UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO

JAQUELINE POLIZELI RODRIGUES

**TESTES FLUORIMÉTRICOS NA SOROLOGIA DA TOXOPLASMOSE
HUMANA: DETECÇÃO CONJUNTA DE ANTICORPOS IgG, IgM E IgA
ANTI- *Toxoplasma gondii* PARA TRIAGEM DE GESTANTES**

Tese apresentada ao Instituto de
Medicina Tropical de São Paulo,
Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais
e Saúde Internacional.

Orientador: Prof. Dr. Heitor Franco de
Andrade Junior

São Paulo

2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO

JAQUELINE POLIZELI RODRIGUES

**TESTES FLUORIMÉTRICOS NA SOROLOGIA DA TOXOPLASMOSE
HUMANA: DETECÇÃO CONJUNTA DE ANTICORPOS IgG, IgM E IgA
ANTI- *Toxoplasma gondii* PARA TRIAGEM DE GESTANTES**

Tese apresentada ao Instituto de
Medicina Tropical de São Paulo,
Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais
e Saúde Internacional.

Orientador: Prof. Dr. Heitor Franco de
Andrade Junior

São Paulo

2018

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo
da Universidade de São Paulo – Bibliotecário Carlos José Quinteiro, CRB-8 5538

© Reprodução autorizada pelo autor

Rodrigues, Jaqueline Polizeli

Testes fluorimétricos na sorologia da toxoplasmose humana: detecção conjunta de anticorpos IgG, IgM e IgA anti-Toxoplasma gondii para a triagem de gestantes / Jaqueline Polizeli Rodrigues. – São Paulo, 2018.

Tese (Doutorado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: Heitor Franco de Andrade Júnior

Descritores: 1. TOXOPLASMA GONDII. 2. IMUNOENSAIO. 3. FLUOROMETRIA. 4. CORANTES FLUORESCENTES. 5. TESTES SOROLÓGICOS. 6. GESTANTES.

USP/IMTSP/BIB-16/2018.

A meus pais: Domingos e Marilene e ao meu irmão Heitor.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Heitor Franco de Andrade Jr.**, obrigada pela orientação, pela oportunidade e por ter me ensinado a importância e o valor da ciência artesanal.

Ao **Programa de Pós-Graduação do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** e a **Universidade de São Paulo**, obrigada pela oportunidade da realização do curso de doutorado.

Ao **Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** e ao **Laboratório de Protozoologia**, obrigada por disponibilizar a infraestrutura para a realização deste trabalho.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001**, pela bolsa de doutorado.

A **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo**, obrigada pela concessão do projeto regular de Fluorimetria (Processo FAPESP número 2013/04676-9) que nos forneceu o suporte de reagentes e equipamentos necessários e essenciais para a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Investigação Médica **LIM49**, pelo suporte ao projeto.

A banca de qualificação: Prof^ª Dra. **Thelma Sueli Okay**, Prof^ª Dra. **Leila Antonangelo** e Prof. Dr. **Nairo Massakazu Sumita**, obrigada pelas contribuições durante a qualificação.

A Dra. **Natalya Zaidan Maluf**, Dra. **Eliane Aparecida Rosseto** e Prof^ª Dra. **Leila Antonangelo** do setor de imunologia da Divisão de Laboratório Central do Hospital

das Clínicas da Universidade de São Paulo (DLC HCFMUSP), pela colaboração com a construção do biorrepositório e a validação do ensaio fluorescente desenvolvido nesse trabalho.

A **Elizama Carneiro Bezerra** e a **Giselle Pacifico Sartori**, obrigada pela colaboração com a construção do biorrepositório.

A **Laura Masami Sumita**, “minha mãe oriental”, obrigada pelo auxílio e incentivo, pela parceria e colaboração nos projetos, pelas palavras amigas, por acreditar no meu potencial e por sempre me incentivar!

Ao Prof. Dr. **Andrés Gimenez Galisteo Jr.**, obrigada pelos ensinamentos, sempre disposto a tirar minhas dúvidas, obrigada pelos almoços no McDonald's, os mais animados! Obrigada pelo apoio ao longo de todos esses anos, pelas correções dos trabalhos e pelas conversas nos momentos difíceis.

A Prof^a. Dra. **Luciana Regina Jaguaribe Ekman**, obrigada pelas orientações nos trabalhos das escolas, feiras científicas e obrigada por todo ensinamento.

Aos funcionários e técnicos do IMT-SP que me acompanharam durante o seguimento deste trabalho: **Roselaine Pereira Alvim Cardoso, Sonia Aparecida dos Anjos Ferraz, Karen Cristine, Monica de Paula Leal**, obrigada pela assistência diária, sem a qual a execução deste trabalho não seria possível, obrigada por toda solidariedade prestada ao longo destes anos.

Em especial ao **Luciano Monteiro da Silva**, obrigada pelo companheirismo, pelo auxílio com os protocolos, planilhas, cotações, além de sempre conseguir nos “salvar” encontrando os reagentes e resolvendo todos os problemas que apareceram pelo caminho, você é muito especial! Obrigada por tudo!

Aos queridos amigos que o IMT proporcionou: **Andrea da Costa, Nahiara Esteves Zorgi, Camila Aparecida de Carvalho, Giselle Pacifico Sartori, Luiz Nali,**

Thiago Fidelis, Alex Nasaré, obrigada pela amizade e carinho, pelo auxílio nos experimentos e principalmente por compartilhar comigo os melhores momentos destes anos. Obrigada por sempre me ouvirem. Obrigada pelo convívio diário com pessoas tão especiais como vocês.

Aos amigos do Tocantins: **Gabriela, Raquel, André, Thompson**, obrigada pelas colaborações, pelos aprendizados e pelas boas conversas.

Aos queridos colegas do IMT-SP: **Bruna Macedo, Barbara Fialho, Talita Caroline, Kaiuan, Beatriz Möller, Sabrina Pugliese, Larissa Festa, Denis Fugitta, Carlos Sabatto, Michelle Evaristo, Flávia Freitas, Norival, Marilda, Ramendra, Licia, Sandra, Jana**, obrigada pelas contribuições no período de realização deste trabalho e pelos bons momentos compartilhados.

Ao meu companheiro e amigo **Adriano Dias de Oliveira**, obrigada pela paciência, por apoiar meus sonhos, pelos conselhos e por todos os maravilhosos momentos ao seu lado.

A **Érika Gracielle Pinto** e a **Joana Gabriela Desiderato**, minhas eternas “Hoomies” do coração, obrigada pelas conversas infinitas que me fizeram tão bem no decorrer dessa jornada do doutorado, obrigada pelos cafés, almoços e jantares, pela energia tão boa que vocês me transmitem, mesmo à distância; e ao **Diego Antônio Perini Milão**, meu amigo querido de longa data, obrigada pelo incentivo, por ouvir meus resultados científicos mesmo não sendo da mesma área, e obrigada pelas corriqueiras brigas, sempre construtivas.

Aos meus queridos amigos da Vila Butantã: **Bruna, Juninho, Adriana, Paulo, Bia, Luciano, Tati, Mauro, Louise, Peter, Podé, Perereca, Flávia, Denise, José, Adeline, Beariz, Lourenço e Amanda**. Obrigada por me acolherem, pelas conversas muitas vezes científicas, pelas risadas (principalmente a da Bia), pelos bons momentos nos almoços, churrascos e jantares, por compartilhar as dores e as delícias da vida.

A Dona **Carmem** e Seu **Joaquim**, que estiveram do meu lado em vários momentos todos esses anos do doutorado, sempre preocupados e carinhosos, me incentivando e dando força para terminar essa jornada.

A toda minha família que sempre torceu pelo meu sucesso, em especial meus avós: **Francisco Luiz Rodrigues, Maria do Carmo Rodrigues e Idalina Polizeli**, obrigada por estarem presentes, pelo apoio, pelas orações e amor.

Ao meu irmão **Heitor**, obrigada por sempre me ouvir, por me dar conselhos (mesmo sendo mais novo), por se mostrar sempre tão meu amigo, obrigada pelo apoio e por acreditar em mim.

Aos meus pais, **Domingos e Marilene**. Não tenho palavras para dizer o quanto vocês são importantes na minha vida e foram essenciais para a realização e conclusão deste doutorado. Sempre acreditaram no meu potencial, me incentivaram, me forneceram todas as condições para que eu alcançasse esse sonho. Não seria nada sem vocês, obrigada por tudo!

A **Deus** e a todas as boas energias que me guiaram neste caminho.

Gostaria de agradecer em especial a **todas as pessoas que aceitaram participar deste trabalho**, obrigada de coração, sem vocês este trabalho não seria possível.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente me ajudaram na realização deste trabalho, **OBRIGADA!**

RESUMO

Rodrigues JP. Testes fluorimétricos na sorologia da toxoplasmose humana: detecção conjunta de anticorpos IgG, IgM e IgA anti- *Toxoplasma gondii* para a triagem de gestantes (tese). São Paulo. Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2018.

A toxoplasmose é uma infecção que pode causar graves lesões fetais quando adquirida durante a gestação. O diagnóstico é sobretudo sorológico e deve ser feito por acompanhamento mensal em gestantes soronegativas, que tem aumentado nos últimos anos. A triagem sorológica para estas gestantes demanda metodologias de alto desempenho e eficiência, que permitam a introdução rápida do tratamento evitando a doença. Para este fim, desenvolvemos um ensaio sorológico fluorescente de fase sólida para a detecção conjunta de IgG, IgM e IgA contra *Toxoplasma gondii* (FISAt). Nosso grupo tem desenvolvido novos testes fluorimétricos de fase sólida com conjugados fluorescentes refinados sensíveis e específicos com possibilidade de detecções simultâneas numa mesma reação. Para a construção do FISAt, foram selecionados e produzidos conjugados marcados com fluorocromos de emissão não interferente, com alta eficiência e similares à reatividade de conjugados comerciais enzimáticos. Esta seleção de conjugados fluorescentes detectados com filtros de excitação e emissão adequados permitiram um aumento da intensidade do sinal de fluorescência e maior discriminação entre soros positivos e negativos. A reação foi realizada com extrato total de *T. gondii* adsorvido em fase sólida e para o controle positivo das reações, utilizamos a adsorção de classes de imunoglobulinas purificadas, evitando o uso de raros soros positivos controles. A validação do FISAt foi feita com 500 amostras de soro em sua maioria gestantes do HCFMUSP previamente analisadas por ensaios comerciais realizados em outro laboratório (Elecsys Toxo IgG/IgM, e IFAT IgM) ou ELISA IgG/IgM/IgA. Comparado com o Elecsys Toxo IgG/IgM, o FISAt IgG mostrou boa concordância ($Kappa=0.77$), com sensibilidade de 76.2% e especificidade de 96.8%, enquanto que o FISAt IgM mostrou boa concordância ($Kappa=0.63$), menor sensibilidade de 62.1% e especificidade de 97.6%. O FISAt foi mais concordante com o ELISA tanto na detecção de IgG, quanto de IgM anti-*T. gondii* ($Kappa>70\%$), com maior sensibilidade de 82% e similar especificidade. E o FISAt IgA obteve excelente concordância com o ELISA ($Kappa=0.77$), com sensibilidade de 92.0% e especificidade de 98.3%. Em comparação com o método confirmatório IFAT IgM, o FISAt IgM mostrou sensibilidade de 100% e especificidade de 94.6%. Das 420 gestantes, 0.7% obtiveram resultado de baixa avidéz de anticorpos IgG anti-*T. gondii* e foram identificadas na triagem como IgG, IgM e/ou IgA positivas em todos os testes avaliados, mostrando a eficiência discriminante do FISAt. O FISAt mostrou excelente reprodutibilidade ($r^2>0.82$) e alto rendimento na triagem de grande número de amostras. Este novo teste múltiplo rápido e de detecção quantitativa pode ser usado em sistemas robóticos e tem uma aplicabilidade essencial para a triagem e tratamento de gestantes em risco de toxoplasmose congênita, ou para outras abordagens diagnósticas de alto volume de amostras.

Descritores: *Toxoplasma gondii*. Testes sorológicos. Imunoensaio. Fluorometria. Corantes fluorescentes. Testes sorológicos. Gestantes.

ABSTRACT

Rodrigues JP. Fluorimetric tests in human toxoplasmosis: simultaneous detection of IgG, IgM and IgA antibodies to *Toxoplasma gondii* for pregnant women screening (tese). São Paulo. Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, 2018.

Toxoplasmosis is an infection that can cause serious fetal damage when obtained during pregnancy. The diagnosis is mainly serological and should be done monthly monitoring seronegative pregnant women, which has increased in recent years. The serological screening for these pregnant women demands high performance and efficiency methodologies which allow the rapid introduction of the treatment avoiding the disease manifestation. With this in mind, our goal was to develop a solid phase fluorescent serological assay for IgG, IgM and IgA detection against *Toxoplasma gondii* (FISAt). Our group has been develop new solid phase fluorimetric assays with sensitive and specific refined fluorescent conjugates with the possibility of simultaneous detection in the same reaction. For the construction of the FISAt, conjugates labeled with non-interfering emission fluorochromes were designed and produced with high efficiency and similar reactivity of enzymatic commercial conjugates. This design of conjugates with suitable filters generated an increase in fluorescence intensity with a higher signal between positives and negatives sera. The reaction was made with total extract of *T. gondii* adsorbed solid phase. Also, for the positive control of the reactions, we have used the adsorption of purified classes of immunoglobulins, avoiding the use of rare positive control sera. FISAt validation was performed with 500 serum samples, mostly from HCFMUSP pregnant women previously analyzed by commercial tests (Elecsys Toxo IgG/IgM, and IFAT IgM) or ELISA IgG/IgM/IgA. In comparison to Elecsys Toxo IgG/IgM, FISAt IgG has shown excellent agreement (Kappa=0.77), with a sensitivity of 76.2% and specificity of 96.8%, whereas IgM FISAt has shown a good agreement (Kappa=0.63), with a lower sensitivity (62.1%) and similar specificity (97.6%). FISAt was more consistent with ELISA in both anti-*T. gondii* IgG and IgM detection (Kappa> 70%), with greater sensitivity (82%) and similar specificity. FISAt IgA obtained excellent agreement with the ELISA (Kappa = 0.77), showing 92.0% of sensitivity and 98.3% of specificity. In comparison with the IFAT IgM confirmatory method, FISAt IgM showed excellent sensitivity of 100% and specificity of 94.6%. Amongst 420 pregnant women, 0.7% had a low avidity anti-*T. gondii* IgG antibody result and were identified in the screening as IgG, IgM and/or IgA positive in all the evaluated tests, showing the discriminant efficiency of the FISAt. FISAt showed excellent reproducibility ($r^2>0.82$) and a great income for high throughput screening. This new rapid and quantitative multiple detection assay can be used in robotic systems and has an essential applicability for screening and treatment of pregnant women at congenital toxoplasmosis risk, as well as for others diagnostic approaches of high volume samples.

