodos manuais e positividade no teste de ELISA comercial. Resultados negativos para anticorpos IgM anti-*T. gondii* foram observados nos métodos automatizados e testes manuais.

GRUPO IV– 100 amostras de soro de indivíduos clinicamente saudáveis sem dados atuais e prévios sugestivos de toxoplasmose. Resultados negativos para anticorpos IgG e IgM específicos foram observados nos métodos manuais e testes automatizados. 20 amostras pertencentes a este grupo foram analisadas quanto aos interferentes: lipemia, hemólise e fator reumatóide.

GRUPO V – 50 amostras de soro de pacientes com infecções não relacionadas, com diagnóstico clínico-laboratorial para mononucleose ($n=10$), citomegalia ($n=10$), rubéola ($n=05$), malária ($n=10$), e Doença de Chagas ($n=15$). Este grupo foi utilizado para avaliação de reatividade cruzada e não apresenta sorologia positiva para toxoplasmose.

4.2 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para análise de projetos de pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e pela Comissão de Ética de Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMT/SP).

As amostras biológicas utilizadas estavam estocadas no Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do IMT/USP e foram originalmente colhidas no contexto de pesquisa afins. No anexo 1, pode ser consultado o termo de consentimento livre e esclarecido utilizado durante o período de seleção dos pacientes e indivíduos sadios que participaram do estudo.

Todos os aspectos éticos da utilização do material estocado foram cuidadosamente respeitados, ou seja, assegurou-se o anonimato dos indivíduos envolvidos, sendo todas as informações utilizadas apenas para o propósito da pesquisa e o material conservado e utilizado eticamente garantindo sua rigorosa preservação.

4.3. MANUTENÇÃO DA CEPA RH DE *T. gondii*

T. gondii, cepa RH foi mantida em camundongos BALB/c por inoculação intraperitoneal de 0,2ml de exsudato peritoneal de animais previamente infectados. Após um intervalo de 48 horas, os exsudatos foram colhidos através de lavagens com 5ml de solução salina tamponada com fosfatos 0,01M pH 7,2 (PBS) estéril, e a seguir, inoculados na mesma quantidade, em novos camundongos.

4.4. CULTURA DE FIBROBLASTOS HUMANOS (FH)

Fibroblastos humanos foram cultivados a 37°C com CO₂ a 5% em meio de cultura RPMI com 10% de soro fetal bovino. Antes da inoculação os fibroblastos foram lavados com PBS estéril por seis vezes para eliminar resíduos de soro fetal bovino.

4.5. OBTENÇÃO DO ANTÍGENO ESA DE *T. gondii*

Os taquizoítos foram inoculados em cultura de fibroblastos humanos (1×10^8 taquizoítos/ml) por 3 horas a 37° C. Logo em seguida, o sobrenadante da cultura foi coletado e centrifugado a 2000 rpm por 15 minutos. Após centrifugação o sobrenadante foi filtrado em membrana 0,22µm estéril (Millipore Corporation, Bedford, MA), acoplada à seringa. Após adição de inibidor de protease, aprotinina (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) na concentração de 10mM, o antígeno ESA foi estocado a -70°C até a realização dos testes.

4.6. DOSAGEM PROTÉICA DO ANTÍGENO ESA DE *T. gondii*

A concentração protéica do antígeno ESA de *T. gondii*, foi determinada por método de Lowry (1951), utilizando-se como padrão de referência a albumina bovina fração V (BIO-RAD DC Protein Assay, França).

4.7. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

Para análise eletroforética das proteínas presentes nas preparações de ESA, foi utilizado o método descrito por Laemmli (1970). O gel de separação foi utilizado na concentração de 18% e o gel de empilhamento a 3% em uma voltagem de 240V e corrente constante de 20mA, por 2 horas. As amostras aplicadas consistiram de preparações obtidas em dias diferentes, diluídas em tampão de amostra sem agentes redutores, na proporção de 1:1. Marcador de baixo peso molecular (Full Range Rainbow™, Amersham Life Sciences, UK) foi utilizado como curva de referência da corrida eletroforética. As proteínas foram transferidas do gel SDS para membrana de polyvinylidene difluoride (PVDF Immobilon, Millipore, E.U.A.).

4.8. SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS SAG-1, GRA-1 E GRA-7 DE *T. gondii*

Os peptídeos SAG-1, GRA-1 e GRA-7 foram sintetizados a partir de membrana de PVDF obtidos após eletroforese do ESA *T. gondii* como descrito anteriormente. Em sintetizador multiplex (Proteína Tecnologia, Tucson, Arizona) iniciou-se o processo de síntese dos peptídeos a partir da resina Tentagel (Rapp Polímeros GmbH, Tübingen, Alemanha). Durante a síntese foi adicionado o grupo Fmoc para proteção dos peptídeos. Após finalização da síntese, o grupo FMOC foi removido e os peptídeos clivados da resina através de sintetizador semi-automático (Figura 7).

Os peptídeos obtidos foram caracterizados por cromatografia líquida de alto desempenho e espectrômetro de massa. A sequência peptídica escolhida para SAG-1

é baseada em Kato et al 2007; GRA-1 baseado em Beghetto et al 2001 e GRA-7 baseado em Sousa et al 2009 (Tabela 2).

Figura 7. Demonstração do método de síntese direta para a construção dos MAPs estudados.

Tabela 1 . Relação das seqüências dos peptídeos derivados do ESA de *T. gondii*.

Fração protéica	Posição encontrada na molécula	Seqüência de aminoácidos
SAG-1	(238-256)	CNEKSFKDILPKLTENPWQ
GRA-1	(220-236)	LEQEVPESGEDGEDDARQ
GRA-7	(170-193)	EEVIDTMKSMQRDED

4.9. MAP: COMBINAÇÃO DOS PEPTÍDEOS SAG-1, GRA-1 E GRA-7 DE *T. GONDII*

Após a síntese dos peptídeos SAG-1, GRA-1 e GRA-7 conforme descrito anteriormente os peptídeos foram precipitados após adição de metil *t*-butil e associados à lisina. Após completa associação dos peptídeos, o suporte de resina foi clivado e os peptídeos associados à PAN-B 220. Após centrifugação, o “pellet” foi lavado três vezes com metil *t*-butil e liofilizado “overnight” a vácuo. A pureza dos peptídeos foi checada por cromatografia líquida de alto desempenho e estocada a 4°C até utilização. A estrutura esquemática da composição dos diferentes MAPs está demonstrada na Figura 8.

Figura 8. Estrutura dos dendrímeros (MAP) derivados da combinação dos peptídeos (SAG-1, GRA-1 e GRA-7) de *T. gondii* ligados ao core de polilisina.

4.10 PADRONIZAÇÃO DO TESTE IMUNOENZIMÁTICO ELISA

4.11.1 ESTUDO DA DILUIÇÃO DOS SOROS E CONCENTRAÇÃO DE ANTÍGENOS

A diluição ideal de soro a ser usada para a detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA foi estudada frente a diferentes concentrações de antígeno peptídico SAG-1, GRA-1 e GRA-7 na forma isolada e associados como múltiplos antígenos peptídicos (MAP).

4.11.2 ANTÍGENOS PEPTÍDICOS

PEPTÍDEOS SAG-1, GRA-1 E GRA-7 ISOLADOS E ASSOCIADOS COMO MAP: Para a padronização do teste imunoenzimático com antígenos peptídicos foram estudadas diferentes concentrações dos peptídeos variando de 1µg a 10µg/ml. Para a sensibilização das placas de ELISA foram testadas incubações a 37°C e a temperatura ambiente. O bloqueio da reação foi realizado com Leite desnatado a 5% em PBS-T 0,05% e testadas incubações a 37°C e a temperatura ambiente. Os testes foram realizados utilizando-se 3 soros de pacientes com toxoplasmose recente aguda (grupo I) e 3 pacientes saudáveis (grupo IV), diluídos a 1/20, 1/50, 1/100, 1/200 em Leite desnatado a 5% em PBS-T 0,01%.

4.11.3 FASE SÓLIDA

Placas de poliestireno de fundo plano (Nunc- Immuno Module Maxisorp DENMARK) foram sensibilizadas com 100µl/cavidade da concentração adequada de cada antígeno, diluído em tampão carbobato/bicarbonato 0,06M pH 9,6. A sensibilização foi feita por 18 horas (“overnigh”) a 4°C. A solução antigênica foi descartada por inversão das placas e 200µl da solução bloqueadora (Leite desnatado 5%, PBS-T 0,05%,) foram adicionados em cada poço, seguindo-se nova incubação de 30 minutos a 37°C. Foram então realizadas três lavagens com tampão PBS-T20 0,05%, seguidas de duas lavagens com água mili-Q. Após, as placas foram incubadas por 4 horas em estufa a 37°C até secar e acondicionadas individualmente em papel alumínio, seladas e mantidas a 4°C até o momento do uso. A solução bloqueadora e o diluente de soros utilizados para os testes realizados com as placas sensibilizadas com os antígenos estudados foram determinados baseando-se em estudos anteriores realizados em nosso laboratório para outros sistemas ELISA.

TESTE IMUNOENZIMÁTICO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IGG, IGM E IGA ESPECÍFICO PARA SAG-1, GRA-1 E GRA-7 (ISOLADOS)

Microplacas (Immuno Plate MAxisorp: Nunc) sensibilizadas com 10µg/ml dos peptídeos isolados como descrito na fase sólida e para ancorar os peptídeos à microplaca utilizou-se PAN-B (B220) (Dynal, Oslo, Norway). Após sensibilização, a microplaca foi lavada três vezes com PBS/0.25% Tween 20 (PBS-T) e bloqueada com 200µl de 5% de leite desnatado em PBS-T (solução de bloqueio) por 2 horas a

37°C. As microplacas foram lavadas como descrito anteriormente e adicionados 100µl das amostras dos 5 grupos estudados. Para a determinação de anticorpos IgG, o soro foi diluído a 1:100 em solução de bloqueio. Para a determinação de anticorpos IgM e IgA, os soros foram diluídos a 1:50 em solução de bloqueio. As microplacas foram incubadas por 1 hora e trinta minutos a 37°C e lavadas como descrito anteriormente. Após lavagem, foram adicionados 100µl de conjugado anti-IgG ou -IgM ou -IgA humano marcado com peroxidase (Sigma Chemical Co. St Louis Missouri) diluído a 1:1000 e incubado por 1 hora a a 37°C. Após incubação e lavagens foram adicionados 100 µl de substrato (TMB) por 20 minutos a temperatura ambiente, isento de luz. A seguir, foram adicionados 100µl de H₂SO₄ 4N e realizado leitura (Reader 230S-Anthos) a um comprimento de onda de 490nm. Todos os soros foram analisados em duplicata.

TESTE IMUNOENZIMÁTICO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IGG, IGM E IGA ESPECÍFICO PARA MAP1,2,3 E 4.

Microplacas (Immuno Plate MAxisorp: Nunc) sensibilizadas com 5µg/ml dos MAPs como descrito na fase sólida e para ancorar os MAPs à microplaca foi utilizado PAN-B (B220) (Dynal, Oslo, Norway). Após sensibilização, a microplaca foi lavada três vezes com PBS/0.25% Tween 20 (PBS-T) e bloqueada com 200µl de 5% de leite desnatado em PBS-T (solução de bloqueio) por 1 hora a 37°C. As microplacas foram lavadas, como descrito anteriormente e adicionados 100µl das amostras dos cinco grupos estudados. Para a determinação de anticorpos IgG anti-MAP1, -MAP2, -MAP-3 ou -MAP4, o soro foi diluído a 1:200 em solução de

bloqueio. Para a determinação de anticorpos IgM e IgA anti-MAP1, -MAP2, -MAP-3 ou -MAP4, os soros foram diluídos a 1:100 em solução de bloqueio. As microplacas foram incubadas por 1 hora a 37°C e lavadas como descrito anteriormente. Após lavagem, foram adicionados conjugado anti-IgG ou -IgM ou -IgA marcado com peroxidase (Sigma Chemical Co. St Louis Missouri) diluído a 1:1000 e incubado por 1 hora a 37°C. Após incubação e lavagens foram adicionados 100 µl de substrato (TMB) por 20 minutos a temperatura ambiente, isento de luz. A seguir, foram adicionados 100µl de H₂SO₄ 4N e realizado leitura (Reader 230S-Anthos) a um comprimento de onda de 490nm. Todos os soros foram analisados em duplicata.