Descriptors: *Toxoplasma gondii*. Sorologic tests. Imunoassay. Fluorometry. Fluorescent dyes. Serological tests. Pregnant women.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo de vida do <i>T. gondii</i> no hospedeiro definitivo e intermediário.....	33
Figura 2	Transmissão do <i>T. gondii</i> nos hospedeiros definitivos e intermediários.....	35
Figura 3	Resposta imune celular à infecção por <i>T. gondii</i> . Resumo das interações celulares da resposta imune inata e adaptativa.....	41
Figura 4	Cinética de imunoglobulinas específicas IgG, IgM, IgA e IgE anti- <i>T. gondii</i> após infecção primária. Av. IgG: avides de anticorpos IgG.....	44
Figura 5	Algoritmos para interpretação de resultados e condutas para gestantes antes de 16 semanas de gestação e após 16 semanas de gestação na triagem da toxoplasmose.....	49
Figura 6	Modelos de ensaios fluorimétricos. A : Espectros de emissão de diferentes fluorocromos disponíveis comercialmente. B : técnicas fluorimétricas que utilizam dois fluorocromos no mesmo ensaio. C : Western Blot para detecção de diferentes antígenos na mesma membrana. D : Arranjos líquidos utilizando partículas em citometria de fluxo.....	56
Figura 7	Fluxograma dos participantes do HCFMUSP com pedido de exame para toxoplasmose entre 2013-2016.....	62
Figura 8	Fluxograma de desenvolvimento do ensaio imunofluorescente triplex de fase sólida (FISA triplex) para detecção conjunta de IgG, IgM e IgA anti- <i>T.gondii</i>	64
Figura 9	Espectros de Excitação (linha tracejada) e Emissão (linha contínua e área sombreada) para Alexa Fluor™ 350 (azul), Alexa Fluor™ 488 (verde) e Alexa Fluor™ 647 (vermelho). Imagem modificada a partir de BD <i>fluorescence spectrum viewer</i> , BD <i>biosciences</i>	65
Figura 10	Espectros de Excitação (linha tracejada) e Emissão (linha contínua e área sombreada) para Alexa Fluor™ 350 (azul), Alexa Fluor™ 488 (verde), NHS-Rodamina™ (amarelo) e Alexa Fluor™ 568 (laranja). Imagem modificada a partir de BD <i>fluorescence spectrum viewer</i> , BD <i>biosciences</i>	67
Figura 11	Filtros com diferentes comprimentos de onda de banda passante (BW) para o fluorocromo AF647. Filtro de excitação 595nm BW8nm (A), filtro de excitação 590nm BW 20nm (B) e filtro de excitação de 615nm BW30nm (C). A linha tracejada representa o comprimento de onda de excitação e a linha contínua com área sombreada representa o comprimento de onda de emissão do fluorocromo AF647. Imagem modificada a partir de BD <i>fluorescence spectrum viewer</i> , BD <i>biosciences</i>	71
Figura 12	Filtros de excitação com diferentes comprimentos de onda de banda passante (BW) para o fluorocromo AF568. Filtro de excitação 585nm BW8nm (A), filtro de excitação 565nm	

	BW30nm (B) e filtro de excitação 535nm BW25nm (C). A linha tracejada representa o comprimento de onda de excitação e a linha contínua com área sombreada representa o comprimento de onda de emissão do fluorocromo AF568. Imagem modificada a partir de BD <i>fluorescence spectrum viewer</i> , BD biosciences.....	72
Figura 13	Etapas da realização dos ensaios de fase sólida com detecção enzimática (ELISA) e detecção fluorescente (FISA) para detecção de anticorpos anti- <i>T. gondii</i>	75
Figura 14	Representação esquemática do ensaio fluorescente de fase sólida para detecção de IgG, IgM e IgA anti- <i>T. gondii</i> . Incubação dos conjugados anti-IgM humano AF4647, anti-IgA humano AF488 e anti-IgG humano AF350 (A) Incubação dos conjugados anti-IgG humano AF350, anti-IgM humano AF647 e anti-IgA humano AF488 (B), incubação dos conjugados anti-IgA humano AF488, anti-IgG humano AF350 e anti-IgM humano AF647 e única etapa de incubação dos conjugados (C)	77
Figura 15	Representação esquemática de controles das reações de imunoensaios convencionais (A) com soros positivos (Pos) e soros negativos (Neg) e controles utilizados para a reatividade dos conjugados fluorescentes anti-IgG humano (azul) anti-IgM humano (vermelho) e anti-IgA humano (verde) com concentrações de imunoglobulinas humanas IgG, IgM e de IgA (B)	83
Figura 16	Fluxograma da porcentagem e do número de amostras positivas e negativas para anticorpos IgG, IgM e IgA anti- <i>T. gondii</i> pelos métodos FISAt, ELISA e Elecsys Toxo	166
Figura 17	Algoritmo do FISAt para triagem da toxoplasmose em gestantes.	178

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Seleção do comprimento de onda dos filtros de excitação e emissão utilizados para os fluorocromos AF350, AF647 e AF488. A: Filtro de excitação 350nm com variação de banda (BW) de 35nm e filtro de emissão de 460nm com BW de 35nm. B: Filtro de excitação 595nm com BW de 8nm e emissão 670nm com BW de 40nm. C: Filtro de excitação 485nm com BW de 20nm e emissão de 535nm com BW de 25nm.....	86
Gráfico 2	Análise de Interferência de detecção dos fluorocromos Alexa Fluor 350 (A) Alexa Fluor 647 (B) e Alexa Fluor 488 (C). Detecção dos fluorocromos pelos filtros de Excitação: 360nm, 595nm e 488nm e Emissão: 430nm, 670nm e 535nm.....	88
Gráfico 3	Perfis cromatográficos de exclusão molecular dos anticorpos marcados com fluorocromos em coluna Sephadex G-25-40;10-40μM, sob o fluxo de 1mL por minuto e frações de 1mL. A: Conjugado anti-IgG humano após marcação com AF350. B: Conjugado anti-IgM humano após marcação com AF647. C: Conjugado anti-IgA humano após marcação com AF488.....	90
Gráfico 4	Reatividade em unidades arbitrárias de fluorescência dos conjugados purificados em relação às diferentes concentrações de imunoglobulinas humanas específicas adsorvidas na microplaca. A: conjugado anti-IgG humano AF350. B: conjugado anti-IgM humano AF647. C: Conjugado anti-IgA humano AF488.....	92
Gráfico 5	Comparação da reatividade dos conjugados marcados com peroxidase e fluorescência a partir de concentrações seriadas de imunoglobulina humana específica. A: anti-IgG humano. B: anti-IgM humano. C: anti-IgA humano.....	94
Gráfico 6	Padronização da diluição do conjugado anti-IgG humano marcado com AF350 com AF350 com 4 soros positivos e 2 negativos para anticorpos IgG anti- <i>T. gondii</i> em duplicatas. A: concentração do conjugado 1:100. B: concentração do conjugado 1:200. C: concentração do conjugado 1:400. D: concentração do conjugado 1:800. Diluição 1:100 dos soros positivos (pos 1:100); diluição 1:100 dos soros negativos (neg 1:100); diluição 1:200 dos soros positivos (pos 1:200) e diluição 1:200 dos soros negativos (neg 1:200)	95
Gráfico 7	Padronização da diluição do conjugado anti-IgM humano marcado com AF647 com 4 soros positivos e 2 negativos para anticorpos IgM anti- <i>T. gondii</i> em duplicatas. A: concentração do conjugado 1:100. B: concentração do conjugado 1:200. C: concentração do conjugado 1:400. D: concentração do conjugado 1:800. Diluição 1:100 dos soros positivos (pos 1:100); diluição 1:100 dos soros negativos (neg 1:100); diluição 1:200	

	dos soros positivos (pos 1:200) e diluição 1:200 dos soros negativos (neg 1:200)	96
Gráfico 8	Padronização da diluição do conjugado anti-IgA humano marcado com AF488 com 3 soros positivos e 2 negativos para anticorpos IgA anti- <i>T. gondii</i> em duplicatas. A: concentração do conjugado 1:100. B: concentração do conjugado 1:200. C: concentração do conjugado 1:400. D: concentração do conjugado 1:800. Diluição 1:100 dos soros positivos (pos 1:100); diluição 1:100 dos soros negativos (neg 1:100); diluição 1:200 dos soros positivos (pos 1:200) e diluição 1:200 dos soros negativos (neg 1:200)	97
Gráfico 9	Comparação da reatividade do anti-IgG humano AF350 (A), anti-IgM humano AF647 (B) e anti-IgA humano AF488 (C) no FISAt com todas as condições de adição dos conjugados: Condição isolada (i); incubação dos conjugados anti-IgM humano AF647, anti-IgA humano AF488 e anti-IgG humano AF350 (1); anti-IgG humano AF350, anti-IgM humano AF647 e anti-IgA humano AF488 (2) e anti-IgA humano AF488, anti-IgG humano AF 350 e anti-IgM humano AF647 (3) cada adição seguida de incubação e lavagem; e única etapa de incubação dos conjugados (4). 3 amostras de soro IgG, IgM e IgA positivas (Soros IgG+ IgM+ IgA+); 3 amostras de soro IgG e IgM positivas e IgA negativas (Soros IgG+ IgM+ IgA-); 3 amostras de soro IgG positivas e IgM e IgA negativas (Soros IgG+ IgM- IgA-); 3 amostras de soro IgG, IgM e IgA negativas: a faixa sombreada é a média desses soros negativos em todas as incubações para cada conjugado *p<0.05.....	99
Gráfico 10	Reatividade de amostras de soro na detecção de IgG, IgM e IgA anti- <i>T. gondii</i> pelos conjugados: anti-IgG humano AF350 (quadrado), anti-IgM humano A647 (círculo) e anti-IgA humano AF488 (losango). FISA isolado (símbolo fechado); FISA triplex (símbolo aberto). 3 amostras de soro IgG, IgM e IgA positivas (Soros IgG+ IgM+ IgA+); 7 amostras de soro IgG e IgM positivas e IgA negativas (Soros IgG+ IgM+ IgA-); 5 amostras de soro IgG positivas e IgM e IgA negativas (Soros IgG+ IgM- IgA-); 5 amostras de soro IgG, IgM e IgA negativas (Soros IgG- IgM- IgA-). As interrupções nos eixos separam os soros positivos dos negativos para anticorpos IgG e IgM anti- <i>T. gondii</i> .	100
Gráfico 11	Interferência da leitura de cada amostra de soro no FISA isolado (Isolado) e no FISA triplex (Triplex) para detecção de anticorpos IgG (A), IgM (B) e IgA (C) anti- <i>T. gondii</i> . As interrupções nos eixos separam os soros positivos dos soros negativos para cada anticorpo específico	101
Gráfico 12	FISAt com 1 µg/mL de antígeno. Reatividade das amostras de soro positivas e negativas com o conjugado anti-IgG humano (A), anti-IgM humano (B) e anti-IgA humano (C). 9 amostras de soro IgG positivas e 3 amostras IgG negativas, 6 amostras de	

	soro IgM positivas e 6 amostras IgM negativas e 3 amostras de soro IgA positivas e 9 amostras IgA negativas todas as amostras diluídas nas concentrações de 1:100 (pos 1:100; neg 1:100) e 1:200 (pos 1:200; neg 1:200)	103
Gráfico 13	FISAt com 2 µg/mL de antígeno. Reatividade das amostras de soro positivas e negativas com o conjugado anti-IgG humano (A), anti-IgM humano (B) e anti-IgA humano (C). 9 amostras de soro IgG positivas e 3 amostras IgG negativas, 6 amostras de soro IgM positivas e 3 amostras IgM negativas e 3 amostras de soro IgA positivas e 9 amostras IgA negativas, todas as amostras diluídas nas concentrações de 1:100 (pos 1:100; neg 1:100) e 1:200 (pos 1:200; neg 1:200) e em duplicatas	104
Gráfico 14	FISAt com 3 µg/mL de antígeno. Reatividade das amostras de soro positivas e negativas com o conjugado anti-IgG humano (A), anti-IgM humano (B) e anti-IgA humano (C). 9 amostras de soro IgG positivas e 3 amostras IgG negativas, 6 amostras de soro IgM positivas e 3 amostras IgM negativas e 9 amostras de soro IgA positivas e 3 amostras IgA negativas, todas as amostras diluídas nas concentrações de 1:100 (pos 1:100; neg 1:100) e 1:200 (pos 1:200; neg 1:200) e em duplicatas	105
Gráfico 15	FISAt com 1 µg/mL de antígeno. Reatividade das amostras de soro positivas e negativas com o conjugado anti-IgG humano (A), anti-IgM humano (B) e anti-IgA humano (C). 9 amostras de soro IgG positivas e 3 amostras IgG negativas, 6 amostras de soro IgM positivas e 3 amostras IgM negativas e 3 amostras de soro IgA positivas e 3 amostras IgA negativas, todas as amostras diluídas nas concentrações de 1:100 (pos 1:100; neg 1:100) e 1:200 (pos 1:200; neg 1:200) e em duplicatas	106
Gráfico 16	Ensaio imunofluorescente triplex com 2µg/mL de antígeno. Reatividade das amostras de soro positivas e negativas com o conjugado anti-IgG humano (A), anti-IgM humano (B) e anti-IgA humano (C). 9 amostras de soro IgG positivas e 3 amostras IgG negativas, 6 amostras de soro IgM positivas e 3 amostras IgM negativas e 3 amostras de soro IgA positivas e 3 amostras IgA negativas, todas as amostras diluídas nas concentrações de 1:100 (pos 1:100; neg 1:100) e 1:200 (pos 1:200; neg 1:200) e em duplicatas	107
Gráfico 17	Ensaio imunofluorescente triplex com 3 µg/mL de antígeno. Reatividade das amostras de soro positivas e negativas com o conjugado anti-IgG humano (A), anti-IgM humano (B) e anti-IgA humano (C). 9 amostras de soro IgG positivas e 3 amostras IgG negativas, 6 amostras de soro IgM positivas e 3 amostras IgM negativas e 3 amostras de soro IgA positivas e 3 amostras IgA negativas, todas as amostras diluídas nas concentrações de 1:100 (pos 1:100; neg 1:100) e 1:200 (pos 1:200; neg 1:200) e em duplicatas	109

Gráfico 18	Discriminação entre soros positivos e negativos para anticorpos anti- <i>T. gondii</i> . Comparação entre o menor valor em unidades arbitrárias de fluorescência (u.a.) da reatividade de uma amostra de soro positiva e maior valor de fluorescência de uma amostra de soro negativa entre os soros controles detectados pelos conjugados marcados com AF350, AF488 e AF647	111
Gráfico 19	Comparação da reatividade do anti-IgM humano marcado com AF647 em 3 conjugações diferentes concentrações seriadas de imunoglobulina M humana (A). Reatividade de amostras de soro positivas e negativas para anticorpos IgM anti- <i>T. gondii</i> com conjugados marcados por diferentes metodologias. Soros IgM positivos (Conj 1 pos) e IgM negativos (Conj 1 neg) detectados pelo conjugado obtido da primeira metodologia descrita, baseada no excesso molar. Soros IgM positivos (Conj 2 pos) e IgM negativos (Conj 2 neg) detectados pelo conjugado obtido da segunda metodologia realizada, baseada na ótima proporção molar F/P (B)	112
Gráfico 20	Detecção do fluorocromo NHS-Rodamine® pelos filtros de Excitação: 360nm, 595nm, 488nm e 595nm e Emissão: 430nm, 670nm e 535nm e 670nm	113
Gráfico 21	Diferença da reatividade do conjugado anti-IgM humano AF647 e do conjugado anti-IgM humano NHS-Rodamina na detecção de amostras positivas e negativas em duplicatas para anticorpos IgM anti- <i>T. gondii</i> no FISA. Soros IgM positivos detectados pelo AF647 (AF647 pos). Soros IgM negativos detectados pelo AF647 (AF647 neg). Soros IgM positivos detectados pelo NHS-Rodamina (NHS-Rod pos). Soros IgM negativos detectados pelo NHS-Rodamina (NHS-Rod neg)	114
Gráfico 22	Interferência dos comprimentos de onda dos filtros testados para excitação do AF647 (A). Comprimento de onda do filtro de excitação 590nm com variação da banda passante (BW) de 20nm e do filtro de emissão 670nm com variação da BW de 40nm (B).	116
Gráfico 23	Detecção dos fluorocromos Alexa Fluor 488®, Alexa Fluor 350 e Alexa Fluor 647 pelos filtros de excitação 590nm BW20nm e emissão 670nm (A). Fluorescência do Alexa Fluor 647® detectada pelo filtro de excitação 595nm BW 8nm e 590nm BW 20nm (B)	117
Gráfico 24	Diferença da reatividade do conjugado anti-IgM humano AF647 na detecção de amostras positivas e negativas em duplicatas para anticorpos IgM anti- <i>T. gondii</i> no FISA triplex. Soros IgM positivos detectados pelo filtro de excitação padronizar 595nm BW8nm (Ex 595.8 pos). Soros IgM negativos detectados pelo filtro de Excitação 595nm BW 8nm (Ex 595.8 neg). Soros IgM positivos detectados pelo filtro de Excitação 590nm BW 20nm (Ex 590.20 pos). Soros IgM negativos detectados pelo filtro de Excitação 590nm BW 20nm (Ex 590 neg)	118

Gráfico 25	Interferência dos filtros de excitação para o fluorocromo AF568 no filtro de emissão (A). Comprimento de onda dos filtros de excitação 535nm com variação da banda passante (BW) de 25nm e 585nm com BW de 8nm e do filtro de emissão 595nm com variação da BW de 35nm (B)	119
Gráfico 26	Intensidade de fluorescência do Alexa Fluor 568 [®] detectada pelo filtro de excitação outros fluorocromos (A). Intensidade de fluorescência do AF568 detectada pelos filtros de excitação 585nm BW8nm e 535nm BW25nm, ambos com emissão 595nm (B)	120
Gráfico 27	Diferença da reatividade do conjugado anti-IgM humano AF647 e do conjugado anti-IgM humano AF568 na detecção de amostras positivas e negativas em duplicatas para anticorpos IgM anti- <i>T. gondii</i> . Soros IgM positivos detectados pelo AF647 (AF647 pos). Soros IgM negativos detectados pelo AF647 (AF647 neg). Soros IgM positivos detectados pelo AF568 (AF568 pos). Soros IgM negativos detectados pelo AF568 (AF568 neg)	121
Gráfico 28	FISAt em microplacas de 384 poços com 3 µg/mL de antígeno. Reatividade das amostras de soro positivas e negativas com o conjugado anti-IgG humano (A), anti-IgM humano (B) e anti-IgA humano (C). 8 amostras de soro IgG, IgM e IgA positivas (pos) e 8 amostras IgG, IgM e IgA negativas (neg) em duplicatas.	123
Gráfico 29	FISAt em microplacas de 384 poços com 6 µg/mL de antígeno. Reatividade das amostras de soro positivas e negativas com o conjugado anti-IgG humano (A), anti-IgM humano (B) e anti-IgA humano (C). 8 amostras de soro IgG, IgM e IgA positivas (pos) e 8 amostras IgG, IgM e IgA negativas (neg) em duplicatas.	124
Gráfico 30	FISAt em microplacas de 384 poços com 12 µg/mL de antígeno. Reatividade das amostras de soro positivas e negativas com o conjugado anti-IgG humano (A), anti-IgM humano (B) e anti-IgA humano (C). 8 amostras de soro IgG, IgM e IgA positivas (pos) e 8 amostras IgG, IgM e IgA negativas (neg) em duplicatas.	125
Gráfico 31	FISAt em microplacas de 96 poços com 10 µg/mL de antígeno. Reatividade das amostras de soro positivas e negativas com o conjugado anti-IgG humano (A), anti-IgM humano (B) e anti-IgA humano (C). 8 amostras de soro IgG, IgM e IgA positivas (pos) e 8 amostras IgG, IgM e IgA negativas (neg) em duplicatas.	126
Gráfico 32	Comparação dos Lotes de conjugados produzidos (LOTE 1 e 2) a partir da análise da reatividade de amostras de soro positivas e negativas e regressão linear para anticorpos IgG (A e D), IgM (B e E) e IgA (C e F) anti- <i>T. gondii</i>	128
Gráfico 33	Reatividade em unidades arbitrárias de fluorescência de imunoglobulinas IgG, IgM e IgA pelos conjugados anti-IgG humano AF350 (A), anti-IgM humano AF647 (B) e anti-IgA humano AF488 (C) logo após marcação (Ensaio 1) e após 18 meses da marcação dos anticorpos secundários (Ensaio 2)	130

Gráfico 34	Reatividade em unidades arbitrárias de fluorescência de amostras positivas e negativas pelos conjugados anti-IgG humano AF350 (A), anti-IgM humano AF647 (B) e anti-IgA humano AF488 (C). Amostras positivas (IgG pos, IgM pos e IgA pos) e negativas (IgG neg, IgM neg e IgA neg) detectadas pelos conjugados fluorescentes logo após marcação e purificação dos fluorocromos e amostras positivas (IgGap pos IgMap pos e IgAap pos) e negativas (IgGap neg, IgMap neg e IgAap neg) detectadas pelos conjugados fluorescentes após 1 ano de marcação dos fluorocromos	131
Gráfico 35	Reatividade em unidades arbitrárias de fluorescência de imunoglobulinas IgG, IgM e IgA pelos conjugados anti-IgG humano AF350 (A), anti-IgM humano AF647 (B) e anti-IgA humano AF488 (C) após reação finalizada 0h (símbolo redondo fechado) e com leituras após 2h (símbolo redondo aberto), 4h (símbolo quadrado fechado) e 24h (símbolo quadrado aberto).....	132
Gráfico 36	Comparação entre a média das leituras da reatividade de 40 amostras de soro avaliadas pelo FISA triplex. FISAt para detecção de anticorpos IgG anti- <i>T. gondii</i> (A). FISAt para detecção de anticorpos IgM anti- <i>T. gondii</i> (B) e FISAt para detecção de anticorpos IgA anti- <i>T. gondii</i>	134
Gráfico 37	Distribuição dos valores em unidades arbitrárias de fluorescência da reatividade de amostras positiva (símbolo fechado: IgG+, IgM+ e IgA+) e negativa (símbolo aberto: IgG-, IgM- e IgA-) para IgG, IgM e IgA anti- <i>T. gondii</i> para análise da repetitividade no FISAt. A interrupção nos eixos foi feita para melhor visualizar a distribuição dos valores da amostra negativa	135
Gráfico 38	Controle dos conjugados fluorescentes com diferentes concentrações de imunoglobulinas adsorvidas na microplaca. Reatividade do conjugado anti-IgG AF350 humano à IgG adsorvida (A). Reatividade do conjugado anti-IgM humano à IgM AF647 adsorvida nas microplacas (B). Reatividade do conjugado anti-IgA humano AF488 à IgA adsorvida nas microplacas (C)	137
Gráfico 39	Perfil de exatidão de controles positivos (A) e negativos (B) a partir da relação entre o valor em unidades arbitrárias de fluorescência da reatividade do conjugado anti-IgG humano AF350 pelo valor do controle de cada placa de imunoensaio (UFA/CO) em 15 ensaios diferentes durante 15 dias	139
Gráfico 40	Perfil de exatidão dos controles positivos (A) e negativos (B) a partir da relação entre o valor de unidades arbitrárias de fluorescência da reatividade do conjugado anti-IgM humano AF647 pelo valor do controle de cada placa de imunoensaio (UFA/CO) em 15 ensaios diferentes durante 15 dias	140
Gráfico 41	Perfil de exatidão dos controles positivos (A) e negativos (B) a partir da relação entre o valor de unidades arbitrárias de fluorescência da reatividade do conjugado anti-IgA humano	

	AF488 pelo valor do controle de cada placa de imunoensaio (UFA/CO) em 15 ensaios diferentes durante 15 dias	141
Gráfico 42	Comparação da reatividade de 500 amostras de soro pelo FISAt e pelos métodos Elecsys Toxo para detecção de IgG (A), e análise pela curva ROC para discriminação de anticorpos IgG anti- <i>T. gondii</i> no FISAt (B). A interrupção nos eixos indica o <i>cut-off</i> dos ensaios	144
Gráfico 43	Comparação da reatividade de 500 amostras de soro pelo FISAt e pelos métodos Elecsys Toxo para detecção de IgM (A), e análise pela curva ROC para discriminação de anticorpos IgM anti- <i>T. gondii</i> no FISAt (B). A interrupção nos eixos indica o <i>cut-off</i> dos ensaios	145
Gráfico 44	Discriminação das amostras IgM anti- <i>T. gondii</i> a partir da comparação do método confirmatório IFAT IgM pela análise da curva ROC	148
Gráfico 45	Comparação da reatividade de 500 amostras de soro pelo FISAt e pelo método de ELISA para detecção de anticorpos IgG anti- <i>T. gondii</i> . A interrupção nos eixos indica o <i>cut-off</i> de cada ensaio (A). Análise pela curva ROC para discriminação de anticorpos IgG anti- <i>T. gondii</i> no FISAt (B)	151
Gráfico 46	Comparação da reatividade de 500 amostras de soro pelo FISAt e pelo método de ELISA para detecção de anticorpos IgM anti- <i>T. gondii</i> . A interrupção nos eixos indica o <i>cut-off</i> de cada ensaio (A). Análise pela curva ROC para discriminação de anticorpos IgM anti- <i>T. gondii</i> no FISAt (B)	152
Gráfico 47	Comparação da reatividade de 500 amostras de soro pelo FISAt e pelos métodos Elecsys Toxo para detecção de IgA (A), e análise pela curva ROC para discriminação de anticorpos IgA anti- <i>T. gondii</i> no FISAt (B). A interrupção nos eixos indica o <i>cut-off</i> dos ensaios	153
Gráfico 48	Amostras de soro positivas para IgG e IgM anti- <i>T. gondii</i> avaliadas pelo Elecsys Toxo, ELISA e FISAt entre 2013-2016, de acordo com a faixa etária dos participantes	157
Gráfico 49	Reatividade quantitativa dos imunoensaios Elecsys Toxo (símbolo fechado), FISAt (símbolo aberto) e ELISA (símbolo semi-aberto) para detecção de anticorpos IgG (A), IgM (B) e IgA (C) anti- <i>T. gondii</i> em 80 amostras de soro de participantes do HCFMUSP e para detecção de IgG (D), IgM (E) e IgA (F) em 420 amostras de gestantes. As interrupções nos eixos indicam o <i>cut-off</i> dos ensaios	159
Gráfico 50	Avidez de anticorpos IgG, IgM e IgA das amostras que foram positivas na detecção de anticorpos IgM anti- <i>T. gondii</i> pelo método comercial Elecsys Toxo e/ou pelo ELISA e/ou pelo FISAt	161
Gráfico 51	Índices de reatividade (IR) e unidades internacionais (UI/mL) em média de IgG (A), IgM (B) e IgA (C) anti- <i>T. gondii</i> pelo FISAt, ELISA e Elecsys Toxo de amostras com perfil de avidez de	

	anticorpos IgG anti- <i>T. gondii</i> baixo (<30%) e inconclusivo (30%<50% em preto) ou alto (>50% em cinza). ***p<0.001 e **p<0.01	163
Gráfico 52	Índice de reatividade (IR) em média de IgA anti- <i>T. gondii</i> pelo ELISA e FISAt de amostras com perfil de avidéz de ancorpos IgA anti- <i>T. gondii</i> <50% (cinza) e >50% (sem cor). *p<0.05	164

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características de alguns testes comerciais utilizados na triagem da toxoplasmose humana.....	47
Tabela 2	Características dos fluorocromos utilizados para marcação dos anticorpos secundários.....	69
Tabela 3	Construção do FISA para detecção de IgG, IgM e IgA anti- <i>T.gondii</i> : concentrações de antígeno, bloqueio, soro e conjugados em placas de 96 e 384 poços e padronização da marcação de fluorocromos.....	76
Tabela 4	Índices de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo do FISA triplex em 500 amostras de adultos participantes do HCFMUSP avaliados pela comparação com os métodos Elecsys Toxo IgG/IgM	142
Tabela 5	Valores do <i>cut-off</i> e características da análise da curva ROC para a detecção de IgG e IgM anti- <i>T. gondii</i>	146
Tabela 6	Índices de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo do FISAt IgM em 500 amostras avaliados pela comparação com o método confirmatório IFAT IgM	147
Tabela 7	Índices de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo do FISAt IgG/IgM/IgA em 500 amostras de soro avaliados pela comparação com o ELISA IgG/IgM/IgA.	149
Tabela 8	Valores do <i>cut-off</i> e características da análise da curva ROC para a detecção de IgG, IgM e IgA anti- <i>T. gondii</i>	154
Tabela 9	Índices de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo do FISA triplex nas amostras que foram positivas para anticorpos IgG e IgM anti- <i>T. gondii</i> pelos dois métodos, Elecsys Toxo e ELISA	155