4.11.4 DETERMINAÇÃO DO LIMAR DE REATIVIDADE

A determinação do limiar de reatividade (“cut-off”) da reação foi realizada, aplicando-se o ELISA padronizado em 20 amostras de soro de indivíduos sadios (grupo IV) e 20 amostras de pacientes com outras doenças não relacionadas (grupo V) diluídas a 1/100 e 1/50 para detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA respectivamente (antígenos peptídicos isolados) e diluídas a 1/200 e 1/100 para detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA respectivamente (MAPs) em diluente de soro adequado.

Inicialmente foram analisadas, para a escolha do limiar de reatividade ideal, as densidades ópticas médias dos soros de indivíduos clinicamente sadios acrescidos de dois desvios padrões (DP), para cada um os antígenos isolados e para cada MAP estudado. Para uma melhor definição deste valor limiar, foi feita uma segunda

avaliação, através do uso de curvas ROC (“Receiver Operating Characteristic”) usando “software” Win Episcopo 2.0.

CURVA ROC

Os diferentes pontos (“cut-off”) onde se discriminam os doentes dos não doentes (sadios), resultarão necessariamente em diversas sensibilidades e especificidades de um teste. A curva ROC estuda o ponto de corte ideal onde se obtêm o melhor valor de sensibilidade e de especificidade de um teste. Se projetarmos um gráfico, onde o eixo das ordenadas representa a sensibilidade (taxa de verdadeiros positivos) dos diversos pontos de corte analisados e, o eixo das abscissas a taxa de falsos positivos (1-especificidade), para estes mesmos pontos de corte obterá uma curva ROC.

Portanto a curva ROC demonstra graficamente a relação entre o índice de verdadeiros positivos e o índice de falsos positivos, onde o critério de decisão varia entre 0 e 100%. Esta medida parte do cálculo da área sob a curva. Um valor mínimo de 0,5 determina que o teste não tem o poder de discriminar verdadeiros positivos e falsos positivos. O valor máximo atingindo por uma curva ROC é de 1,0, neste caso o teste possui uma capacidade preditiva considerada perfeita. A interpretação da área sob a curva ROC foi realizada segundo a tabela abaixo:

Tabela 2 - Interpretação da área sob a curva

ÁREA SOB A CURVA	INTERPRETAÇÃO
>0,9	DESEMPENHO EXCELENTE
0,8-0,9	DESEMPENHO BOM
0,7-0,8	DESEMPENHO RAZOÁVEL
<0,7	DESEMPENHO RUIM

4.11.5 REPRODUTIBILIDADE

Foi avaliada a reprodutibilidade intratestes, através da repetição (20 vezes) de cinco amostras pertencentes ao grupo IV. A variação da reprodutibilidade foi medida pelo desvio padrão e coeficiente de variação encontrados nas determinações para anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* (Ferreira & Ávila, 2001).

4.11.6 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE

Para o estudo da sensibilidade e especificidade dos diferentes MAPs obtidos e utilizando os peptídeos isoladamente para a detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA na toxoplasmose humana foram utilizadas as fórmulas segundo Ferreira & Ávila, 2001.

4.11.7 ÍNDICE KAPPA

Foi calculado índice kappa para verificar a concordância entre todos os pares de testes laboratoriais utilizados neste estudo (IFI, HAI, ELFA, teste de avidéz e

ELISA com peptídeos isolados e associados como MAPs). Foi utilizado programa estatístico – Win Episcopo 2.0 para calcular a concordância e o índice kappa (K).

Tabela 3. A interpretação dos valores escolhida foi a de Pereira (1995)

Valores de kappa	Concordância
Kappa <0.00	Ausente
Kappa 0.00-0.20	Ruim
Kappa 0.21-0.40	Fraca
Kappa 0.41-0.60	Regular
Kappa 0.61-0.80	Boa
Kappa 0.81-0.99	Ótima
Kappa 1.00	Perfeita

4.11.8 EFICIÊNCIA DIAGNÓSTICA

A eficiência do teste sorológico foi calculada nas 300 amostras pertencentes aos grupos I, II, III, IV e IV utilizando fórmula segundo Ferreira & Ávila (2001). Foi determinada a eficiência diagnóstica do teste ELISA para detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA específicos para os peptídeos isoladamente e associados como MAPs.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A correlações entre os níveis de anticorpos IgG, IgM e IgA específicos aos diferentes MAPs estudados e os peptídeos na forma isolada foram analisados pelo teste de correlação de Spearman. A análise estatística foi realizada por meio da utilização do programa computacional GraphPad Prism versão 3.0 (GraphPad Software, Inc.). As porcentagens de soropositividade encontradas nos diferentes

ensaios foram comparadas pelo teste X^2 expressas em intervalos de confiança (IC) de 95%) ou se necessário, de Fisher. Para todos os testes, os valores de $p < 0.05$ foram considerados como estatisticamente significativos.

6 RESULTADOS

6.1 Determinação do conteúdo protéico do antígeno ESA de *T. gondii*

Partindo do cultivo “*in vitro*” de *Toxoplasma gondii* em fibroblastos humanos foram obtidos 10 diferentes lotes de antígeno como descrito no item 4.6 da metodologia. O conteúdo protéico foi determinado pelo reagente comercial “Bio Rad Dc Protein Assay Reagent”. Os resultados são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Concentração protéica e volume final obtido para os 10 lotes de antígenos ESA de *T. gondii*.

Extrato antigênico	Concentração protéica (µg/ml)	Volume obtido (ml)
Lote 1	1.924	2,0
Lote 2	1.987	2,1
Lote 3	1.996	2,0
Lote 4	1.934	2,0
Lote 5	1.966	2,0
Lote 6	1.999	2,0
Lote 7	1.915	2,0
Lote 8	1.975	2,2
Lote 9	1.999	2,0
Lote 10	1.991	2,0

Pelos dados da tabela 4 , observamos que os 10 diferentes lotes de antígeno de ESA de *T. gondii* apresentaram um rendimento semelhante ao considerarmos o volume final obtido e a concentração protéica.

6.2. Perfis de proteínas dos diferentes lotes de antígenos por SDS-PAGE

Ao avaliarmos o perfil de proteínas por SDS-PAGE, verificamos que todos os lotes apresentaram perfis de proteínas semelhantes mesmo apresentando concentrações protéicas diferentes, conforme demonstrado na tabela 4.

Observamos na Figura 8 que nos diferentes lotes de ESA de *T. gondii* estão presentes as proteínas de interesse com massa molecular estimada em 24, 29 e 30kDa. O padrão homogêneo, observado através das frações protéicas reveladas, assegura a boa reprodutibilidade dos lotes avaliados.

Figura 9. Eletroforese de gel em poliacrilamida (SDS-PAGE a 18%) em condições não redutoras das frações representativas dos 10 lotes produzidos do ESA de *T. gondii*. Pistas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 correspondem aos diferentes lotes obtidos. PM - Padrão de baixo peso molecular em KiloDaltons (kDa).

6.3 Antígenos peptídicos associados como múltiplos antígenos peptícos

As frações protéicas SAG-1 (30kDa), GRA-1 (24kDa) e GRA-7 (29kDa) obtidas após eletroforese em gel SDS-PAGE, conforme demonstrado no item 4.8 foram transferidas para membrana de PVDF e enviados para síntese dos peptídeos e associação como MAP (Byosin, Lewisville, Texas).

A construção dos diferentes MAPs foi analisada por espectrometria de massa (MALDI-TOF), com acurácia de 0.03% e sensibilidade de 1 micro. TOF ou espectrometria por tempo de voo, tem como princípio a medida do tempo que um íon leva para viajar da fonte de íons até o detector, ou seja a separação é realizada de acordo com a velocidade da amostra analisada. A largura do pico gerado pelo tempo de voo é média em FWHM (Full width at half Maximum) e neste caso específico expressa em KDa. A análise das construções de MAP1, MAP2, MAP3 e MAP4 demonstrou alta pureza das construções, com ausência de picos não relacionados. O tamanho dos picos foi proporcional à sequência dos peptídeos utilizados. Análises demonstradas na figura 9.

Figura 10. Análise por espectrometria de massa (MALDI-TOF) das construções de MAP a partir dos peptídeos SAG-1 (30kDa), GRA-1(24kDa) e GRA-7(29kDa). Δm corresponde a acurácia da leitura.

6.4. Padronização do ELISA frente aos diferentes MAPs e peptídeos isolados (SAG-1, GRA-1 e GRA-7).

6.4.1 Diluição do soro, conjugado e concentração dos antígenos peptídicos

Nas tabelas 5 e 6 mostramos os resultados da padronização do ELISA para pesquisa de anticorpos IgG; IgM e IgA anti-ESA de *T. gondii* usando 3 soros do grupo I e 3 soros do grupo IV. Pelos resultados apresentados na tabela 5, escolhemos a diluição dos soros a 1/100 para pesquisa de anticorpos IgG e 1/50 para pesquisa de anticorpos IgM e IgA específicos para os peptídeos isolados (SAG-1, ou GRA-1 ou GRA-7). A pesquisa de anticorpos anti-MAP1, 2, 3 ou 4 foi avaliada com diluições dos soros a 1/50, 1/100 e 1/200, sendo que os melhores resultados foram obtidos com a diluição a 1/200 para detecção de anticorpos IgG anti-MAP e 1/100 para detecção de anticorpos IgM e IgA (Tabela 6). A diluição dos conjugados anti-IgG, IgM e IgA a 1/1000, bem como a determinação da concentração ideal de MAP (5µg/ml) e peptídeos isolados (10µg/ml) foi estabelecida a partir de titulação em bloco.

Tabela 5. Média das densidades ópticas obtidas durante a padronização do teste ELISA para detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA frente aos antígenos isolados.

Classe de anticorpo	Soros	Média dos resultados do teste ELISA (D.O.)- Antígenos isolados								
		1/50			1/100			1/200		
		Máx	Med	Min	Máx	Med	Min	Máx	Med	Min
IgG	Pos	3,999	2,980	2,667	2,911	1,990	1,703	1,822	1,532	1,110
	Neg	0,112	0,101	0,098	0,097	0,090	0,086	0,085	0,080	0,072
IgM	Pos	1,588	1,320	1,211	1,110	0,997	0,890	0,743	0,710	0,699
	Neg	0,092	0,090	0,081	0,081	0,076	0,071	0,076	0,070	0,068
IgA	Pos	1,101	0,943	0,877	0,995	0,897	0,801	0,632	0,601	0,598
	Neg	0,075	0,070	0,062	0,064	0,060	0,052	0,059	0,060	0,048

Tabela 6. Média das densidades ópticas obtidas durante a padronização do teste ELISA para detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA frente aos diferentes MAPs.

Classe de anticorpo	Soros	Média dos resultados do teste ELISA (D.O.)- MAPs								
		1/50			1/100			1/200		
		Máx	Med	Min	Máx	Med	Min	Máx	Med	Min
IgG	Pos	3,999	3,999	3,999	3,999	3,999	3,999	2,999	2,944	2,901
	Neg	0,117	0,101	0,104	0,119	0,108	1,105	0,092	0,090	0,081
IgM	Pos	1,588	1,320	1,211	1,644	1,421	1,400	1,666	1,501	1,498
	Neg	0,092	0,090	0,081	0,075	0,070	0,062	0,076	0,070	0,068
IgA	Pos	1,101	0,943	0,877	1,201	1,200	1,198	1,176	1,112	1,096
	Neg	0,075	0,070	0,062	0,061	0,058	0,049	0,060	0,056	0,050

MAP1 (SAG-1, GRA-1 e GRA-7), MAP2 (SAG-1 e GRA-1), MAP3 (SAG-1 e GRA-7) e MAP4 (GRA-1 e GRA-7)

6.4.2 Determinação do limiar de reatividade

Para a determinação do limiar de reatividade, foram utilizadas 20 amostras de soro de soros de indivíduos sadios (grupo IV) e 20 amostras de soro de pacientes com outras doenças não relacionadas (grupo V). Na figura 9 e 10 apresentamos as densidades ópticas das amostras de soros desses indivíduos sadios e com outras doenças, com os diferentes antígenos.