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABS U+	Absorbância com ureia
ABS U-	Absorbância sem ureia
AF	Alexa Fluor [®]
AgTg	Antígeno de <i>Toxoplasma gondii</i>
AMA	Apical Membrane Antigen (Antígeno de membrana apical)
APC	Allophycocyanin (Aloficocianina)
APC	Antigen Presenting Cells (Células apresentadoras de antígeno)
Células NK	Células <i>natural killer</i>
BSA	Bovine Serum Albumin (Albumina Bovina Sérica)
BW	Bandwidth (Banda passante)
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CBA	Cytometric Bead Array (Citometria com micropartículas em arranjo líquido)
CEP-IMT	Comissão de Pesquisa e Ética do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo
CF	Fator de correlação
CIA	Chemiluminescence Immunoassay (Imunensaio quimioluminescente)
CMIA	Chemiluminescence Microparticle Immunoassay (Imunensaio quimioluminescente em micropartículas)
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação animal
CO ₂	Gás carbônico
CV	Coefficiente de Variação
Cy	Cyanine (Cianina)

Cut off	Ponto de corte ou limiar de positividade do ensaio
DLC	Divisão de Laboratório Central
DNA	Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)
DMF	N,N-dimetilformamide (dimetilformamida)
DOL	Degree Of Labeling (Grau de marcação)
ECLIA	Electrochemiluminescence Immunoassay (Imunensaio eletroquimioluminescente)
ELFA	Enzyme-Linked Fluorescent Assay (Ensaio fluorescente por ligação enzimática)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Ensaio de imunoabsorção por ligação enzimática)
Sp	Especificidade
Em	Emissão
Ex	Excitação
FISA	Fluorescent Immunosorbent Solid-phase Assay (Ensaio fluorescente de fase sólida)
FITC	Fluorescein Isothiocyanate (Isotiocianato de fluoresceína)
F/P	Taxa média molar da quantidade de fluorocromo por molécula de proteína (<i>Fluorescein/Protein</i>)
GRA	Dense Granule Antigen (Antígeno do Grânulo Denso do <i>Toxoplasma gondii</i>)
H	Hidrogênio
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo
HCL	Ácido clorídrico
HIV	Human Immunodeficiency Virus (Vírus da imunodeficiência humana)
IA	Índice de Avidéz

IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Intervalo de confiança
IR	Índice de reatividade
IFAT	Indirect Fluorescent Antibody Test (Teste de Imunofluorescência Indireta de anticorpos)
IFN γ	Interferon gama
IgA	Immunoglobulin A (Imunoglobulina de classe A)
IgD	Immunoglobulin D (Imunoglobulina de classe D)
IgE	Immunoglobulin E (Imunoglobulina de classe E)
IgG	Immunoglobulin G (Imunoglobulina de classe G)
IgM	Immunoglobulin M (Imunoglobulina de classe M)
IL-12	Interleukin 12 (Interleucina 12)
IMTSP	Instituto de Medicina Tropical de São Paulo
ISAGA	Imunosorbent Agglutination Assay (Ensaio de aglutinação por imunoabsorção)
K	Kappa
LIM	Laboratório de Investigação Médica
MAPS	Multiple Antigenic Peptides (Múltiplos peptídeos antigênicos)
MEIA	Microparticle Enzyme Immunoassay (Ensaio imunoenzimático em micropartículas)
MICs	Microneme proteins (proteínas dos micronemas do <i>Toxoplasma gondii</i>)
MHCII	Major Histocompatibility Complex class II (Complexo principal de histocompatibilidade classe II)
NaCL	Cloreto de sódio
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio

R-NH ₂	Radical amina primária
NHS-ester	N-hydroxysuccinimide ester
NHS-Fluorescein	5-(and 6)-carboxyfluorescein, succinimidyl ester
NHS-Rhodamine	5-(and 6)-carboxytetramethylrhodamine, succinimidyl ester
NHS-350	Succinimidyl ester 350
NHS-568	Succinimidyl ester 568
NHS-790	Succinimidyl ester 790
NK	Células <i>Natural Killer</i>
NO	Óxido nítrico
NS	Não significativo
PBS	Phosphate buffered saline (Tampão fosfato salina)
PBSTA	Phosphate buffered saline plus Tween20 plus Albumin (Tampão fosfato salina com detergente Tween20 e Albumina)
PBSTL	Phosphate buffered saline plus Tween20 plus Leite Molico (Tampão fosfato salina com detergente Tween20 e Leite Molico)
PLL	Poly-L-Lysine
PLLf	Poly-L-Lysine-Fluorocromo
PCR	Polymerase chain reaction (Reação em cadeia da Polimerase)
PE	Phycoerythrin (Ficoeritrina)
ROC	Receiver Operating Characteristic (Característica de Operação do Receptor)
RON	Rhoptry Neck Protein (Proteína do colo da roptria)
ROP	Rhoptry Protein (Proteína da roptria)
ROS	Reactive oxygen species (Espécies reativas de oxigênio)
SAG	Surface Antigen (Antígeno de superfície)

Se	Sensibilidade
SRS	Superfice Related Sequence (Sequências relacionadas com antígenos de superfície)
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
u.a.f.	Unidades arbitrárias de fluorescência
UI	Unidades Internacionais
UV	Ultravioleta
VPP	Valor Preditivo Positivo
VPN	Valor Preditivo Negativo
WB	Western Blot

SUMÁRIO

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	31
1.1 Toxoplasmose e <i>Toxoplasma gondii</i>	31
1.1.1 Ciclo de vida do <i>T. gondii</i>	32
1.1.2 Transmissão e prevalência da toxoplasmose.....	34
1.2 Manifestações clínicas da toxoplasmose.....	37
1.2.1 Toxoplasmose em imunocompetentes e imunodeprimidos.....	37
1.2.2 Toxoplasmose congênita.....	38
1.3 Resposta imunológica ao <i>T. gondii</i>	40
1.4 Diagnóstico.....	42
1.4.1 Diagnóstico laboratorial da toxoplasmose.....	42
1.4.2 Cinética da resposta de anticorpos e interpretação do diagnóstico sorológico.....	43
1.4.3 Diagnóstico da toxoplasmose congênita.....	47
1.4.4 Evolução temporal dos métodos sorológicos para o diagnóstico da toxoplasmose e suas consequências.....	51
1.4.5 Métodos fluorescentes multiplex no diagnóstico da toxoplasmose.....	53
2 JUSTIFICATIVA.....	57
3 OBJETIVOS.....	58
3.1 Geral.....	58
3.2 Específicos.....	58
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	60
4.1 Animais e antígenos.....	60
4.1.1 Animais	60
4.1.2 Antígeno.....	60
4.1.2.1 Obtenção de extrato total de <i>T. gondii</i>	60
4.2 Considerações Éticas.....	61
4.3 Caracterização das amostras de soro.....	61
4.4 Etapas do desenvolvimento do FISAt.....	63
4.5 Ensaio pré-analítico.....	65

4.5.1 Seleção dos fluorocromos da linha Alexa Fluor®	65
4.5.2 Marcação dos anticorpos secundários com fluorocromos.....	65
4.5.3 Purificação dos conjugados marcados.....	68
4.5.3.1 Determinação da média molar da quantidade de fluorocromo por anticorpo (F/P)	69
4.5.4 Padronização dos filtros de excitação para os fluorocromos AF647 e AF568 para uso em ensaios fluorescentes de fase sólida.....	70
4.5.5 Obtenção de IgG, IgM e IgA humana para controle das reações fluorescentes.....	73
4.5.6 Ensaio enzimático (ELISA) e fluorescente (FISA) de fase-sólida para comparação dos conjugados fluorescentes produzidos e conjugados peroxidase comerciais.....	73
4.5.7 Ensaio Fluorescente de fase-sólida isolado e triplex para detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA anti- <i>T. gondii</i>	74
4.6 Ensaios analíticos.....	78
4.6.1 Ensaios para avaliar a Sensibilidade, Especificidade, Valor Preditivo Positivo e Valor Preditivo Negativo e concordância Kappa.....	78
4.6.2 Ensaio fluorescente triplex para detecção simultânea de IgG, IgM e IgA anti- <i>T. gondii</i>	78
4.6.3 Ensaio Imunoenzimático de fase-sólida (ELISA) e ELISA de avidéz para IgG, IgM e IgA anti- <i>T. gondii</i>	79
4.6.4 Determinação do cut-off no ELISA e no FISAt para detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA anti- <i>T. gondii</i>	80
4.6.5 Ensaios de estabilidade dos conjugados marcados com fluorocromos.	81
4.6.6 Ensaio de reprodutibilidade.....	81
4.6.7 Ensaios de repetitividade.....	81
4.6.7.1 Amostras de soro.....	82
4.6.7.2 Imunoglobulinas humanas IgG, IgM e IgA.....	82
4.7 Controle de qualidade interno do FISAt.....	84
4.8 Análise estatística.....	84
5 RESULTADOS.....	85

5.1 Ensaios pré-analíticos: construção do FISAt.....	85
5.1.1 Caracterização dos conjugados fluorescentes.....	85
5.1.2 Purificação dos anticorpos marcados com fluorocromos.....	89
5.1.3 Análise da eficiência dos conjugados anti-IgG humano AF350, anti-IgM humano AF647 e anti-IgA humano AF488 com diferentes concentrações de imunoglobulinas de classe IgG, IgM e IgA comerciais.....	91
5.1.4 Comparação entre a reatividade do conjugado comercial peroxidase e o conjugado marcado com fluorocromos em relação às imunoglobulinas comerciais.....	93
5.1.5 Padronização da concentração de soro e conjugados no FISA isolado.	95
5.1.6 Padronização da ordem de adição dos conjugados fluorescentes no FISAt.....	98
5.1.7 Padronização da concentração de antígeno e proteína de bloqueio no FISA triplex em placas de 384 poços.....	102
5.1.7.1 Bloqueio com leite.....	102
5.1.7.2 Bloqueio com albumina bovina (BSA)	105
5.1.8 Padronização da concentração de fluorocromo AF647 marcado em anti-IgM humano para aumento da intensidade do sinal de fluorescência.....	110
5.1.9 Padronização dos filtros de excitação de fluorocromos para uso em ensaios fluorescentes de fase sólida.....	115
5.1.10 Reavaliação da leitura em unidades arbitrárias de fluorescência da reatividade de amostras de soro positivas e negativas para anticorpos IgG, IgM e IgA anti- <i>T. gondii</i> no FISA triplex nas placas de 384 poços.....	122
5.1.11 Comparação entre a reatividade de amostras de soro positivas e negativas para IgG, IgM e IgA anti- <i>T. gondii</i> no FISAt pelos dois lotes de conjugados fluorescentes produzidos.....	126
5.2 Ensaios analíticos: validação do FISAt.....	129
5.2.1 Estabilidade dos conjugados anti-IgG AF350, anti-IgM aF647 e anti-IgA AF488.....	129
5.2.2 Reprodutibilidade do FISAt.....	133
5.2.3 Repetitividade.....	135

5.2.3.1 Amostras de soro.....	135
5.2.3.2 Imunoglobulinas IgG, IgM e IgA humanas purificadas.....	136
5.2.4 Controle interno de qualidade do ensaio fluorescente de fase sólida para detecção simultânea de IgG, IgM e IgA anti- <i>T. gondii</i>	138
5.2.5 Análise de concordância do ensaio fluorescente triplex de fase sólida pela comparação dos valores obtidos no teste comercial Elecsys IgG/IgM....	142
5.2.6 Análise de concordância do ensaio fluorescente triplex de fase sólida pela comparação dos valores obtidos no ELISA IgG/IgM/IgA.....	148
5.3 Aplicação do FISAt.....	156
5.3.1 Amostras positivas para IgG, IgM e IgA anti- <i>T. gondii</i> pelos testes FISAt, ELISA e Elecsys de acordo com a idade de 500 participantes do HCMUSP.....	156
5.3.2 Reatividade quantitativa dos imunoenaios Elecsys Toxo, FISAt e ELISA para a detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA anti- <i>T. gondii</i> em 500 amostras de participantes do HCFMUSP.....	158
5.3.3 Avidéz de anticorpos IgG, IgM e IgA anti- <i>T. gondii</i> e correlação com os valores de IgG, IgM e IgA obtidos no ELISA, FISAt e Elecsys Toxo.....	160
5.3.4 Perfil de amostras positivas e negativas para anticorpos IgG, IgM e IgA anti- <i>T. gondii</i> pelo Elecsys Toxo, FISAt e ELISA.....	165
6 DISCUSSÃO.....	167
7 CONCLUSÕES.....	180
7.1 Geral.....	180
7.2 Específicas.....	180
8 REFERÊNCIAS.....	182
ANEXOS.....	203

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Toxoplasmose e *Toxoplasma gondii*

A toxoplasmose é uma doença amplamente disseminada não apenas em humanos, como também nas demais espécies de animais homeotermos¹. Estudos relatam que mais de um terço da população humana mundial tenha sido exposta ao *T. gondii* em algum estágio da vida². O agente etiológico da toxoplasmose é o *Toxoplasma gondii*, parasita intracelular obrigatório, descrito pela primeira vez em 1908 por Nicolle e Manceaux³ na Tunísia, em células do baço e do fígado de um roedor, o *Ctenodactylus gundi* e por Splendore⁴ no Brasil, em isolados de coelhos.

O *T. gondii* pertence ao filo Apicomplexa representado por inúmeros protozoários patogênicos de relevância médica e veterinária, que apresentam como característica uma estrutura denominada complexo apical, importante para os mecanismos de adesão e invasão do parasita na célula hospedeira⁵. Além de apresentarem diversas estruturas comuns às demais células animais, como mitocôndria, retículo endoplasmático e complexo de golgi, esses parasitas também apresentam estruturas características do filo, como anéis polares e conóide, que são elementos do citoesqueleto, e organelas secretórias especializadas: os micronemas, rôptrias e grânulos densos⁶.

Os micronemas secretam proteínas (MICs) envolvidas no processo de reconhecimento e adesão inicial do *T. gondii*, como o antígeno de membrana apical 1 (AMA1), uma proteína transmembrana secretada dos micronemas na superfície do parasita e que participa da formação da junção móvel, uma região entre as membranas plasmáticas do parasita e da célula hospedeira que é muito importante para a etapa seguinte, a invasão⁷.

As rôptrias são organelas que contêm dois tipos de proteínas caracterizadas a partir de sua localização: ROPs encontradas na porção basal e as RONs presentes no colo da organela e secretadas logo após as proteínas do micronema⁸. No processo de invasão, a RON2 se liga à AMA1 e a outras proteínas secretadas na porção basal das rôptrias e é por meio dessas ligações que se forma uma âncora pela qual o parasita

exerce força durante a internalização⁷. Após a invasão, ocorre a formação do vacúolo parasitóforo que evita a fusão com os elementos das vias endocíticas e exocíticas da célula hospedeira⁹.

As proteínas dos grânulos densos (GRAs) são secretadas após o término do processo de entrada do parasita durante a fase intracelular de seu ciclo de vida e são encontradas na membrana do vacúolo parasitóforo e na rede intravacuolar onde desempenham um papel fundamental na replicação e patogênese do *T. gondii*¹⁰.

Todas essas proteínas secretadas no processo de invasão e após invasão e as proteínas de superfície do parasita, como a SAG1, são muito importantes por serem antigênicas e imunogênicas e têm sido amplamente utilizadas em testes sorológicos para detecção de anticorpos anti-*T. gondii* e na produção de vacinas^{11,12}.

1.1.1 Ciclo de vida do *T. gondii*

O ciclo de vida do *T. gondii* é complexo e heteroxênico, com fases proliferativas e latentes, caracterizado por uma fase assexuada ou extra intestinal e uma fase sexuada ou enteroepitelial (Figura 1). A fase assexuada ocorre nos hospedeiros intermediários que são os mamíferos, incluindo o homem, ou as aves, e a fase sexuada ocorre nos felídeos, hospedeiros definitivos do *T. gondii*¹³.

O parasita em sua forma de taquizoíto, penetra ativamente nas células nucleadas do hospedeiro intermediário, forma um vacúolo parasitóforo e se multiplica exponencialmente por endodiogenia até romperem essas células e serem liberados na corrente sanguínea, caracterizando a fase aguda da doença¹⁴.

Após invadir as células, os taquizoítos desenvolvem uma cápsula cística com dupla membrana elástica resistente contendo quitina e glicoproteínas na parede do vacúolo parasitóforo, e se diferenciam em uma forma com metabolismo mais lento, os bradizoítos que, pela constante resposta imunológica, permanecem no interior do cisto sem ocasionar sintomatologia no hospedeiro¹⁵. Essa imunidade impede a progressão da infecção e o desenvolvimento de novas lesões, porém não erradica os cistos já existentes encontrados em vários tecidos, como o tecido muscular e nervoso¹⁶.

Indivíduos com HIV ou transplantados que apresentam comprometimento do sistema imunológico podem sofrer uma reativação da infecção pelo *T. gondii*, resultando no rompimento dos cistos e liberação dos bradizoítos, que se diferenciam novamente em taquizoítos podendo causar uma infecção local ou disseminada¹⁷.

Figura 1 - Ciclo de vida do *T. gondii* no hospedeiro definitivo e intermediário¹⁸.

Na fase sexuada, os taquizoítos se diferenciam em gametócitos masculinos e femininos no interior dos enterócitos, onde ocorre a fecundação e formação do zigoto¹³. Este evoluirá dentro do epitélio intestinal formando uma parede externa dupla resistente às condições adversas do meio ambiente, o oocisto, que será liberado ainda imaturo até o meio externo junto com as fezes dos felídeos. Após cinco dias em contato com o solo e o oxigênio do ambiente e em condições ótimas de temperatura e umidade, ocorrerá a esporulação dos oocistos contendo dois esporocistos elipsoidais com quatro esporozoítos cada, os quais se tornam infectantes aos seus hospedeiros

intermediários¹⁹. Após ingestão dos oocistos pelos hospedeiros definitivos, os bradizoítos ou os esporozoítos liberados da digestão do cisto ou do oocisto respectivamente, e após a diferenciação de sua forma em taquizoítos, podem iniciar outra fase assexuada de multiplicação nas células epiteliais do intestino delgado dos felídeos, assegurando a difusão e manutenção da parasitose nesses hospedeiros¹⁴.

1.1.2 *Transmissão e prevalência da toxoplasmose*

A transmissão da toxoplasmose pode ocorrer por meio do consumo de carnes cruas ou malcozidas contendo cistos teciduais do parasita, pela ingestão de vegetais frescos, animais filtradores como mariscos crus e água contendo oocistos esporulados, pelo contato direto com as fezes de felídeos jovens infectados, pela transmissão vertical de taquizoítos para o feto, via placenta; e menos comum: por meio de transplante de órgãos contendo cistos teciduais, injeção acidental em laboratório e ainda pelo consumo de leite não pasteurizado com taquizoítos ¹⁴ (Figura 2).

Uma das principais formas de transmissão da toxoplasmose é pela ingestão de oocistos esporulados do *T. gondii*. A água contaminada é uma importante rota de transmissão e é a causa de grandes surtos de toxoplasmose pelo mundo²⁰. Um dos primeiros surtos relatados pela transmissão de oocistos na água ocorreu em Victoria, no Canadá, devido à uma contaminação do abastecimento de água da cidade pelas fezes do gato doméstico e do puma, encontrados na região da bacia hidrográfica do município²¹. No Brasil, estudos relatam algumas variáveis correlacionadas à alta soroprevalência da toxoplasmose, como o consumo de água não filtrada, em Campos dos Goytacases-RJ²², e com o consumo de sorvete caseiro, em Cascavel-CE²³. Além disso, a irrigação agrícola de vegetais crus, frutas e hortaliças com água contaminada com oocistos pode ser uma fonte potencial de disseminação do *T. gondii*^{24,25}.

Figura 2 - Transmissão do *T. gondii* nos hospedeiros definitivos e intermediários²⁶.

O consumo de cistos teciduais do *T. gondii* em carnes cruas ou malcozidas é considerado a maior rota de transmissão da toxoplasmose em humanos. Nos EUA, grande parte da infecção pelo *T. gondii* nos seres humanos foi relacionada ao consumo de carne e mariscos crus²⁷. Assim como na França, que atribuiu as altas prevalências ao hábito de ingerir carnes cruas ou pouco cozidas. Porém, nos últimos anos, observou-se um declínio da prevalência de toxoplasmose em muitos países desenvolvidos, devido ao uso de sistemas modernos para o manejo de criação de animais de produção, o que diminuiu o número de cistos do parasita na carne, e consequentemente reduziu a disseminação pelo *T. gondii* por esta via². Apesar dessa diminuição, ainda há trabalhos que mostram associação de altas soroprevalências com a ingestão de cistos teciduais de *T. gondii*, como um estudo recente que avaliou fatores de risco para toxoplasmose em residentes da região central da Carolina do Norte e que encontrou

correlação significativa entre altas soroprevalências e o consumo de carne de porco malcozida²⁸, e um estudo em gestantes no nordeste da China, que também relatou uma soropositividade para *T. gondii* significativamente maior em quem consumia regularmente carne malpassada²⁹.

Muitos fatores podem afetar a soroprevalência em humanos, e os mais comuns são os fatores antropogênicos, como hábitos alimentares e culturais, condições socioeconômicas, qualidade da água e cobertura sanitária. Além disso, fatores climáticos afetam a sobrevivência de oocistos no ambiente e, portanto, altas prevalências são classicamente observadas em países tropicais com clima úmido e quente e, inversamente, menores prevalências são encontradas em países áridos ou regiões mais frias³⁰. A faixa etária também pode influenciar na soropositividade pelo *T. gondii*, que aumenta com o decorrer da idade, devido ao aumento da exposição aos fatores de risco da infecção ao longo da vida. Devido a esses fatores, a prevalência da toxoplasmose humana pode variar de 10% a 80% ao redor do mundo³¹.

No Brasil, a soroprevalência da toxoplasmose pode chegar a 95% em populações indígenas da região Amazônica³². Um estudo recente no Rio Grande do Sul relatou 53.2% de prevalência em moradores que tem como hábito o consumo de comer carne mal-passada³³. E ainda no Rio Grande do Sul, em Santa Maria, em Abril de 2018 foi notificado um surto de toxoplasmose com mais de 700 casos até o momento ainda sob investigação³⁴. Apesar de índices maiores que 50% ainda serem relatados nos últimos anos, e de alguns surtos notificados, em geral, a infecção pelo *T. gondii* tem acometido um número menor de indivíduos, como mostra vários estudos atuais, sobretudo em jovens, em que a prevalência foi relatada em torno de 20%^{35,36}. A queda da soroprevalência do *T. gondii* tem sido observada em várias regiões do Brasil e também ao redor do mundo. Um exemplo bem evidente dessa redução foi observado em um estudo na França, em que a prevalência da toxoplasmose em gestantes foi de 80% na década de 60, cerca de 66% nos anos 80, 54% na década de 90 e que caiu para 44% em 2003, fenômeno que tem sido observado em várias regiões da Europa³⁷. Outro exemplo foi na Holanda, em que a soroprevalência em mulheres jovens era de 35% na década de 90 e diminuiu para 18% entre os anos de 2006 e 2007³⁸. Muitos autores atribuem essa queda ao fato de melhorias nas condições de higienização dos alimentos, mudanças nos sistemas agrícolas, consumo de carne

congelada de maneira adequada para inviabilização dos cistos teciduais (-12°C por pelo menos 3 dias), alimentação de gatos de forma mais segura com rações cozidas e aumento do acesso da população ao saneamento básico³¹.

A diminuição da prevalência da toxoplasmose principalmente em jovens, aumenta o número de susceptíveis à infecção pelo *T. gondii*, e consequentemente aumenta a frequência de mulheres em idade fértil soronegativas durante a gestação e, com isso, essas gestantes estão em risco de adquirir a infecção primária da toxoplasmose no decorrer da gravidez com possibilidade de transmissão dos taquizoítos via placenta, o que pode causar graves manifestações clínicas no feto. O maior número de gestantes suscetíveis é um sinal de alerta para introdução de medidas preventivas e melhorias no diagnóstico, que deve ser precoce e eficiente para o tratamento rápido das gestantes evitando a infecção fetal.

1.2 Manifestações clínicas da toxoplasmose

A infecção pelo *T. gondii* pode variar de uma infecção assintomática podendo manifestar-se como doença sistêmica grave, levando a óbito. Os sintomas variam de acordo com a condição imunológica do indivíduo e de seu quadro clínico: imunocompetente, imunodeprimido e toxoplasmose congênita¹⁷.

1.2.1 Toxoplasmose em Imunocompetentes e Imunodeprimidos

Em imunocompetentes, a maioria das infecções primárias por toxoplasmose são assintomáticas devido à efetividade do sistema imunológico, entretanto, em alguns casos de infecção aguda, as manifestações clínicas são semelhantes ao quadro da síndrome da mononucleose infecciosa, com adenopatias cervicais, acompanhadas de linfadenopatia febril, astenia e linfomonocitose¹⁵. Assim, a infecção pelo *T. gondii* muitas vezes não é diagnosticada e tratada por terapêutica específica. Apesar disso, alguns casos de infecção a partir de genótipos atípicos de *T. gondii* podem desenvolver manifestações clínicas como pneumonite, miocardite, encefalite e lesões oculares

graves¹. Além disso, estudos relataram a possibilidade da infecção crônica causar diminuição no desenvolvimento psicomotor, distúrbios e efeitos comportamentais³⁹. Estudos recentes demonstram a associação entre a infecção crônica pelo *T. gondii* e casos de transtorno bipolar e esquizofrenia^{40,41}.

Nos casos sintomáticos, cerca de 3% podem desenvolver um quadro de retinocoroidite⁴². As alterações oculares podem se apresentar com graus variáveis de degeneração, com lesões vasculares na coroide, microftalmia e estrabismo⁴³. Em casos raros pode ocorrer esclerite⁴⁴ e papilite toxoplásmica primária, caracterizada por focos de inflamação na papila óptica⁴⁵.

Em imunodeprimidos, como os infectados com o HIV, ou com neoplasias, ou submetidos à terapia imunossupressora e transplantados, a toxoplasmose apresenta-se como uma infecção oportunista e geralmente ocorre pela reativação de cistos latentes de *T. gondii* e reagudização da doença. As manifestações clínicas em transplantados ocorrem após os primeiros três meses do transplante e envolvem miocardite febril, encefalite e pneumonite⁴⁶. Um estudo recente envolvendo 10 países europeus relatou 87 casos de toxoplasmose após transplante de coração, fígado e rim⁴⁷.

Em pacientes com HIV, os sintomas mais frequentes da toxoplasmose são as lesões cerebrais e as lesões oculares³¹. Com o advento da terapia anti-retroviral houve uma diminuição significativa nos casos de toxoplasmose cerebral⁴⁸, mas esta é ainda a causa mais prevalente das doenças neurológicas associadas com a infecção pelo HIV⁴⁹. Um estudo recente retrospectivo, relatou 65% de toxoplasmose com acometimento cerebral, 12% de toxoplasmose disseminada e 22% de toxoplasmose ocular nos participantes com HIV, já em transplantados, os índices foram bem menores, com 16.5% de toxoplasmose cerebral e 3% de toxoplasmose ocular, porém com maior número de toxoplasmose disseminada, cerca de 42% dos casos⁵⁰.

1.2.2 *Toxoplasmose congênita*

A toxoplasmose congênita, nos casos mais graves, pode ser caracterizada pela tríade clássica, conhecida como Tríade de Sabin: hidrocefalia, retinocoroidite e calcificações cerebrais, e ainda pode ocorrer retardo mental, comprometimento

sensorial e até mesmo aborto^{51,52}. Essa variação de manifestações clínicas depende da resposta imune do hospedeiro, da patogenicidade da cepa infectante, e do período gestacional em que ocorreu a infecção¹. Geralmente, a toxoplasmose congênita ocorre devido à transmissão do *T. gondii* ao feto, via placenta, quando a mãe adquire a infecção primária durante a gestação. Em casos raros, a transmissão do parasita pode ocorrer em gestantes imunocompetentes que já tiveram uma infecção passada e que são reinfetadas com o *T. gondii* durante a gestação, principalmente no caso de cepas atípicas⁵³. Outro caso raro de transmissão congênita ocorre a partir de uma reativação de infecção passada em mulheres infectadas com HIV^{54,55}.