Figura 11. Determinação do limiar de reatividade. A barra horizontal pontilhada representa o cut-off do teste ELISA para a detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA com os diferentes antígenos peptídicos associados na forma de MAPs. MAP1 (SAG-1, GRA-1 e GRA-7), MAP2 (SAG-1 e GRA-1), MAP3 (SAG-1 e GRA-7) e MAP4 (GRA-1 e GRA-7)

Figura 12. Determinação do limiar de reatividade. A barra horizontal pontilhada representa o cut-off para a detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA por ELISA com os diferentes antígenos peptídicos associados na forma de MAPs.

Pra uma definição mais precisa do limiar de reatividade, foram construídas curvas ROC (apêndice) considerando os pontos de corte estabelecidos com um e dois desvios padrões e o intervalo entre eles, procurando um valor que possibilitasse um aumento na especificidade do teste sem perda significativa da sensibilidade.

6.4.3 Análise de interferentes

Foram analisadas 20 amostras caracterizadas como negativas para toxoplasmose por métodos sorológicos, epidemiológicos e dados clínicos, que apresentavam lipemia, hemólise e fator reumatóide positivo. Não foi observada reatividade para anticorpos IgG, IgM e IgA frente aos MAPs 1,2 e 3 em amostras lipêmicas, hemolisadas e com presença de fator reumatóide. Amostras com fator reumatóide apresentaram reatividade para anticorpos IgM e IgA específicos para MAP4 e frente aos peptídeos GRA-1 e GRA-7 isoladamente. Resultados na tabela 6.

Tabela 7. Resultados qualitativos dos testes para análise de interferentes em amostras negativas para toxoplasmose na detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA frente aos diferentes MAPs estudados.

Interferentes	MAP1	MAP2	MAP3	MAP4
Lipemia	Ausência de reatividade (IgG, IgM e IgA)	Ausência de reatividade (IgG, IgM e IgA)	Ausência de reatividade (IgG, IgM e IgA)	Ausência de reatividade (IgG, IgM e IgA)
Hemólise	Ausência de reatividade (IgG, IgM e IgA)	Ausência de reatividade (IgG, IgM e IgA)	Ausência de reatividade (IgG, IgM e IgA)	Ausência de reatividade (IgG, IgM e IgA)
Fator reumatóide	Ausência de reatividade (IgG, IgM e IgA)	Ausência de reatividade (IgG, IgM e IgA)	Ausência de reatividade (IgG, IgM e IgA)	Presença de reatividade (IgM e IgA)*

*Reatividade baixa (IR=1,2) observada para anticorpos IgM- e IgA- em amostras negativas frente ao MAP4.

IR= índice de reatividade. MAP1 (SAG-1, GRA-1 e GRA-7), MAP2 (SAG-1 e GRA-1), MAP3 (SAG-1 e GRA-7) e MAP4 (GRA-1 e GRA-7)

6.4.4 Reação cruzada

A avaliação da presença de reatividade cruzada no teste de ELISA com os diferentes antígenos peptídicos foi determinada a partir de 50 amostras de soro de indivíduos com sorologia negativa para toxoplasmose e positiva para outras doenças não relacionadas. Não foi observada reatividade para anticorpos IgG, IgM e IgA aos MAPs estudados (MAP-1, MAP-2, MAP-3 e MAP-4) e frente aos peptídeos na forma isolada (SAG-1 ou GRA-1 ou GRA-7). Resultados na tabela 7.

Tabela 8. Resultados qualitativos dos testes para análise de reação cruzada em amostras negativas para toxoplasmose e positivas para outras doenças na detecção de anticorpos IgG-,IgM- e IgA- frente aos diferentes MAPs estudados.

Grupo V	MAP1	MAP2	MAP3	MAP4
Citomegalia	Ausência de reatividade	Ausência de reatividade	Ausência de reatividade	Ausência de reatividade
	(IgG, IgM e IgA)	(IgG, IgM e IgA)	(IgG, IgM e IgA)	(IgG, IgM e IgA)
Rubéola	Ausência de reatividade	Ausência de reatividade	Ausência de reatividade	Ausência de reatividade
	(IgG, IgM e IgA)	(IgG, IgM e IgA)	(IgG, IgM e IgA)	(IgG, IgM e IgA)
Mononucleose	Ausência de reatividade	Ausência de reatividade	Ausência de reatividade	Ausência de reatividade
	(IgG, IgM e IgA)	(IgG, IgM e IgA)	(IgG, IgM e IgA)	(IgG, IgM e IgA)
Malária	Ausência de reatividade	Ausência de reatividade	Ausência de reatividade	Ausência de reatividade
	(IgG, IgM e IgA)	(IgG, IgM e IgA)	(IgG, IgM e IgA)	(IgG, IgM e IgA)
Chagas	Ausência de reatividade	Ausência de reatividade	Ausência de reatividade	Ausência de reatividade
	(IgG, IgM e IgA)	(IgG, IgM e IgA)	(IgG, IgM e IgA)	(IgG, IgM e IgA)

MAP1 (SAG-1, GRA-1 e GRA-7), MAP2 (SAG-1 e GRA-1), MAP3 (SAG-1 e GRA-7) e MAP4 (GRA-1 e GRA-7)

6.4.5 Reprodutibilidade intra-teste

O coeficiente de variação para a detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA por ELISA específicos para os peptídeos isolados e para os diferentes MAPs estudados em amostras do grupo IV apresentaram índices menores que 8,0% e 0,0016 para coeficiente de variação e desvio padrão, respectivamente.

6.4.6 Sensibilidade e Especificidade

A tabela 8 mostra a sensibilidade e especificidade encontrada nos teste de ELISA para detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA frente aos peptídeos isolados e associados como MAP, nos grupos I,II e III. Dentre os peptídeos isolados SAG-1 apresentou melhor sensibilidade e especificidade quando comparado a GRA-1 e GRA-7 nos grupos com toxoplasmose recente aguda, recente não aguda e pregressa. Para os antígenos associados na forma de MAP, MAP1 apresentou melhor sensibilidade e especificidade, enquanto MAP4, que não apresenta SAG-1, apresentou baixa sensibilidade. MAP1 alcançou a melhor performance quanto ao discernimento entre as diferentes fases da toxoplasmose, não sendo observado a detecção de anticorpos IgM residuais e/ou falso-positivos.

Tabela 9. Sensibilidade e especificidade de anticorpos IgG específicos para os peptídeos SAG-1, GRA-1 e GRA-7 isolados e combinados como MAP-1, MAP-2, MAP-3 e MAP-4 para o diagnóstico da toxoplasmose humana.

Anticorpos	Grupo I	Grupo II	Grupo III
IgG para:	Sensibilidade %	Sensibilidade %	Sensibilidade %
SAG-1	88 (22/25)	84 (21/25)	98 (98/100)
GRA-1	76 (19/25)	68 (17/25)	97 (97/100)
GRA-7	84 (21/25)	76 (19/25)	94 (94/100)
MAP-1	100 (25/25)	100 (25/25)	100 (100/100)
MAP-2	48 (12/25)	56 (14/25)	60 (60/100)
MAP-3	32 (8/25)	36 (9/25)	28 (28/100)
MAP-4	8 (2/25)	8 (2/25)	20 (20/100)
IgG para:	Grupo IV	Grupo V	
	Especificidade %	Especificidade %	
SAG-1	100 (0/100)	100 (0/100)	
GRA-1	100 (0/100)	100 (0/100)	
GRA-7	100 (0/100)	100 (0/100)	
MAP-1	100 (0/100)	100 (0/100)	
MAP-2	100 (0/100)	100 (0/100)	
MAP-3	100 (0/100)	100 (0/100)	
MAP-4	100 (0/100)	100 (0/100)	

MAP1 (SAG-1, GRA-1 e GRA-7), MAP2 (SAG-1 e GRA-1), MAP3 (SAG-1 e GRA-7) e MAP4 (GRA-1 e GRA-7). Padrão ouro: Perfil sorológico descrito por Ferreira & Camargo, 2002. Grupo I- toxoplasmose recente aguda, grupo II- toxoplasmose recente não aguda e grupo III- toxoplasmose pregressa.

Obs: A especificidade da detecção de anticorpos IgG nos grupos I, II e III não pode ser calculada uma vez que nestes grupos todas as amostras são reagentes para anticorpos IgG e a especificidade mensura os verdadeiros negativos.

Tabela 10. Sensibilidade e especificidade de anticorpos IgM específicos para os peptídeos SAG-1, GRA-1 e GRA-7 isolados e combinados como MAP-1, MAP-2, MAP-3 e MAP-4 para o diagnóstico da toxoplasmose humana.

Anticorpos	Grupo I	Grupo II	Grupo III
IgM para:	Sensibilidade %	Sensibilidade %	Sensibilidade %
SAG-1	88 (22/25)	84 (4/25)	90 (10/100)
GRA-1	52 (13/25)	76 (6/25)	86 (14/100)
GRA-7	88 (2/25)	56 (11/25)	78 (22/100)
MAP-1	100 (25/25)	100 (0/25)	100 (0/100)
MAP-2	2 (8/25)	48 (13/25)	65 (35/100)
MAP-3	20 (5/25)	36 (16/25)	62 (38/100)
MAP-4	4 (1/25)	8 (23/25)	56 (44/100)
Anticorpos	Grupo I	Grupo II	Grupo III
IgM para:	Especificidade %	Especificidade %	Especificidade %
SAG-1	-	90 (2/25)	100 (0/100)
GRA-1	-	56 (11/25)	100 (0/100)
GRA-7	-	48 (13/25)	100 (0/100)
MAP-1	-	100 (0/25)	100 (0/100)
MAP-2	-	76 (6/25)	100 (0/100)
MAP-3	-	75 (7/25)	100 (0/100)
MAP-4	-	55 (12/25)	100 (0/100)

MAP1 (SAG-1, GRA-1 e GRA-7), MAP2 (SAG-1 e GRA-1), MAP3 (SAG-1 e GRA-7) e MAP4 (GRA-1 e GRA-7). Padrão ouro: Perfil sorológico descrito por Ferreira & Camargo, 2002. Grupo I- toxoplasmose recente aguda, grupo II- toxoplasmose recente não aguda e grupo III- toxoplasmose pregressa.

Obs: A especificidade da detecção de anticorpos IgM no grupo I não pode ser calculada uma vez que neste grupo todas as amostras são reagentes para anticorpos IgM e a especificidade mensura os verdadeiros negativos.

Tabela 11. Sensibilidade e especificidade de anticorpos IgA específicos para os peptídeos SAG-1, GRA-1 e GRA-7 isolados e combinados como MAP-1, MAP-2, MAP-3 e MAP-4 para o diagnóstico da toxoplasmose humana.

Anticorpos	Grupo I	Grupo II	Grupo III
IgA para:	Sensibilidade %	Sensibilidade %	Sensibilidade %
SAG-1	84 (21/25)	56 (11/25)	78 (22/100)
GRA-1	82 (19/25)	48 (12/25)	63 (37/100)
GRA-7	82 (19/25)	45 (14/25)	46 (54/100)
MAP-1	96 (24/25)	87 (4/25)	99 (1/100)
MAP-2	12 (3/25)	62 (10/25)	72 (28/100)
MAP-3	4 (1/25)	44 (14/25)	70 (30/100)
MAP-4	0 (0/25)	36 (16/25)	73 (27/100)
IgA para:	Especificidade %	Especificidade %	Sensibilidade %
SAG-1	-	84 (21/25)	98 (98/100)
GRA-1	-	68 (17/25)	97 (97/100)
GRA-7	-	76 (19/25)	94 (94/100)
MAP-1	-	100 (25/25)	100 (100/100)
MAP-2	-	56 (14/25)	60 (60/100)
MAP-3	-	36 (9/25)	28 (28/100)
MAP-4	-	8 (2/25)	20 (20/100)

MAP1 (SAG-1, GRA-1 e GRA-7), MAP2 (SAG-1 e GRA-1), MAP3 (SAG-1 e GRA-7) e MAP4 (GRA-1 e GRA-7).
Padrão ouro: Perfil sorológico descrito por Ferreira & Camargo, 2002.