A placenta é uma barreira natural que protege o feto, onde os taquizoítos de *T. gondii* podem se multiplicar e iniciar um processo de disseminação. A barreira placentária é mais eficiente no início da gestação, levando à passagem de parasitas em menos de 10% dos casos durante o primeiro trimestre, mas se torna mais permeável ao longo da gestação, permitindo a transmissão do parasita em cerca de 30% dos casos no segundo trimestre e 60% a 70% dos casos no terceiro trimestre da gestação⁵⁶. A gravidade da infecção fetal é inversamente correlacionada com a transmissão de parasitas, uma vez que os neonatos são assintomáticos em mais de 80% dos casos quando infectados durante o terceiro trimestre de gestação⁵⁷. No entanto, quando a transmissão transplacentária ocorre durante o primeiro trimestre, as consequências para o feto são graves, muitas vezes levando ao aborto. Isso deve ao fato de que provavelmente no decorrer da gestação, conforme o desenvolvimento gradual da imunidade fetal ocorre o aumento da resistência contra a infecção⁵⁸. Em casos raros, o parasita pode persistir na placenta e acometer o feto apenas no final da gestação, o que poderia explicar por que os neonatos podem não ter nenhum sinal clínico ou radiológico no útero e no nascimento em alguns casos³¹.

No Brasil, estudos relatam uma ampla variedade de soroprevalências em gestantes, podendo chegar a 68% das gestantes na região nordeste do país^{59,60}. Um estudo recente no Tocantins relatou uma prevalência aguda materna de 5% das gestantes com transmissão vertical confirmada em 28% dos casos⁶¹. Um outro estudo em Goiânia mostra a eficácia do tratamento da mãe com espiramicina e redução significativa da transmissão materno-fetal da toxoplasmose e de casos com manifestações clínicas neurológicas e oculares graves nos recém-nascidos⁶². Medidas

de atenção à saúde, o diagnóstico e o tratamento precoce e eficiente da toxoplasmose em gestantes são essenciais para identificação e prevenção da gravidade dessa infecção nos recém-nascidos⁶³.

1.3 Resposta imunológica ao *T. gondii*

A infecção pelo *T. gondii* ocorre principalmente por via oral, como descrito anteriormente, e é por essa via que o parasita segue o trato digestório do hospedeiro até a mucosa intestinal³⁹. As células epiteliais da mucosa são uma barreira física contra a invasão do *T. gondii*, e além disso, o epitélio subjacente e a lâmina própria da mucosa apresentam um conjunto de células, como células dendríticas, células TCD4 e TCD8 e células B especializadas na produção de IgA secretória, imunoglobulina muito importante para combater a invasão e que pode estar relacionada com a proteção no início da infecção⁶⁴.

Após as invasões das células dendríticas e dos macrófagos, ocorre liberação local de quimiocinas pelas células infectadas, levando à atração de células da imunidade inata. Os neutrófilos são recrutados para os focos infectados para fagocitar parasitas livres e contribuem para reduzir a carga parasitária⁶⁵. As células dendríticas e os macrófagos desempenham um papel fundamental no início da imunidade inata, por serem principais fonte da citocina IL-12, que estimula as células NK a produzir IFN- γ , um dos principais mediadores da resistência ao *T. gondii* e controle da infecção⁶⁶. Além da IL-12, os macrófagos ativados produzem ROS e NO, moléculas exercem ação citotóxica diretamente no parasita⁶⁷.

A imunidade adaptativa estabelece uma resposta mais específica de reconhecimento antigênico, além de promover a seleção de linfócitos T e B que levam a formação de células de memória no hospedeiro após o primeiro contato com o agente, e caso ocorra um novo contato com o *T. gondii*, as células de memória serão ativadas induzindo uma resposta mais rápida e efetiva contra este parasita⁶⁸. As células apresentadoras de antígeno (APCs), como os macrófagos, células dendríticas e linfócitos B fagocitam o parasita e apresentam antígenos via complexo MHC de classe II para linfócitos TCD4⁺ que irão ativar as células TCD8⁺ efetoras⁶⁹. Tanto as células

TCD4⁺ e TCD8⁺ são essenciais na sobrevivência do hospedeiro com a infecção crônica por *T. gondii*, eliminando as eventuais reativações causadas pela ruptura ocasional de cistos do parasita⁷⁰ (Figura 3).

Figura 3 - Resposta imune celular à infecção inicial por *T. gondii*. Resumo das interações celulares da resposta imune inata e adaptativa⁷¹.

As células B ativadas produzem 5 isotipos de anticorpos específicos: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, que são capazes de lisar as formas extracelulares do parasita na presença do sistema complemento e de mediar a fagocitose, com ativação dos mecanismos celulares do hospedeiro e formação do vacúolo fagocitário com lise rápida do agente. A resposta imune-humoral ao *T. gondii* é persistente nos hospedeiros devido provavelmente à exposição continuada a antígenos, tanto pela eventual ruptura de cistos teciduais como por novas infecções, que são rapidamente controladas⁷².

A resposta imunológica induzida pela invasão do *T. gondii* nas células hospedeiras é forte e duradoura, mas não é suficiente para a eliminação total do

parasita. As altas concentrações de IL-12 e IFN- γ produzidas pelas células da imunidade inata limita a multiplicação do parasita, mas também é um sinal para a formação de cistos teciduais, onde o parasita permanecerá latente por toda a vida do hospedeiro¹⁶.

1.4 Diagnóstico

1.4.1 *Diagnóstico laboratorial da toxoplasmose*

O contexto imunológico do paciente, o estabelecimento da doença e os sinais clínicos são muito importantes para definir a melhor técnica de diagnóstico que deve ser empregada para identificação da toxoplasmose. Várias técnicas podem ser realizadas, seja indiretamente, detectando anticorpos de diferentes isotipos, como IgG, IgM ou IgA pela sorologia, ou diretamente, detectando o DNA do parasita pelas técnicas moleculares, ou ainda pela identificação dos próprios parasitas, como nos métodos parasitológicos⁷³. A PCR e suas variações, como a Real Time PCR, é um método quantitativo altamente sensível e específico e tem melhorado a detecção de doença aguda em hospedeiros imunocomprometidos⁷⁴, além de serem considerados nos últimos anos, métodos de referência, ou padrão-ouro, para o diagnóstico pré-natal da toxoplasmose congênita⁷⁵. O isolamento de parasitas pode ser realizado através do inóculo do material suspeito em animais de laboratório ou em cultivo celular in vitro, e por ser altamente invasivo é menos comum em pacientes imunocompetentes, exceto em casos graves de toxoplasmose disseminada, em que o parasita pode ser encontrado no sangue ou fluidos corporais ou no caso de gestantes com suspeita de toxoplasmose aguda, em que o parasita pode ser isolado do líquido amniótico ou no diagnóstico pós-natal, com o isolamento a partir da placenta⁷⁶.

O diagnóstico da infecção por toxoplasmose é geralmente baseado na sorologia, por ser um método sensível, específico, de fácil execução, baixo custo quando comparado com as técnicas moleculares e pode ser automatizado para triagem de um grande número de amostras⁷⁷. Como a infecção é assintomática na maioria dos casos, o diagnóstico sorológico é muito importante em algumas situações, como na

triagem de gestantes por todo o período gestacional, em pacientes com uveíte ou retinocoroidite sem história conhecida de infecção congênita, e em doadores de órgãos ou receptores de transplantes⁷⁸. Além disso, em pacientes com febre ou linfadenopatia, o teste sorológico é uma ferramenta importante para diferenciar infecções que também estão associadas a linfadenopatias infecciosas como o citomegalovírus, vírus Epstein-Barr ou infecção por HIV³¹.

1.4.2 Cinética da resposta de anticorpos e interpretação do diagnóstico sorológico

A cinética de produção dos anticorpos na toxoplasmose foi inicialmente descrita por Camargo e Leser, como três perfis sorológicos da toxoplasmose humana: o perfil I ou de infecção recente foi caracterizado pela presença de IgG e IgM, o perfil II ou de transição foi caracterizado por elevadas concentrações de IgG e redução gradativa de IgM e o perfil III, característico de infecção crônica ou latente, que estão presentes apenas anticorpos IgG anti-*T. gondii*⁷⁹.

As imunoglobulinas do tipo M e do tipo A são produzidas durante a primeira semana após a infecção e atingem um patamar dentro de aproximadamente um mês⁷⁷. Anticorpos IgE também são produzidos precocemente e são detectáveis pelos métodos sorológicos de 2 a 3 meses após a infecção pelo *T. gondii*⁸⁰. A concentração de anticorpos IgM específicos geralmente diminui de 1 a 6 meses após a infecção⁸¹. Hoje, a maioria das técnicas sorológicas para detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii* tem alta sensibilidade, o que pode ser um problema. As técnicas sorológicas atuais de triagem podem detectar a IgM por meses ou anos após a infecção. Gras et al.⁸² demonstraram que a detecção de IgM utilizando o ensaio de aglutinação por imunoabsorção (ISAGA) persistiu em média por mais de 1 ano em uma coorte de gestantes, portanto, um resultado de IgM positivo não define a fase aguda da doença. Da mesma forma, a IgA específica pode ser detectada por até 2 anos após a infecção⁸³. Estudos recentes mostraram evidências de anticorpos IgA de alta avidéz em animais cronicamente infectados, sugerindo que esta imunoglobulina possa permanecer por um longo tempo em títulos detectáveis no hospedeiro⁸⁴.

A resposta imune individual do hospedeiro e as características da técnica utilizada afetam a cinética de detecção de IgG anti-*T. gondii*, cuja síntese tem início

de 1 a 3 semanas após o aumento inicial de IgM, atinge um patamar de 2 a 3 meses, e depois diminuem e persistem por toda a vida no hospedeiro em títulos residuais altamente variáveis⁷⁷ (Figura 4).

Figura 4 - Cinética de imunoglobulinas específicas IgG, IgM, IgA e IgE anti-*T. gondii* após infecção primária. Av. IgG: avididade de anticorpos IgG. Autoria própria, baseado em Dard et al.⁷⁷.

As técnicas sorológicas utilizando antígenos de membrana ou parasitas íntegros como o teste de imunofluorescência indireta (IFAT) ou o teste de aglutinação ISAGA podem detectar precocemente a resposta de anticorpos que é primariamente dirigida para as proteínas de superfície do parasita, técnicas que são utilizadas muitas vezes para confirmação de fase aguda da doença, ou em que a quantidade produzida de IgG é baixa e pode resultar em dados inconclusivos pelos métodos comerciais^{85,86}.

A triagem da toxoplasmose geralmente é feita utilizando-se ensaios automatizados de fase sólida, como o ELISA e suas variações, como os ensaios quimioluminescentes e eletroquimioluminescentes (CIA e ECLIA), que geralmente utilizam misturas de antígenos citosólicos ou metabólicos, muitas vezes antígenos recombinantes ou peptídeos sintéticos, e que diferem os limites de detecção de anticorpos anti-*T. gondii* entre os fabricantes, resultando em uma variabilidade de

sensibilidades e especificidades entre essas técnicas (Tabela 1)^{85,87}. Além disso, a falta de padronização dos kits comercializados pode dificultar a análise de seu desempenho, como por exemplo a padronização do *cut-off*, valor que separa as amostras negativas e positivas de testes sorológicos quantitativos⁸⁸. Esta dificuldade de quantificação é um processo comum no diagnóstico da toxoplasmose devido a necessidade de se garantir qualitativamente a presença da infecção e permitir a quantificação dos anticorpos para a detecção de infecção aguda, que apresenta maiores títulos. Assim, desde o teste do corante ou Sabin Feldman, o primeiro teste sorológico desenvolvido para toxoplasmose, todos os ensaios apresentam limitações em sua escala usando dois padrões de diluição para definir a presença de infecção e se existe risco de infecção aguda⁸⁸.

Muitos estudos apontam que a padronização do *cut-off* destas técnicas comerciais seria necessária e importante para o diagnóstico eficiente da toxoplasmose dependendo do local e população de estudo^{89,90}. Em alguns testes, como por exemplo o Elecsys Toxo[®], há uma variação no estabelecimento do *cut-off*, que em alguns países como na França é utilizado o valor de 30UI/mL e em muitos outros países incluindo o Brasil, o *cut-off* utilizado é de 3UI/mL⁹⁰. Essa variação pode acontecer dependendo do objetivo do estabelecimento do *cut-off*, ou seja, um *cut-off* desenhado para maior sensibilidade pode ser vantajoso por não correr o risco do teste não identificar uma amostra positiva, mas certamente dará maior número de resultados falso-positivos, o que no caso da triagem de gestantes, implica em tratamento e estresse desnecessários⁹¹. Leslé et al.⁹⁰ relataram o caso do teste automatizado Platelia Toxo[®] IgG que teria sua sensibilidade aumentada para detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* alterando seus valores de *cut-off* após análise com amostras coletadas no acompanhamento de soroconversão de IgG em gestantes. Os ensaios sorológicos devem considerar o equilíbrio entre sensibilidade e especificidade ao estabelecer o *cut-off* dentro de uma determinada população, principalmente em relação aos objetivos de seu uso⁹².

Assim, devido às diferenças no critério de interpretação do *cut-off* e no desempenho para a detecção de anticorpos específicos anti-*T. gondii* pelos diferentes métodos sorológicos disponíveis comercialmente deve-se realizar outras metodologias para confirmação do diagnóstico de triagem, principalmente quando há suspeita de infecção aguda⁹¹.

Uma técnica que tem sido utilizada para identificar a fase aguda da toxoplasmose por meio da sorologia é a determinação da avidéz de IgG pelo ELISA com eluição caotrópica, um método que se baseia no aumento progressivo da afinidade do anticorpo pelo seu antígeno alvo durante o curso da imunidade após a infecção. A detecção da avidéz de anticorpos IgG tem sido muito utilizada para confirmação de fase aguda principalmente em grupos de risco, como gestantes^{93,94}. Porém, é uma técnica que também varia entre os diversos testes comerciais, tanto em sua detecção, agente caotrópico ou antígeno de ligação na fase sólida, e além disso, há relatos de indivíduos que permaneceram com índices baixos de avidéz de IgG por longos períodos de tempo⁹⁵. Esta baixa avidéz de IgG persistente pode ser comum em gestantes e já foi relatada por até 14 meses⁹⁶. Um trabalho recente realizado com 176 gestantes relatou que 76% tiveram resultados de baixa avidéz de IgG por até 7 meses⁹⁷.

Outra forma de avaliar a infecção aguda pelo *T. gondii* na sorologia é por meio da análise da cinética dos títulos de IgG detectados em duas amostras de soro obtidas em intervalos de 3 semanas na ausência de qualquer tratamento. A partir dessa análise, a identificação da elevação de anticorpos IgG é sugestiva de uma infecção adquirida em menos de 2 ou 3 meses⁷⁸.

Combinações de diferentes ferramentas de diagnóstico e interpretações críticas são necessárias para o diagnóstico da fase aguda ou crônica da infecção, o que permite um manejo seguro principalmente em grupos de risco, como gestantes e imunodeprimidos. A interpretação sorológica adequada é fundamental para evitar a preocupação desnecessária principalmente no caso de gestantes com IgM persistente ou para iniciar um tratamento precoce principalmente em imunodeprimidos e para prevenção da infecção fetal.

Tabela 1 - Características de alguns testes comerciais utilizados na triagem da toxoplasmose humana.

Testes	AgTg *	Etapas **	Tempo (min)/n amostras #	Igs ##	Se % × Reportada	Sp % × Reportada
Platelia Toxo[®] (ELISA)	Nativo	3	150/96	IgG IgM	79.0 ⁹⁸ -97.2 ⁹⁹ 97.9 ⁹⁹ -100 ¹⁰⁰	96.8 ¹⁰⁰ -100 ⁹⁹ 92.6 ⁹⁹ -96.8 ¹⁰⁰
Liaison[®] (CMIA)	Nativo	2	80/100*	IgG IgM	93.8 ⁸⁷ -99.3 ¹⁰¹ 61.7 ⁹⁹ -81.8 ⁸⁷	96.8 ¹⁰¹ -100 ¹⁰² 81.8 ⁸⁷ -98.4 ⁹⁹
VIDAS[®] (ELFA)	Nativo	3	40/100	IgG IgM	91.4 ¹⁰³ -99.6 ⁹⁹ 65.0 ⁹⁹ -81.8 ⁸⁷	98.6 ¹⁰⁰ -100 ¹⁰² 97.9 ⁹⁹ -99.7 ⁹⁹
Architect[®] (CMIA)	Rec P30 P35	2	60/100*	IgG IgM	84.4 ⁸⁷ -92.1 ¹⁰⁴ 63.0 ⁸⁷ -80.9 ⁹⁹	99.5 ⁹⁹ -99.8 ¹⁰⁴ 84.4 ⁸⁷ -99.8 ¹⁰⁵
AxSYM[®] (MEIA)	Rec P30	3	85/100*	IgG IgM	90.2 ¹⁰³ -99.6 ⁹⁹ 86.0 ⁹⁹ -90.3 ¹⁰⁶	99.5 ⁹⁹ -99.6 ¹⁰³ 99.5 ¹⁰⁶ -100 ⁹⁹
Elecsys Toxo[®] (ECLIA)	Rec P30	4	95/100	IgG IgM	94.4 ¹⁰⁷ -100 ⁸⁹ 76.6 ⁹⁹ -95.7 ⁸⁹	87.5 ⁸⁹ -100 ⁹⁹ 84.8 ⁸⁵ -96.7 ⁹⁹

*AgTg: antígeno de *T. gondii* utilizado nos testes; Rec: antígeno recombinante; ELFA: Ensaio imunoenzimático por ligação fluorescente; CMIA: Ensaio quimioluminescente em micropartículas; ECLIA: Ensaio eletroquimioluminescente; ELISA: Ensaio imunoenzimático de fase sólida manual; MEIA: Ensaio imunoenzimático em microesferas. **Etapas para realização dos ensaios sem lavagens. ##Igs: Imunoglobulinas anti-*T. gondii* detectadas nos ensaios; #Tempo em minutos e número de amostras triadas; ×Sensibilidade (Se) e Especificidade (Sp) mínima e máxima reportadas em vários estudos.

1.4.3 Diagnóstico da toxoplasmose congênita

O diagnóstico da toxoplasmose aguda materna, frequentemente assintomática, é considerado essencial para o tratamento e a prevenção da toxoplasmose congênita e se baseia na triagem de anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii* em sangue materno geralmente realizado por métodos de fase sólida automatizados como o ELISA e suas variações⁵⁶. A partir de uma sorologia sugestiva para esses anticorpos no decorrer da gestação, serão feitos testes confirmatórios. Quando a infecção materna adquirida durante a gravidez é suspeita, geralmente com o diagnóstico positivo na triagem para IgG e IgM, a prática atual é tratar a mãe com espiramicina ou com a combinação de pirimetamina e sulfadiazina até o parto, na tentativa de evitar a transmissão de taquizoítos de *T. gondii* via placenta¹⁰⁸. Além disso, a vigilância ultrassonográfica é programada todos os meses para monitorar cuidadosamente o desenvolvimento fetal. Além da sorologia, uma punção do líquido amniótico pode ser realizada para detecção do DNA do parasita por PCR¹⁰⁹.

Testes sorológicos para confirmação da infecção aguda podem ser realizados de maneira seriada com a coleta de novas amostras após 2 ou 3 semanas da primeira triagem para verificar o aumento de IgG, e também com a análise da avididade de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, que tem sua função diagnóstica por prever o tempo de infecção, ajudando a excluir os falso-positivos de IgM.

No caso de resultado sorológico negativo para essas imunoglobulinas, isto implica em suscetibilidade das gestantes à infecção aguda e portanto o teste sorológico deve ser repetido até o parto¹¹⁰. O intervalo entre estas coletas foi sugerido ser trimestral por vários autores¹¹¹, mas a lógica da transmissão da toxoplasmose congênita via taquizoítos pela placenta é muito mais rápida, com um intervalo de uma semana entre a transmissão aguda e a positividade sorológica. Portanto, o acompanhamento da infecção assintomática deve ser mais frequente, o que implica em testes de baixo custo e de rápida comunicação ao médico assistente, para introdução precoce da terapia nas gestantes e o menor dano fetal.

Os algoritmos de alguns serviços públicos brasileiros com as possibilidades de diagnóstico de IgG e IgM na triagem pré-natal da toxoplasmose e os procedimentos para acompanhamento das gestantes estão descritos na Figura 5.

Algoritmo 1 | Interpretação de resultados e condutas para gestantes com até 16 semanas de gestação

1) Se a gestante apresentar sintomatologia sugestiva ou ultrassonografia fetal com alteração: **repetir sorologia**.

2*) Não há necessidade de fazer IgG-avidez, pois IgG reagent e IgM reagent já confirmam infecção recente.

3*) Se mantiver resultado de IgG não reagent indica que IgM era falso reagent: considerar **gestante suscetível**.

Algoritmo 2 | Interpretação de resultados e condutas para gestantes a partir das 16 semanas de gestação

1) Se a gestante apresentar sintomatologia sugestiva ou ultrassonografia fetal com alteração: **repetir sorologia**.

3*) Se mantiver resultado de IgG não reagent indica que IgM era falso reagent: considerar **gestante suscetível**.

Figura 5 - Algoritmos para interpretação de resultados e condutas para gestantes antes de 16 semanas de gestação e após 16 semanas de gestação na triagem da toxoplasmose¹¹¹.

A transmissão congênita da toxoplasmose ocorre em menos de 50% das gestantes com toxoplasmose aguda e também existem provas de que esta transmissão depende do tamanho fetal, ocorrendo mais frequentemente no final da gestação⁵⁶. Mesmo com um resultado de IgM e IgA positivos na triagem, isso não significa que terá acometimento fetal, no entanto, a positividade de IgM na triagem pode exercer determinada influência nas decisões médicas, por exemplo, em determinados momentos nos EUA para tais situações era indicado o aborto¹¹². Evidentemente que a avidéz de IgG, a pesquisa quantitativa de IgM e IgA, e testes de menor sensibilidade que detectam apenas maiores quantidades de IgM, como o ISAGA ou a IFAT IgM, podem ter aplicação no diagnóstico confirmatório da toxoplasmose aguda nas gestantes, mas a única forma de abordar a soroconversão é a triagem sorológica frequente ou mensal.

A toxoplasmose congênita também pode ser confirmada no diagnóstico pós-natal, uma abordagem complementar ao diagnóstico pré-natal e uma medida alternativa em países onde a triagem sorológica de gestantes não é implementada¹¹³. No nascimento, o recém-nascido é submetido a exames ultrassonográficos e oftalmológicos para detectar calcificações cerebrais e alterações oculares durante a primeira semana de vida e é repetido a cada 3 ou 4 meses^{114,115}. O diagnóstico da infecção congênita após o parto pode ser realizado através da detecção de parasitas por PCR na placenta ou no sangue do cordão umbilical ou pela análise sorológica do neonato¹¹⁶. Diferente dos anticorpos IgG que são transferidos passivamente da mãe para o feto via placenta, os anticorpos IgM ou IgA específicos não conseguem atravessar a barreira placentária e são importantes marcadores da infecção fetal. Porém, a detecção desses marcadores no sangue do cordão umbilical necessita de confirmações adicionais pois pode refletir contaminação com soro materno no momento do parto¹¹⁷. O teste mais eficiente é o teste de imunocaptura ISAGA, porém as sensibilidades para detecção de IgM e IgA variam de 50-70% na maioria dos trabalhos^{118,119,120}. Estudos recentes têm sido desenvolvidos para detecção de IgM e IgA pós-natal baseados na citometria de fluxo, porém também com baixas sensibilidades, variando de 36-78%¹²¹. Outros estudos realizados a partir de diferenças dos padrões de detecção de antígenos de *T. gondii* entre a IgG materna e do neonato permitiu a identificação e utilização da técnica de WB para confirmação da

toxoplasmose congênita pós-natal, porém devido ao alto custo do ensaio, este teste é realizado apenas nos casos em que a detecção de IgM ou IgA do cordão precise ser confirmada¹²².

1.4.4 *Evolução temporal dos métodos sorológicos para o diagnóstico da toxoplasmose e suas consequências*

O teste do corante azul de metileno (*Dye test*) ou Sabin Feldman foi o primeiro teste sorológico desenvolvido e permitiu a avaliação soroepidemiológica da toxoplasmose na população humana e em várias espécies de animais¹²³. Atualmente, é um teste pouco utilizado pelos laboratórios clínicos devido ao uso de parasitas vivos e o possível risco de contaminação do manipulador, porém ainda tem sido aplicado como um teste de referência para o diagnóstico sorológico da toxoplasmose humana em termos de sensibilidade e especificidade⁷⁸. Para suprir o manuseio e aplicabilidade deste teste surgiram outros métodos sorológicos: os aglutinantes, imunoenzimáticos e fluorimétricos.

Os métodos baseados na aglutinação inicialmente foram desenvolvidos com hemácias de carneiro sensibilizadas com antígenos parasitários, denominado de hemaglutinação indireta¹²⁴. Devido à baixa sensibilidade, esse teste foi otimizado, resultando em um diagnóstico mais sensível, de fácil execução e baixo custo baseado na formação de agregados visíveis, como resultado da interação entre anticorpos específicos (IgG e IgM) e antígenos íntegros de *T. gondii* em partículas de látex ou poliestireno ou ainda baseado na aglutinação direta de taquizoítos fixados e formalizados¹⁰⁰, métodos hoje comercializados, como o ISAGA IgM/IgA, utilizado na confirmação do diagnóstico pré-natal em gestantes com suspeita de toxoplasmose e no pós-natal em recém-nascidos, como exemplificamos anteriormente⁸⁸.

Com a produção de conjugados específicos a partir de anticorpos purificados foi possível o desenvolvimento de testes diagnósticos mais eficientes, como o teste de imunofluorescência indireta (IFAT), baseado na capacidade de ligação de anticorpos e fluorocromos, que utiliza parasitas íntegros e formolizados como antígeno¹²⁵. Na década de 60, ainda se utilizavam preparações antigênicas impuras, mesmo assim, a

fluorimetria foi uma abordagem eficiente, pois permitiu a visualização da fluorescência do taquizoíto no microscópio, mesmo marcando moléculas interferentes na reação. O teste IFAT, atualmente, é utilizado em conjunto com outros métodos para confirmação de diagnóstico de IgG e IgM anti-*T. gondii*, porém é uma técnica limitada pela análise subjetiva do observador⁸⁶.

O avanço tecnológico no desenvolvimento de conjugados específicos e controle de qualidade e impurezas de antígenos possibilitou o uso de ensaios de fase sólida como o ensaio de imunoabsorção por ligação enzimática (ELISA), um método sensível e específico e de fácil padronização, considerado hoje o teste de escolha para a triagem sorológica da toxoplasmose em muitos laboratórios de rotina⁷⁷. Com o desenvolvimento dos testes imunoenzimáticos de fase sólida, foi possível aplicar na rotina diagnóstica a identificação da afinidade de anticorpos IgG ao antígeno de *T. gondii*, pelo uso de agentes caotrópicos, como a ureia em métodos enzimáticos¹²⁶. Assim, foi possível a detecção de anticorpos de baixa avididade, que se ligam com baixa afinidade ao antígeno de *T. gondii* e são removidos facilmente pela lavagem com ureia por serem produzidos em um estágio precoce da infecção aguda, e anticorpos de alta avididade ou anticorpos caotrópicos resistentes, que são característicos da resposta de memória imunológica e infecção crônica adquirida a mais de três meses, uma técnica muito importante para a confirmação de fase aguda da toxoplasmose e muito utilizada principalmente no diagnóstico da toxoplasmose congênita¹²⁷.

Atualmente, vários estudos são desenvolvidos para melhorar a sensibilidade e especificidade do ELISA para pesquisas de anticorpos anti-*T. gondii*. Alguns autores têm proposto a utilização de antígenos mais específicos, como antígenos recombinantes e peptídeos sintéticos de proteínas expressas na superfície do *T. gondii*, e até mesmo a utilização de múltiplas combinações de peptídeos antigênicos (MAPS)¹²⁸. Vários kits comerciais atualmente existentes no mercado utilizam a SAG1 como antígeno, entretanto, a combinação e composição exata desses peptídeos para a utilização em imunoensaios é uma questão que ainda deve ser aprimorada, pois a utilização de proteínas específicas apesar de aumentar a especificidade do teste pode diminuir a sensibilidade em comparação com a utilização de antígenos com um maior número de proteínas, como o extrato total de parasitas^{85,129,130}.

A partir da automatização dos ensaios sorológicos nos laboratórios clínicos, o aprimoramento dos testes foi direcionado para o aumento do sinal de detecção com o desenvolvimento de variações do ensaio de fase sólida, como o ensaio de imunoabsorção por detecção fluorescente (ELFA) e imunoensaios quimioluminescentes (CLIA), ensaios comercializados e que desempenham um importante papel hoje como métodos de triagem da toxoplasmose humana em muitos laboratórios¹⁰⁹. Estes métodos dependem de equipamentos específicos, geralmente cedidos pelo fabricante do kit, restringindo a capacidade crítica do executor e impedindo qualquer aprimoramento que eventualmente possa ser necessário⁹⁸.