Grupo I- toxoplasmose recente aguda, grupo II- toxoplasmose recente não aguda e grupo III- toxoplasmose progressa.

Obs: A especificidade da detecção de anticorpos IgA no grupo I não pode ser calculada uma vez que neste grupo todas as amostras são reagentes para anticorpos IgA e a especificidade mensura os verdadeiros negativos.

6.4.7 Correlação e Índice Kappa

Dentre os diversos antígenos peptídicos estudados, MAP1 apresentou melhor desempenho e por isso foi utilizado para avaliação da correlação e índice Kappa com perfil sorológico segundo In: Ferreira & Ávila, 2001. A análise da correlação entre as técnicas de MAP1-IgG e VIDAS-IgG nos grupos I, II e III, apresentou r maior que 0,9, indicando uma correlação positiva excelente entre as técnicas (Figura 13). A correlação entre as técnicas de MAP1-IgM e o perfil sorológico de Camargo, 2001 nos grupos I, II e III, apresentou $r=0,8$, indicando boa correlação entre as técnicas nos grupos I e II e $r=0,7$ no grupo III, indicando razoável correlação entre as técnicas para detecção de anticorpos IgM (Figura 14). Devido a ausência de teste automatizado para a detecção de anticorpos IgA anti-*T. gondii*, a correlação entre a técnica de MAP1-IgA foi analisada frente a associação do teste VIDAS-IgM com o teste de avidéz para anticorpos IgG anti-*T. gondii*-VIDAS (Figura 15). A correlação obtida para anticorpos IgA no grupo I foi de $r=0,7$, indicando boa correlação, entretanto nos grupos II e II foi observada correlação regular, $r=0,4$ e $r=0,5$, respectivamente.

Figura 13. Correlação e índice kappa entre a detecção de anticorpos IgG anti-MAP1 com o teste automatizado VIDAS-IgG nos grupos I,II e III.

Figura 14. Correlação e índice kappa entre a detecção de anticorpos IgM anti-MAP1 com o perfil sorológico segundo Camargo In: Ferreira & Ávila, 2001, nos grupos I,II e III.

Figura 15. Correlação e índice kappa entre a detecção de anticorpos IgA anti-MAP1 com a associação entre o sistema automatizado VIDAS-IgM e o teste de avidéz de anticorpos IgG anti-T. *gondii*-VIDAS nos grupos I,II e III.

6.4.8 Eficiência diagnóstica

Para a avaliação da eficiência do teste ELISA para detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA, utilizando antígenos peptídicos isolados ou associados na forma de MAP, no discernimento das diferentes fases da toxoplasmose, avaliamos os antígenos peptídicos com melhor desempenho, SAG-1 e MAP1.

Figura 16. Eficiência diagnóstica do teste ELISA para detecção dos anticorpos IgG, IgM e IgA frente a MAP1 e SAG-1 nos grupos I, II e III. A linha tracejada corresponde à eficiência máxima = 1,0 conforme Ferreira & Ávila, 2001.

6.4.9 Reatividade de anticorpos IgM frente a MAP1 na toxoplasmose recente aguda (grupo I), recente não aguda (grupo II) e pregressa.

Como mostrado na Figura 17, anticorpos IgM não foram detectados nos grupos com toxoplasmose recente não aguda e toxoplasmose pregressa. Foi encontrado significativa diferença entre a relação densidade óptica e cut-off entre as amostras de pacientes com toxoplasmose recente aguda (média 1,6) e pacientes com toxoplasmose recente não aguda (0,1) e toxoplasmose pregressa (0,1). Se aplicarmos o cut-off de 0.125 podemos observar que nenhuma amostra do grupo II ou III apresentaram densidade óptica próxima ao limiar de reatividade. O teste ELISA IgM anti-MAP1 mostrou-se eficiente no discernimento entre a toxoplasmose recente aguda da toxoplasmose recente não aguda e pregressa.

Figura 17. Detecção de anticorpos IgM anti-MAP-1 nos grupos I, II e III. Linha tracejada corresponde ao cut-off. Grupo I- toxoplasmose recente aguda, grupo II- toxoplasmose recente não aguda e grupo III- toxoplasmose pregressa.

7. DISCUSSÃO

O laboratório desempenha papel fundamental no diagnóstico das diferentes formas da toxoplasmose de que se destacam: as formas agudas da toxoplasmose adquirida, infecções que ocorrem durante a gestação, a toxoplasmose congênita no recém-nascido, as manifestações oculares e reagudizações nos imunodeficientes. Mas para que possa fornecer informações seguras, torna-se imprescindível à utilização adequada dos processos de que dispõe associados à experiência na interpretação de seus resultados.

Desde a década de 60, as técnicas de IFI e HAI são utilizadas para o diagnóstico da toxoplasmose, por serem técnicas de fácil execução e baixo custo, adequadas a pequenas rotinas, com sensibilidade e especificidade comparáveis ao teste Sabin Feldman (Walton et al., 1966), que era considerado nessa época como teste referência. Utilizando-se destas metodologias associadas à reação de fixação de complemento, Camargo, Desmont e Remington em 1977 idealizaram diferentes padrões de resposta de anticorpos, caracterizando a fase aguda (perfil I), a fase de transição (perfil II) e a fase crônica da toxoplasmose (perfil III). Por muitos anos estes perfis auxiliaram os clínicos na confirmação das suspeita de toxoplasmose aguda.

Nos anos subsequentes, à medida que técnicas mais sensíveis para a pesquisa de anticorpos IgM foram desenvolvidas, problemas como a persistência de anticorpos IgM e resultados falso-negativos para anticorpos IgG tornaram-se mais frequentes (Potasman et al., 1996; Remington et al., 2004; Montoya et al., 2004; Araujo & Ferreira, 2008). Esta persistência na detecção de anticorpos IgM por

longos períodos após a infecção pode levar a uma interpretação errônea dos resultados por se atribuir excessivo valor aos níveis de anticorpos residuais, os quais não são clinicamente relevantes e erroneamente interpretados como resultados positivos, indicando infecção aguda ou no caso do anticorpo IgG proteção, com sérias consequências, especialmente em gestantes. Deve-se salientar que em muitos países, incluindo o Brasil, a interpretação da presença de anticorpos IgM para o diagnóstico de infecção aguda é baseada em resultados obtidos em amostra única de soro, justificada pela necessidade de equipamentos e reagentes dispendiosos que limitam a possibilidade do acompanhamento sorológico.

Concordando com estudo anterior em nosso laboratório, verificamos a presença de anticorpos IgM residuais em metodologia automatizada utilizada atualmente no diagnóstico da toxoplasmose - ELFA-VIDAS (Araujo & Ferreira, 2008). Nossos resultados estão de acordo com os trabalhos iniciais da utilização dos sistemas automatizados que já mostravam a presença de anticorpos IgM residuais, problema este que persiste até os dias atuais (ASHBURN et al., 2003). Os indivíduos que apresentaram anticorpos IgM residuais, determinados pela alta avidéz de anticorpos IgG anti-*T. gondii* associados aos baixos níveis de detecção de anticorpos IgM nos métodos de IFI e HAI foram classificados como toxoplasmose recente não aguda.

Para complementar o diagnóstico sorológico e auxiliar o clínico na elucidação destes casos, diversos marcadores foram estudados, incluindo a avidéz dos anticorpos IgG anti-*T.gondii*. Testes manuais e automatizados para a determinação da avidéz de anticorpos IgG específicos foram desenvolvidos a partir do trabalho de Hedman et al., 1989. O método automatizado para a detecção da avidéz de

anticorpos IgG anti-*T. gondii* - ELFA-VIDAS tem sido utilizado com frequência em grandes centros diagnósticos com excelentes resultados, discernindo casos complicados. Remington et al., 2004 associando a avidéz do sistema ELFA-VIDAS e a detecção de anticorpos de diferentes classes específicos para o parasita, afirmou que em amostra única de soro, a utilização desta associação pode excluir infecção aguda. A significativa eficiência diagnóstica da avidéz de anticorpos IgG por método automatizado foi observada em nosso estudo anterior e atual corroborando com a premissa de que a detecção da avidéz de anticorpos IgG pelo sistema ELFA é apropriado para excluir infecção aguda (Araújo & Ferreira, 2008).

Com a utilização cada vez mais frequente do teste de avidéz como teste complementar no discernimento dos casos de IgM residual e definição de doença atual, o perfil idealizado por Camargo et al., em 1977 foi adaptado para uma nova classificação. Camargo, In: Ferreira & Ávila propôs que a infecção aguda se divide em duas fases: recente aguda e recente não aguda. O perfil recente agudo é caracterizado pela presença de anticorpos IgG e IgM específicos e baixa avidéz de anticorpos IgG, no perfil recente não agudo, observa-se à presença de anticorpos IgG e IgM específicos e alta avidéz de anticorpos IgG. No perfil crônico, os anticorpos IgM são indetectáveis e anticorpos IgG apresentam alta avidéz. Porém a detecção de resultados falso-positivos e falso-negativos para anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii* e indivíduos com baixa avidéz sem doença e alta avidéz com quadros clínicos bem definidos de toxoplasmose, dificultam a classificação nos diferentes perfis da toxoplasmose. Tal fato se deve às condições de imunossupressão ou farmacoterapia anti-toxoplasma que podem afetar a cinética maturação da avidéz de anticorpos IgG.

No intuito de desenvolver métodos diagnósticos que possam confirmar os perfis sorológicos, determinados pelos testes atuais, em amostra única de soro, sem indicação de testes anteriores que assegurem uma soroconversão, diversos componentes moleculares originados de processo secretório das formas taquizoítas de *T. gondii* tem sido estudado (Decoster et al., 1988; Mineo et al., 1993; Acebes et al., 1994; Meisel et al., 1996; Araujo & Ferreira, 2008).

Os antígenos de excreção/secreção de *T. gondii* são importantes marcadores sorológicos de toxoplasmose por representar 90% dos antígenos circulantes no soro logo após o início da infecção (Hughes & Van Knapen, 1981). Entre os antígenos de superfície SAG1 é o antígeno mais abundante e o principal alvo da resposta imune do hospedeiro (Cesbron-Delaw et al., 1994) sendo referido como o principal antígeno de superfície envolvido nos processos de invasão e adesão a célula hospedeira (Mineo et al., 1993). SAG1 é uma proteína exclusiva das formas taquizoítas, e uma potente ferramenta nos testes para diagnóstico de infecção recente (Acebes et al., 1994). No entanto, anticorpos anti-SAG1 são detectados tanto na fase crônica quanto na fase aguda da toxoplasmose (Potasman et al., 1986; Decoster et al., 1988; Jung et al., 2004; Araújo & Ferreira, 2008).

Outras importantes frações do ESA de *T. gondii* têm sido estudadas no diagnóstico da toxoplasmose, tais como, as frações originárias dos grânulos densos (GRA-1 e GRA-7).

Em literatura é reportado que antígenos recombinantes de GRA-7 estão presentes no citoplasma de taquizoítos infectados dentro da célula hospedeira, levando ao forte reconhecimento imunológico humoral no

momento da ruptura do cisto do toxoplasma (Jacobs et al., 1998; Begheto et al., 2003).

Outra fração originária dos grânulos densos é GRA-1 que tem sido reportada em literatura em soro de mulheres grávidas infectadas com o *T. gondii* e tal qual encontramos neste estudo em soros de pacientes com toxoplasmose aguda e crônica (Fernandez et al., 2004; Pietkiewicz et al., 2007; Souza et al., 2009).

Atualmente o foco dos trabalhos no diagnóstico da toxoplasmose e de outras doenças infecciosas esta relacionado à purificação do antígeno, onde a biologia molecular tem se mostrado uma alternativa promissora, diminuindo as limitações inerentes dos antígenos provenientes de formas taquizoítas utilizados nos testes sorológicos atuais, principalmente nos testes para a detecção de anticorpos IgM específicos (Tam, 1988).

A construção de MAPs (múltiplos antígenos peptídicos) representa um sistema com grande potencial. Entre as vantagens do MAPs, podemos citar: a imunogenicidade, grande densidade de epítomos, possibilidade de definição de tamanho, número, relação e posição relativa dos epítomos de células B e T, influenciando significamente na eficiência diagnóstica, quando utilizado como antígenos na análise das ligações antígeno/anticorpo em ensaios qualitativos e quantitativos (TAM & Zavala, 1989).

Neste contexto, a natureza multimérica do MAP prevê construções com resultados reprodutíveis e aumento da superfície específica de ligação, levando à detecção precoce de anticorpos de baixa afinidade, principalmente do isotipo IgM durante a fase inicial de infecções.

Avanços significantes tem se conseguido atualmente na aplicação dos MAPs no diagnóstico sorológico das diferentes doenças infecciosas. Tam & Zavala, 1989 utilizando MAP observaram aumento na sensibilidade $> 10^8$ vezes em comparação com antígeno recombinante na detecção de anticorpos dos diferentes isotipos por ELISA.

Estes resultados indicam que os MAPs podem ser antígenos de escolha para a fase sólida em imunoensaios mostrando-se uma ferramenta promissora para sorodiagnóstico em indivíduos infectados.

NOYA et al. (2003) compararam diferentes preparações antigênicas utilizando-se MAPs para o diagnóstico de infecções parasitárias diferentes e relataram alta sensibilidade e especificidade quando comparados as demais preparações antigênicas, incluindo os peptídeos recombinantes.

Neste trabalho, associamos os bons resultados encontrados em estudo anterior em nosso laboratório com SAG-1 proveniente de processo excretor/secretor e outras frações protéicas dos grânulos densos (GRA-1 e GRA-7) com o potencial demonstrado por diversos autores da utilização do MAP no diagnóstico de doenças infecciosas.

Para tanto foi primeiramente produzido o antígeno ESA de *T. gondii* conforme padronização anterior, isolado as frações de interesse (SAG-1, GRA-1 e GRA-7) para síntese de recombinantes para a constituição dos diferentes MAPs a serem estudados. Foram avaliadas quatro combinações diferentes como se segue MAP1 (SAG-1, GRA-1 e GRA-7), MAP2 (SAG-1 e GRA-1), MAP3 (SAG-1, GRA-1 e GRA-7) e MAP4 (GRA-1 e GRA-7) quanto a eficiência diagnóstica da detecção dos isotipos IgG, IgM e IgA no discernimento das diferentes fases da toxoplasmose.

Foi então realizado a padronização do teste de ELISA utilizando os MAPs 1,2,3 e 4 para a detecção dos anticorpos IgG, IgM e IgA, onde foi avaliado possíveis interferentes, a presença de reação cruzada, reprodutibilidade intra teste, sensibilidade, especificidade utilizando-se como padrão ouro a associação dos testes de IFI e HAI e teste comercial automatizado – ELFA.

Quanto a presença de interferentes, tais como hemólise, lipêmia e fator reumatóide, foi observada apenas interferência nas frações isoladas dos grânulos densos (GRA-1 e GRA-7) e no MAP4 que era constituído apenas de frações dos grânulos. Em literatura a avaliação de interferentes nestas mesmas condições do nosso estudo ainda não foi realizada o que nos deixa sem parâmetros para inferir a razão para tal achado. Alguns trabalhos utilizando recombinante das proteínas dos grânulos densos observaram a presença de falsos resultados positivos, porém, não foi realizado a investigação aprofundada da causa desta reatividade (Jacobs et al., 1998; Begheto et al., 2003; Fernandez et al., 2004; Pietkiewicz et al., 2007; Souza et al., 2009).

Obtivemos ausência de reação cruzada frente aos diferentes MAPs analisados e mesmo quando utilizado as frações isoladamente. Estes achados podem ser explicados pela alta pureza dos antígenos aqui estudados e pela grande concentração de epítomos específicos encontrados nas combinações de MAPs analisadas.

Assim como relatado em literatura (Tam & Zavala, 1989), a utilização de MAP em ensaio imunoenzimático para utilização em diagnóstico de doenças infecciosas confere excelente reprodutibilidade dos resultados, como observados neste trabalho.

Ao contrário da excelente especificidade encontrada nas frações isoladas ou associadas como MAPs nos indivíduos clinicamente saudáveis e com outras patologias relacionadas, a sensibilidade de SAG-1, GRA-1 e GRA-7 em análise individual para anticorpos IgG, IgM e IgA-ELISA foi baixa, devido aos resultados falso-negativos observados no estudo do grupo dos pacientes I, II e III. Além disso, a positividade observada nestes mesmos grupos de pacientes, por meio dos ensaios referidos acima, não permitiu a discriminação de toxoplasmose recente aguda de outras fases da doença.

O IgG-ELISA, utilizando os peptídeos GRA-1 e GRA-7 de forma isolada, embora mostrando uma boa sensibilidade para toxoplasmose crônica, não pode ser útil como ensaio confirmatório como já demonstrado por Jacobs (1998) e Beghetto (2003), uma vez que apresenta desempenho inferior nas fases de toxoplasmose recente aguda e não aguda.

Após o estudo de cada fração isoladamente, seguimos o estudo com as frações associadas na forma de MAP (MAP1, MAP2, MAP3 e MAP4) para analisar a sensibilidade, especificidade e conseqüente eficiência diagnóstica no discernimento das diferentes fases da toxoplasmose.

Na avaliação inicial observou-se que quando SAG-1 estava presente, como MAP1, MAP2 e MAP3, a sensibilidade e a especificidade na detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA em diferentes fases de toxoplasmose foi maior em comparação com aqueles sem SAG-1, como MAP4. Nossos resultados são consistentes com os resultados de outros pesquisadores que observaram alta sensibilidade e especificidade nos testes sorológicos no diagnóstico da toxoplasmose quando SAG-1 esta presente. Porém assim como demonstrado anteriormente pelo nosso grupo

(Araujo & Ferreira, 2008) e por outros autores SAG-1 pode ser detectado tanto na fase recente quanto na fase crônica; como observado para os MAPs 2 e 3.

Contrariando este contexto MAP1 que apresenta em sua conformação SAG-1 não apresentou reatividade nas fases recente não aguda e crônica, o que pode ser explicado pela conformação antigênica em MAP detectar anticorpos IgM preferencialmente de baixa avidéz. Foi observado correlação perfeita entre os resultados obtidos na detecção de anticorpos IgG e IgM anti-MAP1 e a interpretação do perfil sorológico (Camargo, In: Ferreira & Ávila, 2001) obtido pela associação dos testes de IFI, HAI e sistema automatizado ELFA.

Outro dado importante obtido na detecção de anticorpos IgM anti-MAP1 foi a não detecção de anticorpos IgM residuais encontrados no sistema automatizado ELFA, que pode ser explicado pela associação da detecção de anticorpos IgM de baixa avidéz, aos diversos epítomos específicos encontrados na conformação – MAP e pela combinação das frações antigênicas do ESA de *T. gondii* estudadas.

No estudo das combinações de peptídeos, tais como, MAP2, 3 e 4, o teste apresentou desempenho diagnóstico baixo, e a fase recente aguda, recente não aguda e crônica não puderam ser distinguidas como no ensaio utilizando MAP1. Estes resultados indicam claramente que a combinação antigênica influencia significativamente no desempenho do teste diagnóstico da toxoplasmose.

Quanto a eficiência diagnóstica dos diferentes MAPs estudados na detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA em três diferentes grupos (recente agudo, recente não agudo e crônicos) foi observado excelente eficiência diagnóstica para MAP1 no discernimento entre indivíduos com infecção de indivíduos crônicos. Resultados

semelhantes foram encontrados por Noya (2003) utilizando MAP no diagnóstico de diferentes doenças parasitárias.

No estudo de Pietkiewicz (2007) com a mesma combinação antigênica do MAP-1, porém utilizando-se antígenos recombinantes não foi possível discriminar a fase recente aguda da fase recente não aguda. Os melhores resultados por nós encontrados podem ser explicados pela alta sensibilidade, especificidade e detecção de anticorpos IgM de baixa avidéz quando utilizado antígeno na conformação de MAP em imunoensaios.

Nossos resultados indicam que a combinação MAP1 (SAG-1, GRA-1 e GRA-7) pode ser o antígeno de escolha para o uso em imunoensaios em fase sólida mostrando-se como ferramenta promissora para o diagnóstico sorológico da toxoplasmose aguda ou recente em amostra única de soro.

8.0 Conclusões

- A construção de MAP-1 apresentou 100% especificidade para detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA nas diferentes fases da toxoplasmose
- ELISA IgM anti-MAP-1 mostrou-se eficiente no estabelecimento de um perfil de infecção recente aguda em indivíduos infectados pelo *T. gondii*
- MAP-1 apresentou boa correlação quando comparados aos testes clássicos manuais e o sistema automatizado, apresentando maior especificidade na detecção de anticorpos IgM específicos.
- MAP-1 apresentou correlação perfeita com o perfil sorológico de Camargo, In: Ferreira & Ávila, 2001, utilizado neste estudo como padrão ouro.

9.0 Referências bibliográficas

Acebes MV, Diez B, Garcia-Rodrigues JA, Viens P, Cisterna R. Detection of circulating antigens in the diagnosis of acute toxoplasmosis. *Am J of Trop Med and Hyg.* 1994; 51: 506-511.

Aliberti, J. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. *Nature Rev.* 2005;162-170.

Amato Neto, V., Medeiros, E.A. os Médicos – Sao Paulo, ppS., Levi, G.C. & Duarte, M.I.S. Toxoplasmose. São Paulo: Sarvier, 1995, p. 29-37.

Araújo PR, Ferreira AW. Avidity of IgG antibodies against excreted/secreted antigens of *Toxoplasma gondii*: immunological marker for acute recent toxoplasmosis. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2008; 41:142-7.

Ashburn, D.; Joss, A. W.; Pennington, T. H.; Ho-Yen, D. O. Do IgA, IgE, and IgG avidity tests have any value in the diagnosis of *Toxoplasma* infection in pregnancy? *J Clin Patho.* 1998; 51: 312-315.

Aspöck, H.; Pollak, A. Prevention of prenatal toxoplasmosis by serological screening of pregnant women in Austria. *Scand J of Infec Dis.* 1992; 84:32 - 37.
Bader, T. J.; Marcone, G. A.; Asch, D. A. Prenatal Screening for Toxoplasmosis. *Obsts & Gynecol.* 1997; 90:457 – 464.

Bahia-Oliveira, L. M.; Jones, J. L.; Azevedo-Silva, J.; Alves, C. C.; Orefice, F.; Addiss, D. G. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. *Em Infect Dis.*, 2003; 9: 55-62.

Baril L, Ancelle T, Goulet V, Thulliez P, Tirard-Fleury V, Carme B. Risk factors for Toxoplasma infection in pregnancy: a case-control study in France. *Scand J Infect Dis.* 1999; 31(3):305-9.

Barragan, A.; Sibley, L. D. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. *J Exp Med.* 2002; 195:1625-1633.

Beghetto, E.; Buffolano, W.; Spandoni, A.; Del Pezzo, M.; Di Cristina, M.; Minenkova, O.; Petersen, E.; Felici, F.; Gargano, N. Use of an immunoglobulin G avidity assay based on recombinant antigens for diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *J Clin Microb.* 2003; 41(12):5414-5418.

Black, M. W.; Boothroyd, J. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000; 63(3):607 - 623.

Bobić B, Sibalić D, Djurković-Djaković O. High levels of IgM antibodies specific for *Toxoplasma gondii* in pregnancy 12 years after primary toxoplasma infection. *Gynecol Obstet Invest.* 1991; 31(3):182-4.

Bowie WR, King AS, Werker DH, Isaac-Renton JL, Bell A, Eng SB, Marion SA. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. The BC Toxoplasma Investigation Team. *Lancet*. 1997; 350(9072):173-7.

Burg, J.I.; Grover, G.M.; Pouletty, P. et al. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii* by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1989; 8(27):1787 – 1792.

Burnett, A. J.; Shortt, S. G.; Isaac-Renton, J.; King, A.; Werker, D.; Bowie, W. R. Multiple cases of acquired toxoplasmosis retinitis presenting in an outbreak. *Ophthalmol*. 1998; 105(6):1032-1037.

Buxton, D. Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis spp.*) in sheep and goats: recent advances. *Vet Res*. 1998; 29(3 – 4):289 - 310.

Buxton, D.; McAllister, M. M.; Dubey, J. P. The comparative pathogenesis of neosporosis. *Trends in Parasitol*. 2002; 18(12): 546-552.

Camargo ME, Leser PG & Leser,WS.P. Definição de perfis sorológicos na toxoplasmose. Importância diagnóstica e epidemiológica. *Rev Bras Patol Clin*. 1977; 13:113-127.

Camargo, M. E.; Ferreira, A. W.; Mineo, J. R.; Takiguti, C. K.; Nakahara, O. S. Immunoglobulin G and immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays and defined toxoplasmosis serological patterns. *Infect and Immunol.* 1978; 21(1):55-58.

Camargo, M. E.; Silva, S. M.; Leser, P. G.; Granato, C. H. Aidez de anticorpos IgG específicos como marcadores de infecção primária recente pelo *Toxoplasma gondii*. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1991; 33(3): 213-218.

Camargo ME. Toxoplasmosis. In: Ferreira A.W, Avila SLM (Eds.) Diagnostico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes, Ed. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, p. 165-174, 1996.

Candolfi E, Pastor R, Huber R, Filisetti D, Villard O. IgG avidity assay firms up the diagnosis of acute toxoplasmosis on the first serum sample in immunocompetent pregnant women. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007; 58(1):83-8.

Cantos, G.A.A.; Prando, M.D.; Siqueira, M.V.; Teixeira, R.M. Toxoplasmose: ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e diagnostico. *Rev da Assoc Med Bras.* 2000; 46(4):335 - 341.

Carmo, E.L.; Povia, M.M.; Trindade, D.B.; Machado, L.D.; Mesquita, M.P.M. Levantamento da prevalência de *Toxoplasma gondii* através de diferentes métodos sorológicos em um grupo de grávidas e crianças (0-2 anos) da cidade de Belém/PA.

In: 14o Congresso Brasileiro de Parasitologia; 1997; Salvador. Anais. Salvador: [s.n.], p. 107, 1997.

Cesbron-Delauw, M. F.; Tomavo, S.; Beauchamps, P.; Fourmaux, M.F.; Camus, D.; Capron, A.; Dubremetz, J. F. Similarities between the primary structures of two distinct major surface proteins of *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem.* 1994; 269(23):16217-16222.

Choi WY, Nam HW, Kwak NH, Huh W, Kim YR, Kang MW, Cho SY, Dubey JP. Foodborne outbreaks of human toxoplasmosis. *J Infect Dis.* 1997; 175(5):1280-2.

Chu, R.W. Leukocytes in blood transfusion: adverse effects and their prevention. *HKMJ.* 1999; 5(3): 280 – 284.

Cimerman B. & Cimerman S., Parasitologia Humana e seus Fundamentos Gerais, Ed. Atheneu , Sao Paulo, 375 p, 1999.

Coelho, R.A.L.; Kobayashi, M; Carvalho, J.L.B. Prevalence of IgG antibodies specific to *Toxoplasma gondii* among blood donors in Recife, Northeast Brazil. *Rev Int Med Trop S Paulo.* 2003; 45(4):200-2003.

Cozon, G. J. N.; Ferrandiz, J.; Nebbi, H.; Wallon, M.; Peyron, F. Estimation of the avidity of immunoglobulin G for routine diagnosis of chronic *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women. *Europ J Clin Microb Infect Dis.* 1998; 17(1):32-36.

de Carli, G.A. Parasitologia Clinica – Selecao de Metodos e Tecnicas de Laboratorio para Diagnostico das Parasitoses Humanas. Sao Paulo: Atheneu, p. 525, 2001.

Decoster A, Darcy F, Capron A. Recognition of *Toxoplasma gondii* excreted and secreted antigens by human sera from acquired and congenital toxoplasmosis: identification of markers of acute and chronic infection. *Clin Exp Immunol*. 1988; 73:376-82.

de Moura L, Bahia-Oliveira LM, Wada MY, Jones JL, Tuboi SH, Carmo EH, Ramalho WM, Camargo NJ, Trevisan R, Graça RM, da Silva AJ, Moura I, Dubey JP, Garrett DO. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. *Emerg Infect Dis*. 2006; 12(2):326-9.

Denkers, E. Y.; Gazzinelli, R. T. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Microb Rev*. 1998; 11(4): 569-588.

Derouin F, Sulcebe G, Ballet JJ. Sequential determination of IgG subclasses and IgA specific antibodies in primary and reactivating toxoplasmosis. *Biomed Pharmacother*. 1987; 41(8):429-33.

Desmonts, G.; Remington, J. S. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. *J Clin Microb.* 1980; 11(6): 562-568.

Diener, H.C. (1999). Opportunistic CNS infection after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1999; 23(11):1167 – 1176.

Dubey, J. P. Toxoplasmosis. *Veterinary Clinics of North American – Small Animal Practice*, 1987; 17(6):1389-1404.

Dubey, J.P. & Beattie, C.P. Toxoplasmosis of animals and man. Boca Raton. *CRC Press*. p. 1- 220, 1988.

Dubey, J. P.; Speer, C. A.; Shen, S. K.; Kwok, O. C. H. and Blixt, J. A. Oocyst-induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity, and stage conversion in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *J Parasitol.* 1997; 83(5):870 – 882.

Dubey, J. P.; Lindsay, D. S.; Speer, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microb Rev.* 1998; 11(2): 267-299.

Dubey, J. P. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Vet Parasitol.* 1999; 84(3-4): 349-367.

Dubey, J.P.; Odening, K. Toxoplasmosis and related infections. In: Parasitic diseases of wild mammals. Samuel W.M., Pybus M.J., Kocan A.A. (eds). Iowa State University Press, Ames, p. 478 - 492, 2001.

Dubey, J. P.; Graham, D. H.; Blackston, C. R.; Lehmann, T.; Gennari, S. M.; Ragozo, A. M.; Nishi, S. M.; Shen, S. K.; Kwok, O. C.; Hill, D. E.; Thulliez, P. Biological and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from Sao Paulo, Brazil: unexpected findings. *Int J Parasitol.* 2002; 32(1):99-105.

Dubey, J. P.; Graham, D. H.; da Silva, D. S.; Lehmann, T.; Bahia-Oliveira, L. M. *Toxoplasma gondii* isolates of free-ranging chickens from Rio de Janeiro, Brazil: mouse mortality, genotype, and oocyst shedding by cats. *J Parasitol.* 2003a; .89(4): 851-853.

Dubey, J. P.; Navarro, I. T.; Graham, D. H.; Dahl, E.; Freire, R. L.; Prudencio, L. B.; Sreekumar, C.; Vianna, M.; Lehmann, T. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens from Parana, Brazil. *Vet Parasitol.* 2003b; 117(3):229-234.

Dubey, J. P.; Venturini, M. C.; Venturini, L.; Piscopo, M.; Graham, D. H.; Dahl, E.; Sreekumar, C.; Vianna, M. C.; Lehmann, T. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from free-ranging chickens from Argentina. *J Parasitol.* 2003c; 89(5):1063-1064.

Dubey, J. P. Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. *Vet Parasitol.* 2004a; 126(1-2): 57-72.

Dubey, J. P.; Navarro, I. T.; Sreekumar, C.; Dahl, E.; Freire, R. L.; Kawabata, H. H.; Vianna, M. C.; Kwok, O. C.; Shen, S. K.; Thulliez, P.; Lehmann, T. *Toxoplasma gondii* infections in cats from Parana, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. *J Parasitol.* 2004b; 90(4):721-726.

Dubey, J. P.; Bhaiyat, M. I.; de Allie, C.; Macpherson, C. N.; Sharma, R. N.; Sreekumar, C.; Vianna, M. C.; Shen, S. K.; Kwok, O. C.; Miska, K. B.; Kill, D. E.; Lehmann, T. Isolation, tissue distribution, and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from chickens in Grenada, West Indies. *J Parasitol.* 2005a; 91(3):557-560.

Dubey, J. P.; Gomez-Marin, J. E.; Bedoya, A.; Lora, F.; Vianna, M. C.; Hill, D.; Kwok, O. C.; Shen S. K.; Marcet, P. L.; Lehmann, T. Genetic and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Colombia, South America. *Vet Parasitol.* 2005b; 134(1-2): 67- 72.

Dubey, J. P.; Karhemere, S.; Dahl, E.; Sreekumar, C.; Diabate, A.; Dabire, K. R.; Vianna, M. C. B.; Kwok, O. C. H.; Lehmann, T. First biologic and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Africa

(Democratic Republic of Congo, Mali, Burkina Faso, and Kenya). *J Parasitol.* 2005c; 91(1):69-72.

Dunn, D.; Wallon, M.; Peyron, F.; Petersen, E.; Peckham, C.; Gilbert, R. Mother-to-Child Transmission of Toxoplasmosis: Risk Estimates for Clinical Counselling. *Obst & Gynec Survey.* 2000; 55(1):6-9.

Ferrandiz J , Mercier C , Wallon M , S Picot , Cesbron-Delauw MF , F Peyron . Limited value of assays using detection of immunoglobulin G antibodies to the two recombinant dense granule antigens, GRA1 and GRA6 Nt of *Toxoplasma gondii*, for distinguishing between acute and chronic infections in pregnant women.. *Clin Lab Diagn Immunol.* 2004; 11(6) :1016-21.

Ferreira AW & Ávila SM. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. Rio de Janeiro: Guanabara; 2001. p.165-174.

Ferreira AW, Camargo ME. Toxoplasmosis and the laboratory: Diagnosis and a constant striving for improvement. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2002; 44: 119-120.

Foudrinier, F.; Villena, I.; Jaussaud, R.; Aubert, D.; Chemla, C.; Martinot, F.; Pinon, J. M. Clinical value of specific immunoglobulin E detection by enzyme-linked immunosorbent assay in cases of acquired and congenital toxoplasmosis. *J Clin Microb.* 2003; 41(4):1681-1686.

Frenkel, J.K.; Dubey, J.P. & Miller, N.L. *Toxoplasma gondii* in cats: Fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science*. 1970; 167(919): 893 – 896.

Frenkel, J.K., Transmission of toxoplasmosis and the role of immunity in limiting transmission and illness. *J Am Vet Med Assoc*. 1990; 196 (2):233 – 240.

Fulton, J. D.; Turk, J. L. Direct agglutination test for *Toxoplasma gondii*. *Lancet*, 1959; 2:1068-1069.

Gallego, C.; Saavedra-Matiz, C.; Gomez-Marin, J. E. Direct genotyping of animal and human isolates of *Toxoplasma gondii* from Colombia (South America). *Acta Tropica, Basel*, 2006; 97(2):161-167.

Gallino A, Maggiorini M, Kiowski W, Martin X, Wunderli W, Schneider J, Turina M, Follath F. Toxoplasmosis in heart transplant recipients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1996; 15(5):389-93.

Gras L, Gilbert RE, Wallon M, Peyron F, Cortina-Borja M. Duration of the IgM response in women acquiring *Toxoplasma gondii* during pregnancy: implications for clinical practice and cross-sectional incidence studies. *Epidemiol Infect*. 2004 132(3):541-8.

Gross, U.; Roos, T.; Appoldt, D.; Heesemann, J. Improved serological diagnosis of

Toxoplasma gondii infection by detection of immunoglobulin A (IgA) and IgM antibodies against P30 by using the immunoblot technique. *J Clin Microb.* 1992; 30(6): 1436-1441.

Hedman, K.; Lappalainen, M.; Seppala, I.; Makela, O. Recent primary *Toxoplasma* infection indicated by a low avidity of specific IgG. *J Infect Dis.* 1989; 159(4): 736-739.

Hegab, S. M.; Al-Mutawa, S. A. Immunopathogenesis of toxoplasmosis. *Clin Exp Med.* 2003; 3(2): 84-105.

Hill, D.; Dubey, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microb Infect.* 2002; 8(10): 634-640.

Hitt, J. A.; Filice, G. A. Detection of *Toxoplasma gondii* parasitemia by gene amplification, cell culture, and mouse inoculation. *J Clin Microb.* 1992; 30(12): 3181-3184.

Hohlfeld, P.; Daffos, F.; Costa J. M.; Thulliez, P.; Forestier, F.; Vidaud, M. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase-chain reaction test on amniotic fluid. *N Engl J Med.* 1994; 331(11): 695-699.

Holec-Gasior L, Kur J, Hiszczyńska-Sawicka E. GRA2 and ROP1 recombinant

antigens as potential markers for detection of *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G in humans with acute toxoplasmosis. *Clin Vaccine Immunol.* 2009; 6(4):510-4.

Holland, G. N. Reconsidering the pathogenesis of ocular toxoplasmosis. *Am J Ophthalmol.* 1999; 128(4): 502-505.

Homan, W. L.; Vercammen, M.; De Braekeleer, J.; Verschuern, H. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int J Parasitol.* 2000; 30(1): 69-75.

Howe, D. K.; Sibley, L. D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: Correlate on of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis.* 1995; 172(6): 1561-1566.

Howe, K. D.; Honore, S.; Derouin, F.; Sibley, L. D. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *J Clin Microb.* 1997; 35(6):1411-1414.

Hughes HPA, Van Knapen F. Characterization of a secretory antigens from *Toxoplasma gondii* and its role in circulating antigen production. *Int J Parasitol.* 1981; 12: 433-437.

Huskinson-Mark, J.; Araujo, F.G.; Remington, J.S.: Evaluation of the effect of drugs

on the cyst form of *Toxoplasma gondii*. *J Infect Dis*. 1991; 164(1):170-171.

Jacobs, L.; Lande, M. N. A hemagglutination test for toxoplasmosis. *J Parasitol*. 1957; 43(3): 308-314.

Jacobs, L , Vercammen, M; Saman, E. Evaluation of Recombinant Dense Granule Antigen 7 (GRA7) of *Toxoplasma gondii* for Detection of Immunoglobulin G Antibodies and Analysis of a Major Antigenic Domain. 1999. *Clin Diag Lab Immunol*; 6(1):24-29.

Jacqueline, F; Jean-François, GY; Dumon, H. LDBio-Toxo Immunoglobulin G II occidentL test blot to confirmation anti-toxoplasma detection antiboides specific. *J Clin Microb*. 2008; 46: 2334-2338.

Jacquier, P.; Nadal, D.; Zuber, P.; Eckert, J. The status of infection with *Toxoplasma gondii* in the Swiss population: contribution of a seroepidemiologic study from the Zurich canton. *Schweiz Med Wochenschr*. 1995; 65(23S- 28S).

Janku, J. Pathogenes a pathologiccka anatomie taknazvaneho vinozeneho kolohome zlute skrny v oku normalne velikem a mikrophthalmickem s nalezem parazitu v sitnici. *Cas Lék Ces*. 1923; 62:1021 – 1027.

Jaqueti, J.; Hernandez-Garci, R.; Nicolas, D.; Martinez-Hernandez, D.; Navarro-Gallar, F.; Garcia-Esteban, R.J. Serology against *Toxoplasma gondii* in pregnant

women. Development of prevalen Miller,N.L.; Frenkel J.K.; Dubey, J.P. Oral infections with *Toxoplasma* cysts and oocysts in felines, other mammals, and in birds. *J Parasitol.* 1972; 58(5): 928 – 937.

Jaqueti, J.; Hernandez-Garci, R.; Nicolas, D.; Martinez-Hernandez, D.; Navarro-Gallar, F.; Garcia-Esteban, R.J. Serology against *Toxoplasma gondii* in pregnant women. Development of prevalence rates in the course of 4 years. *Rev Clin Esp.* 1991; 88(6):278 – 80.

Jones, J.L., Kruszon-Moran, D., Wilson, M. *Toxoplasma gondii* infection in the United States. *Emerg Infect Dis.* 2007; 9(11):1371 – 1374.

Jung, C.; Lee, C. Y.; Grigg, M. E. The SRS superfamily of *Toxoplasma* surface proteins. *Int J Parasitol.* 2004; 34(3): 285-296.

Kasper, L. H.; Crabb, J. H.; Pfefferkorn, E. R. Purification of a major membrane protein of *Toxoplasma gondii* by immunoabsorption with a monoclonal antibody. *J Immunol.* 1983; 130(5): 2407-2412.

Kato M, Claveria FG, Maki Y, Sanda K, Tanka T, Omata Y *et al.* Reactivity synthetic sag1 peptide sequences with rh, s273 and beverley strain induced anti-toxoplasma gondii antibodies. *Pathobiol.* 2007; 74:50-6.

Keeley, A.; Soldati, D. The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa. *Trends Cell Biol, Cambrid*, 2004; 14(10):528-532.

Khan, A.; Su, C.; German, M.; Storch, G. A.; Clifford, D. B.; Sibley, L. D. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from immunocompromised patients reveals high prevalence of type I strains. *J Clin Microbiol*. 2005; 43(12): 5881-5887.

Kim, K.; Weiss, L. M. *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. *Int J Parasitol*. 2004; 34(3):423-432.

Kodym P, Machala L, Roháčová H, Sirocká B, Maly M. Evaluation of a commercial IgE ELISA in comparison with IgA and IgM ELISAs, IgG avidity assay and complement fixation for the diagnosis of acute toxoplasmosis. *Clin Microbiol Infect*. 2007; 13(1):40-7.

Kravetz, J. D.; Federman, D. G. Toxoplasmosis in pregnancy. *Am J Med*, 2001; 118(3):212-216.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970; 227(5259):680-685.

Lappalainen, M.; Koskela, P.; Hodman, K. Incidence of primary *Toxoplasma* infections during pregnancy in southern finland: a prospective cohort study. *Scand J*

Infect Dis. 1992; 24(1):97-104.

Lappalainen, M.; Koskela, P.; Koskiniemi Khan, A.; SU, C.; German, M.; Storch, G. A.; Clifford, D. B.; Sibley, L. D. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from immunocompromised patients reveals high prevalence of type I strains. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(12):5881-5887.

Lelong, B.; Rahelimino, B.; Candolfi, E.; Ravelojaona, B.J.; Villard, O.; Rasamindrakotroka, A.J.; Kien, T. Prevalence of toxoplasmosis in a population of pregnant women in Antananarivo. *Bull Soc Pathol Exot.* 1995; 88(1):46 – 49.

Liesenfeld, O. Immune responses to *Toxoplasma gondii* in the gut. *Immunobiol.* 1999; 201(2): 229-239.

Lopez, A, Dietz VJ, Wilson M, Navin TR, Jones J.L. Preventing Congenital Toxoplasmosis. M M W R – *Recommendations and Reports.* 2000; 49(RR02): 57-75.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL. Protein measurement with the folinphenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193: 265-275.

Luft, B. J.; Hafner, R.; Korzun, A. H.; Leport, C.; Antoniskis, D.; Bosler, E. M.; Bourland D. D.; Uttamchandani, R.; Fuher, J.; Jacobson, J. Toxoplasmic encephalitis

in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Members of the ACTG 077p/ANRS 009 Study Team. *New Engl J Med.* 1993; 329(14): 995-1000.

MacAbe, R.; Remington, J.S. Toxoplasmosis: the time has come. *N Eng J Med.* 1988; 318(5):313 – 315.

Macedo V. Toxoplasma. In: Castro LP, Cunha AS, Rezende JM (eds) Protozooses humanas. Fundo Editorial BYK, São Paulo, 1994; 153-170.

Magi B, L Migliorini. Western blotting para o diagnóstico da toxoplasmose congênita. *New Microbiol.* 2011; 34 (1):93-5.

Martino, R.; Maertens, J.; Bretagne, S.; Rovira, M.; Deconinck, E.; Ullmann, A.J.; Held, T. & Cordonnier, C. Toxoplasmosis after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis.* 2000; 31(5):1188 –94.

Masur H, Jones TC, Lempert JA, Cherubini TD. Outbreak of toxoplasmosis in a family and documentation of acquired retinochoroiditis. *Am J Med.* 1978; 64(3):396-402.

Meisel, R.; Stachelhaus, S.; Mevelec, M. N.; Reichman, G.; Dubremetz, J. F.; Fischer, H. G. 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.* 1996; 81(2):259-63.

Miller NL, Frenkel JK, Dubey JP.J Oral infections with *Toxoplasma* cysts and oocysts in felines, other mammals, and in birds. *Parasitol.* 1972; 58(5):928-37.

Mineo, J. R.; amargo, M. E.; Ferreira, A. W.; Almeida, G. Research on IgM anti-*Toxoplasma gondii* antibodies by using a reverse immunoenzymatic technique. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 1986; 28:6-11.

Mineo, J. R.; McLeod, R.; Mack, D.; Smith, J.; Khan, I. A.; Ely, K. H.; Kasper, L. H. Antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (SAG1, P30) inhibit infection of host cells and are produced in murine intestine after peroral infection. *J Immunol.* 1993; 150(9): 3951-64.

Montoya, J. G.; Remington, J. S. Toxoplasmic chorioretinitis in the setting of acute acquired toxoplasmosis. *Clin Infect Dis.* 1996; 23(2): 277-82.

Montoya, J. G.; Liesenfeld, O. Toxoplasmosis. *Lancet*, 2004; 363(9425):1965-76.

Mordue, D. G.; Desai, N.; Dustin, M.; Sibley, L. D. Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *J Exp Med.* 1999; 190(12):1783-92.

Neves, D. P. *Parasitol Humana*. 10 ed. São Paulo: Atheneu, 2000, 428 p.

Nicolle, C.; Manceaux, L. Sur une infection à corps de Leishman (ou organisms voisins) du gondi. C. R. *Hebd Séances Academy Sciences*, 1908; 147:763-66.

Noya O.; Patarroyo M.E.; Guzman F. Immunodiagnosis of Parasitic Diseases with Synthetic Peptide. *Curr Protein Peptide Science*, 2003; 4(4): 299-308

Pelloux, H.; Guy, E.; Angelici, M. C.; Aspöck, H.; Bessières, M. H.; Blatz, R.; Del Pezzo, M.; Girault, V.; Gratzl, R.; Holberg-Petersen, M.; Johnson, J.; Krüger, D.; Lappalainen, M.; Naessens, A.; Olsson, M. A second European collaborative study on polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii*, involving 15 teams. *FEMS Microbiol Let*, 1998; 165 (2):231-37.

Pelloux, H., Fricker-Hidalgo, H., Pons, J.C., Bost-Brut, C., Brenier-Pinchart, M.P., Jouk, P.S., Ambroise-Thomas, P. Congenital toxoplasmosis: prevention in the pregnant woman and management of the neonate. *Arch Pediatr*. 2002; 9 (2): 206-12.

Pena, H. F.; Soares, R. M.; Amaku, M.; Dubey, J. P.; GEennari, S. M. *Toxoplasma gondii* infection in cats from Sao Paulo state, Brazil: seroprevalence, oocyst shedding, isolation in mice, and biologic and molecular characterization. *Res Vet Science*, 2006; 81(1): 58-67.

Pereira M.G. 1995. Epidemiologia, Teoria e Prática. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 596p.

Petersen, E.; Pollak, A.; Reiter-Owona, I. Recent trends in research on congenital toxoplasmosis. *Intl J Parasitol.* 2001; 31 (2):115-44.

Petersen, E.; Borobio, M.V.; Guy, E.; Liesenfeld, O.; Meroni, V.; Naessens, A.; Spranzi, E. and Thulliez, P. European Multicenter Study of the LIAISON Automated Diagnostic System for Determination of *Toxoplasma gondii*-Specific Immunoglobulin G (IgG) and IgM and the IgG Avidity Index. *J Clin Microb.* 2005; 43(4): 1570 -1574.

Pietkiewicz, H.E. Hiszczyńska-Sawicka, J. Kur, E. Petersen, H. V. Nielsen, M. Paul, M. Stankiewicz and P. Myjak. Usefulness of *Toxoplasma gondii* recombinant antigens (GRA1, GRA7 and SAG1) in an immunoglobulin G avidity test for the serodiagnosis of toxoplasmosis. *Parasitol Res.* 2007;100 (2):333-337.

Pinkerton, H.; Weinman, D. Toxoplasmosis infection in man. *Arch Pathol.* 1940; 30:374 – 92.

Pinkerton, H.; Henderson, R.G. Adult toxoplasmosis. A previously unrecognized disease entry simulating the typhus-spotted fever group. *J Am Assoc.* 1941, 116:807-

814. Apud: Amato Neto, V. Medeiros, E.A. S., Levi, G.C., Duarte, M.I.S. Toxoplasmose. 4a. Ed. Sao Paulo, Savier, p. 154, 1995

Porter, S. B.; Sande, M. Toxoplasmosis of the central nervous system in the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *New Engl J Med.* 1992; 327(23):1643-48.

Potasman I, Araujo FG, Desmonts G, Remington JS. Analysis of *Toxoplasma gondii* antigens recognized by human sera obtained before and after acute infection. *J Infect Dis.* 1996; 154:650-7.

Rai SK, Matsumura T, Ono K, Abe A, Hirai K, Rai G, Sumi K, Kubota K, Uga S, Shrestha HG. High Toxoplasma seroprevalence associated with meat eating habits of locals in Nepal. *Asia Pac J Public Health.* 1999; 11(2):89-93.

Räisänen S. Toxoplasmosis transmitted by blood transfusions. *Transfusion.* 1978;18(3):329-32.

Reiter-Owona I, Petersen E, Joynton D, Aspöck H, Dardé ML, Disko R, Dreazen O, Dumon H, Grillo R, Gross U, Hayde M, Holliman R, Ho-Yen DO, Janitschke K, Jenum PA, Naser K, Olszewski M, Thulliez P, Seitz HM. The past and present role of the Sabin-Feldman dye test in the serodiagnosis of toxoplasmosis. *Bull World Health Organ.* 1999; 77(11):929-35.

Remington, J.S. The tragedy of toxoplasmosis. *Ped Infect Dis J.* 1990; 9(10):762 – 63.

Remington, J.S.; McLeod, R.; Desmonts G. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein J.O., editors. *Infect Dis of the Fetus and Newborn.* 5th ed. Philadelphia: WB Saunders. p. 205 – 346, 2001.

Remington, J.S.; Thulliez, P.; Montoya, J.G. Recent Developments for Diagnosis of Toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(3): 941 -45.

Rinder, H.; Thomschke, A.; Darde, M. L.; Loscher, T. Specific DNA polymorphisms discriminate between virulence and non-virulence to mice in nine *Toxoplasma gondii* strains. *Mol Biochem Parasitol.* 1995; 69(1):123-26.

Roberts, C.; Cruickshank, S.; Alexander, J. Sex-determined resistance to *Toxoplasma gondii* is associated with temporal differences in cytokine production. *Infect Immunity.* 1995; 63(7):2549-55.

Roberts A, Hedman K, Luyasu V, Zufferey J, Bessires MH, Blatz RM, Candolfi E, Decoster A, Enders G, Gross U, Guy E, Hayde M, Ho-Yen D, Johnson J, Lcolier B, Naessens A, Pelloux H, Thulliez P, Petersen E. Multicenter evaluation of strategies for serodiagnosis of primary infection with *Toxoplasma gondii*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2001; 20(7):467-74

Rodier, M.H.; Berthonneau, J.; Bourgouin, A.; Giraudeau, G.; Agius, G.; Burucoa, C.; Hekpazo, A.; Jacquemin, J.L. Seroprevalences of Toxoplasma, malaria, rubella, cytomegalovirus, HIV and treponemal infections among pregnant women in Cotonou, Republic of Benin. *Acta Trop.* 1995; 59(4): 271 – 77.

Romand, S.; Wallon, M.; Franck, J.; Thulliez, P.; Peyron, F.; Dumon, H. Prenatal diagnosis using polymerase chain reaction on amniotic fluid for congenital toxoplasmosis. *Obst Gynecol*, 2001; 97(2):296-300.

Roos, T.; Martius, J.; Gross, U.; Schrod, L. Systematic serologic screening for toxoplasmosis in pregnancy: is it possible to simplify the diagnostic procedures? *J Gynecol Obstet Biol Reprod.* 1993; 81(22):277 –83.

Ruiz A, Frenkel JK. Intermediate and transport hosts of *Toxoplasma gondii* in Costa Rica. *Am J Trop Med Hyg.* 1980. 29(6):1161-6.

Sabin, A.; Feldman, H. A. Dyes as microchemical indicators of anil immunity phenomenon affecting a protozoan parasitic (*Toxoplasma*). *Science*, 1948; 108:660-63.

Saeij, J. P. J.; Boyle, J. P.; Boothroyd, J. C. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *Trends Parasitol.* 2005; 21(10):476-81.

Schares, G.; Pantchev, N.; Barutzki, D.; Heydorn, A. O.; Bauer, C.; Conraths, F. J. Oocysts of *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni*, *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* in faeces collected from dogs in Germany. *Int J Parasitol.* 2005; 35(14):1525-37.

Sensini, A. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy: opportunities and pitfalls of serological diagnosis. *Clin Microb Infect.* 2006; 12(6):504- 12.

Server, J.; Ellemberg, J.; Levy, A. Toxoplasmosis: maternal and pediatric findings in 23.000 pregnancies. *Pediatrics.* 1988; 181-92.

Sibley, L. D. Intracellular parasite invasion strategies. *Science*, 2004; 304:248-53.

Siegel, S.E.; Lunde, M.N.; Gelderman, A.H. et al. Transmission of toxoplasmosis by leukocyte transfusion. *Blood.* 1971; 37:388 – 94.

Sousa S, Ajzenberg D, Marle M, Aubert D, Vilela I, Da Costa JC *et al.* Selection of polymorphic peptides from *gra6* and *gra7* sequences of *toxoplasma gondii* strains to be used in serotyping. *Clin Vaccine Immunol.* 2009; 16:1158-69

Splendore, A. Un nuovo protozoa parassita dei conigli. Incontrato nelle lesioni Anatomiche d'una malattia che Ricorda in molti punti il kala-azar dell'uomo. *Rev Soc Ciências São Paulo*, 1908; 3:109-12.

Stepick-Biek P, Thulliez P, Araujo FG, Remington JS. IgA antibodies for diagnosis of acute congenital and acquired toxoplasmosis. *J Infect Dis.* 1990; 162(1):270-3.

Su, C.; Evans, D.; Cole, R. H.; Kissinger, J. C.; Ajioka, J. W.; Sibley, L. D. Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. *Science*, 2003; 299(5605): 414-16.

Sukthana, Y. Toxoplasmosis: beyond animals to humans. *Trends Parasitol.* 2006; 22 (3):137-42.

Suzuki Y, Thulliez P, Desmonts G, Remington JS. Antigen(s) responsible for immunoglobulin G responses specific for the acute stage of *Toxoplasma* infection in humans. *J Clin Microbiol.* 1988; 26(5):901-5.

Suzuki, Y.; Wong, S. Y.; Grumet, F. C.; Fessel, J.; Montoya, J. G.; Zolopa, A. R.; Portmore, A.; Schumacher-Perdreau, F.; Schrappe, M.; Koppen S.; Ruf, B.; Brown, B. W.; Remington, J. S. Evidence for genetic regulation of susceptibility to toxoplasmic encephalitis in AIDS patients. *J Infect Dis.* 1996; 173(1): 265-68.

Swisher, C. N.; Boyer, K.; McLeod, R. Congenital toxoplasmosis. *Semin Pediatric Neu.* 1994; 1(1):4-25, 1994.

Switaj, K.; Master, A.; Skrzypczak, M.; Zaborowski, P. Recent trends in molecular

diagnostics for *Toxoplasma gondii* infections. *Clin Microbiol Infect.* 2005; 11(3):170-76.

Tam JP. Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high density multiple antigen system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1988; 85: 5409.

Tam & Zavala. Multiple antigen peptide: A novel approach to increase detection sensitivity of synthetic peptides in solid-phase immunoassays. *J Immunol Methods.* 1989; 13:53-61.

Tenter, A. M.; Heckeroth, A. R.; Weiss, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol.* 2000; 30(12-13):1217-58.

Terry, R. S.; Smith, J. E.; Duncanson, P.; Hide, G. MGE-PCR: a novel approach to the analysis of *Toxoplasma gondii* strain differentiation using mobile genetic elements. *Int J Parasitol.* 2001; 31(2):155-61.

Torres, C. M. Sur une nouvelle maladie de l'homme, caracterisee par la presence d'une parasite intracellulaire, tres proche de *Toxoplasma* et de l'*Encephalitozoon*, dans le tissu musculaire cardiaque, les muscles du squelette, le tissu cellulaire sous-cutane et le tissu nerveux. *C R Soc Biol.* 1927; 97:1778 –81.

Vaz, A.J.; Guerra, E.M.; Ferrato, L.C.C.; Toledo, L.A.S., Azevedo-Neto, R.S. Sorologia positiva para sífilis, toxoplasmose e doença de chagas em gestantes de

primeira consulta em centros de saúde de área metropolitana, Brasil. *Rev Saúde Pública*. 1990; 24(5): 373 – 79.

Villeneuve, A. Les zoonoses parasitaires. L' infection chez les animaux et chez les hommes . *Les Presses de L'Universite de Montreal*, 2003. 499 p.

Voller, A.; Bidwell, D. E.; Bartlett, A.; Fleck, D. G.; Perkins, M.; Oladehin, B. A microplate enzyme-immunoassay for *Toxoplasma* antibody. *J Clin Pathol*. 1976; 29(2):150-53.

Warnekulasuriya, M.R.; Johnson J.D.; Holliman, R.E. Detection of *Toxoplasma gondii* in cured meats. *Intl J Food Microbiol*. 1998; 45(3): 211 - 15.

Wilson M, Remington JS, Clavet C, Varney G, Press C, Ware D. Evaluation of six commercial kits for detection of human immunoglobulin M antibodies to *Toxoplasma gondii*. The FDA Toxoplasmosis Ad Hoc Working Group. *J Clin Microbiol*. 1997; 35(12):3112-5.

Wolf, A.; Cowen, D. Granulomatous encephalomyelitis due to an encephalitozoon (encephalitozoic encephalomyelitis). A new protozoan disease of man. *Bull Neurol Inst* 1937; 6:306 –71.

Wong SY, Hajdu MP, Ramirez R, Thulliez P, McLeod R, Remington JS. Role of specific immunoglobulin E in diagnosis of acute *Toxoplasma* infection and toxoplasmosis. *J Clin Microb.* 1993; 31: 2952 - 2953.

Xiao Y, Yin J, Jiang N, Xiang M, Hao L, Lu H, Sang H, Liu X, Xu H, Ankarklev J, Lindh J, Chen Q. Seroepidemiology of human *Toxoplasma gondii* infection in China. *BMC Infect Dis.* 2010; 7(10):4-8.

Pra uma definição mais precisa do limiar de reatividade, foram construídas curvas ROC, considerando os pontos de corte estabelecidos com um e dois desvios padrões e o intervalo entre eles, procurando um valor que possibilitasse um aumento na especificidade do teste sem perda significativa da sensibilidade.

A análise da curva ROC foi realizada para cada antígeno peptídico. Para os peptídeos utilizados isoladamente (SAG-1, GRA-1 e GRA-7) para a detecção de anticorpos IgG/IgM e IgA foram descritos em tabela – ponto de corte na D.O., sensibilidade, especificidade e área. Para os peptídeos associados na forma de MAP para a detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA a análise da curva ROC esta demonstrada na figura abaixo:

Curva ROC para os antígenos peptídicos associados na forma de MAPs para a detecção de anticorpos IgG. O ponto indicado representa a densidade óptica de 0,2041 para MAP1, 0,233 para MAP2, 0,238 para MAP3 e 0,229 para MAP4 onde se obtêm máxima sensibilidade e especificidade.

Curva ROC para os antígenos peptídicos associados na forma de MAPs para a detecção de anticorpos IgM. O ponto indicado representa a densidade óptica de 0,158 para MAP1, 0,162 para MAP2, 0,155 para MAP3 e 0,152 para MAP4 onde se obtêm máxima sensibilidade e especificidade.

Curva ROC para os antígenos peptídicos associados na forma de MAPs para a detecção de anticorpos IgA. O ponto indicado representa a densidade óptica de 0,118. para MAP1, 0,121 para MAP2, 0,116 para MAP3 e 0,120 para MAP4 onde se obtêm máxima sensibilidade e especificidade.