Nos últimos anos, a síntese de diversos fluorocromos de características diferentes permitiu novas abordagens fluorimétricas na sorologia para detecção de anticorpos anti-*T. gondii* e de outros patógenos. O equipamento de leitura não é comprometido exclusivamente com o teste e permite o desenvolvimento de ensaios mais sofisticados visando múltiplas detecções de diferentes anticorpos ou antígenos em um único poço reagente, utilizando a fase sólida do ensaio de ELISA como um sistema de teste.

1.4.5 Métodos fluorescentes multiplex no diagnóstico da toxoplasmose

O desenvolvimento de novas metodologias para o diagnóstico sorológico de patógenos é atualmente direcionado para ensaios múltiplos fluorimétricos que detectam uma grande diversidade de analitos¹³¹. Os fluorocromos possuem características únicas, como espectros de excitação e emissão de fótons, que podem ser detectados em diferentes comprimentos de onda, o que permite a mistura de fluorescências distintas na reação¹³².

Corantes orgânicos sintéticos como a fluoresceína e a rodamina foram os primeiros compostos fluorescentes utilizados em pesquisa biológica¹³³. Alguns fluorocromos derivados destes compostos originais foram produzidos para melhorar a solubilidade e fotoestabilidade e para possibilitar a bioconjugação, tais como o isotiocianato de fluoresceína, o N-hidroxisuccimida-fluoresceína (NHS-fluoresceína) e o N-hidroxisuccinimida-rodamina (NHS-rodamina). Além disso, nos últimos anos,

algumas empresas ampliaram a construção desses fluorocromos sintéticos para emitir em outros comprimentos de onda, não apenas nas emissões no verde (fluoresceína) e no vermelho (rodamina), apresentando uma ampla gama de fluorocromos de comprimento de onda de emissão distintos, como a linha Alexa Fluor®: NHS-790, NHS-568, NHS-350^{134,135} (Figura 6).

Os compostos NHS-ester reagem com aminas primárias (R-NH₂) de proteínas, presentes nos grupos ϵ -amina dos aminoácidos de lisina (k) da cadeia C-terminal, e nos grupos α -amina dos aminoácidos da cadeia N-terminal de cada polipeptídeo¹³⁶. A frequência da formação dessas ligações amida estáveis depende do peso molecular, concentração da proteína que será conjugada e do número de aminas reativas¹³⁷. Além disso, outras classes químicas de fluorocromos estão disponíveis comercialmente, embora mais utilizados na citofluorimetria, como as indocarbocianinas (Cy2, Cy3 e Cy5), aloficocianinas (APC) e ficoeritrina (PE)^{138,139}. Assim, a partir da variedade desses compostos fluorescentes e possibilidade de acoplamento com proteínas, a abordagem fluorimétrica passou a ser útil para o desenvolvimento de métodos com análise múltipla tanto em ensaios de fase sólida como arranjos líquidos, ensaios de alto rendimento e alto número de amostras. Recenemente foi desenvolvido um sistema multiplex em membrana com o uso de conjugados fluorescentes distintos para marcação de proteínas no Western Blot¹⁴⁰, porém ainda não há trabalhos do uso desta técnica fluorimétrica para detecção de anticorpos ou antígenos anti-*T. gondii*.

Os métodos fluorescentes multiplex no mercado baseiam-se principalmente em arranjos líquidos, como a citometria (CBA) ou o Bio-Plex, XMAP Luminex^{141,142}, que utilizam micropartículas conjugadas com diferentes anticorpos ou antígenos marcados com fluorocromos distintos que permitem alto rendimento de análises simultâneas e muitas vantagens quando comparados com ensaios de fase sólida convencionais devido a economia de tempo e reagentes que essas detecções múltiplas podem oferecer^{143,144}. Binnicker et al.¹³¹ desenvolveram um imunoenensaio multiplex com o sistema luminex de detecção utilizando micropartículas para detecção de IgG e IgM contra *T. gondii*, vírus da rubéola e citomegalovírus com excelente concordância da técnica em relação ao método comercial ELFA. Porém, esses métodos que utilizam micropartículas são de custo elevado com tempo longo de ensaio, pois necessitam de citometro de fluxo, que analisam amostras individuais e demandam softwares

especializados, frequentemente com variações devido à seleção de tamanho das partículas e às diferenças de lasers e eficiência dos fluorocromos encontrados nos diversos equipamentos de leitura disponíveis, dificultando a homogeneidade das análises para diagnóstico¹⁴⁵.

Nos últimos anos, nosso grupo tem construído e padronizado um ensaio de fase sólida baseado na fluorimetria (FISA) com dupla detecção em microplacas de alto rendimento, com excelente sensibilidade e especificidade para detecção de anticorpos anti-*T. gondii*¹⁴⁶. O teste fluorescente de fase sólida tem muitas vantagens econômicas, com menor custo de ensaio quando comparado com os métodos sorológicos enzimáticos utilizados atualmente. Além de não necessitar de equipamentos sofisticados como os métodos multiplex que utilizam micropartículas, o FISA é um método simples, com as etapas semelhantes a um ELISA convencional, como sensibilização, bloqueio, adição de amostras, incubações e lavagens, com a diferença na adição de conjugados, que são fluorescentes e, portanto, necessitam de um espectrofluorímetro para leitura com filtros de excitação e emissão, que podem ler em minutos placas com 96 ou 384 amostras. Além disso, não necessitam de substâncias cromogênicas ou reações enzimáticas com etapas adicionais para bloquear sua reação e que aumentam a variabilidade destas reações. Assim, mostramos que é possível o desenvolvimento de ensaios sorológicos com uma tecnologia atual de múltiplas detecções de maneira simples, econômica e eficiente para a triagem da toxoplasmose humana, atingindo o objetivo de métodos de triagem, que devem ser de baixo custo e com rápida execução dos testes.

O amplo espectro de fluorocromos disponíveis comercialmente abrange inúmeras possibilidades de múltiplas detecções por este método de fase sólida, como várias detecções de diferentes antígenos no mesmo poço de reação ou a detecção conjunta de várias imunoglobulinas, como IgG, IgM e IgA, útil em triagens de grande número de amostras e que necessitam de resultados rápidos para manejo clínico seguro, como as gestantes.

A: Espectros de emissão (nm) para diferentes fluorocromos
Múltiplas possibilidades para detecções simultâneas

B: Múltiplas detecções em ensaio de fase sólida em microplacas - FISA duplex

C: Múltiplas detecções em membrana - Western Blot

D: Arranjos líquidos - Citometria de fluxo

Figura 6 - Modelos de ensaios fluorimétricos. **A:** Espectros de emissão de diferentes fluorocromos disponíveis comercialmente, imagem modificada a partir de *Bioquest*¹⁴⁷. **B:** Técnicas fluorimétricas que utilizam dois fluorocromos no mesmo ensaio (Autoria própria). **C:** Western Blot para detecção de diferentes antígenos na mesma membrana, imagem modificada a partir de *Rockland Immunochemicals*¹⁴⁸. **D:** Arranjos líquidos utilizando partículas em citometria de fluxo, imagem modificada a partir de Zhang et al.¹⁴⁹

2 JUSTIFICATIVA

Pelo exposto anteriormente, é evidente que a triagem pré-natal sistemática da toxoplasmose é fundamental para permitir o tratamento da gestante em risco de transmissão congênita, que é um fator importante na redução de sequelas graves desta infecção nos recém-nascidos.

Nossos dados de epidemiologia da toxoplasmose humana em São Paulo têm mostrado um decréscimo de incidência desta infecção, aumentando a proporção de mulheres suscetíveis entrando na idade fértil. Este aumento de gestantes soronegativas resulta na necessidade de um número maior de testes para suprir a triagem adequada, já que a idade adulta leva a uma maior e diversificada alimentação, e aumento do risco de infecção pelo maior acesso a pratos ou alimentos consumidos in natura, como quibe, carpaccios ou tartars, que inclusive recentemente causaram surtos de toxoplasmose¹⁵⁰. Os custos para implementação e desenvolvimento de novos testes mais eficientes é menor do que o custo do tratamento a longo prazo de crianças acometidas pelo *T. gondii* durante a gestação¹⁵¹. Além disso, a construção de novas técnicas de diagnóstico foi transferida para a indústria privada nos últimos anos e tornaram-se limitadas pela visão do risco do falso-negativo, ou seja, uma gestante infectada com sorologia negativa, o que leva a escolha de *cut-offs* mais seguros para as empresas, mas também com alto índice de falso-positivos⁸⁵, o que leva a terapias desnecessárias e alto custo individual quer seja econômico ou psicológico.

Os testes fluorimétricos de fase sólida são uma alternativa ideal para a maior capacidade de triagem pré-natal, por permitirem a análise de múltiplas imunoglobulinas em um mesmo poço, semi-automação e alto desempenho, quer seja no número de classes de imunoglobulinas detectadas como também no número de amostras em pouco tempo. Com isso, é de extrema importância o desenvolvimento e aprimoramento de métodos de triagem pré-natal de alto rendimento e baixo custo, por meio de tecnologias atuais e inovadores com a detecção conjunta de IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* para o diagnóstico precoce, tratamento imediato e a prevenção da infecção fetal da toxoplasmose.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Desenvolver um método fluorescente de fase sólida para a detecção simultânea de classes específicas de anticorpos (IgG, IgM e IgA) contra *Toxoplasma gondii* para a triagem sorológica de gestantes.

3.2 Específicos

3.2.1 Construção

- a) Construir conjugados de alta eficiência pela marcação com diferentes fluorocromos NHS-éster para permitir a detecção conjunta de IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* em ensaios fluorescentes de fase sólida;
- b) Padronizar as concentrações de soro e dos conjugados produzidos para os ensaios fluorescentes de fase-sólida isolados e triplex;
- c) Padronizar a ordem de adição dos conjugados para a detecção simultânea de IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii*;
- d) Padronizar o ensaio fluorescente triplex de fase sólida em placas de 384 poços de alta demanda;
- e) Testar diferentes metodologias de marcação de fluorocromos para aumentar a intensidade da detecção fluorescente;
- f) Testar diferentes filtros de excitação de fótons para maior eficiência da detecção conjunta;

- g) Comparar a intensidade de fluorescência na detecção de IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* entre dois lotes de conjugados produzidos.

3.2.2 Validação

- a) Testar a estabilidade dos conjugados após a marcação com os diferentes fluorocromos;
- b) Testar a repetitividade, reprodutibilidade e controle de qualidade interno do FISAt;
- c) Avaliar a sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivos e negativos do FISAt.

3.2.3 Aplicação

- a) Comparar o perfil de detecção de anticorpos IgG IgM e IgA com o ELISA convencional, com o teste comercial Elecsys Toxo[®] e com teste complementar de ELISA de avidéz.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os sais e reagentes utilizados apresentaram qualidade pró-análise. A água destilada utilizada na preparação das soluções foi purificada em sistema Milli-Q (Millipore®), com resistividade de 18,2 MΩcm e condutividade de 0,056 μS/cm a 25°C. Todos os reagentes, instrumentos e materiais específicos têm suas origens indicadas ao longo do texto.

4.1 Animais e antígenos

4.1.1 Animais

Camundongos machos Swiss (não-isogênicos) com peso médio de 20g e idade variando entre 30 e 60 dias foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Os animais são mantidos rotineiramente no Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, em gaiolas plásticas com maravalha de pinho autoclavada, com ração comercial para roedores (Nuvital®, Curitiba, BR) e água *ad libitum*. Todos os procedimentos com animais seguiram as normas descritas em “Guide for the care and use of laboratory animals”¹⁵² e em “Princípios de ética na experimentação animal” do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA)¹⁵³.

4.1.2 Antígeno

4.1.2.1 Obtenção de extrato total sonicado de *T. gondii*

Foram utilizados taquizoítos da cepa RH de *T. gondii*, mantidos rotineiramente no Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, por meio de passagens sucessivas de 10⁶ taquizoítos em camundongos Swiss. Os animais previamente infectados foram eutanasiados em câmara de CO₂, e o peritônio dos animais foi lavado com 5 mL de solução salina. Os exsudatos peritoneais foram purificados por filtração em membrana de policarbonato de 0,3μm (ISOPORE™,

Millipore[®], Billerica, MA, USA) e submetidos à ruptura sônica em sonicador Sonic Desmembrator (Quigley-Rochester[®], Inc, USA) a 40 ciclos por 5 a 10 períodos de 30 segundos a 4°C até a lise completa dos taquizoítos. A seguir, foi adicionado NaCl 0,3M para isotonizar a suspensão, que foi submetida a centrifugação a 1000 g por 30 minutos a 4°C em centrífuga 5804 R (Eppendorf[®], Hamburgo, GER) (Camargo et al, 1978). O sobrenadante foi utilizado como extrato total e a concentração de proteínas, determinada pelo método de Bradford¹⁵⁴ com padrão de gama globulina humana.

4.2 Considerações Éticas

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Pesquisa e Ética do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, sob o número CPE-IMT 2011/116 e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (335.541/2013 e 535.950/2014), ANEXO B.

4.3 Caracterização das amostras de soro

Foram utilizadas amostras de soro adquiridas a partir da centrifugação por 15min a 1000 g de 5 mL de sangue total de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) com pedido de exame para toxoplasmose (Figura 7), de ambos os gêneros e faixa etária de 14 a 44anos (Gráfico 1), coletadas no período de 04 de setembro de 2013 à 30 de março de 2016 e armazenadas no Biorrepositório do Laboratório de Protozoologia (LIM 49) do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. Essas amostras foram utilizadas com consentimento informado para uso em pesquisas sorológicas da toxoplasmose humana (ANEXO A).

Dos 1000 participantes que assinaram o TCLE, um declinou da coleta, e ainda 9 das amostras coletadas não constou resultado para toxoplasmose pelo método de triagem Elecsys Toxo IgG/IgM. Sendo assim, 990 amostras foram previamente avaliadas pelo método comercial Elecsys Toxo para a detecção de IgG e IgM (Roche Diagnostics®, Somerville, NJ, USA), no setor de Imunologia da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas de São Paulo (DLC HCFMUSP) (Figura 1). O procedimento padrão nesse laboratório é submeter as amostras IgM positivas no método comercial Elecsys ao teste confirmatório da Reação de Imunofluorescência Indireta (IFAT).

Figura 7 - Fluxograma dos participantes do HCFMUSP com pedido de exame para toxoplasmose entre 2013-2016. Autoria própria.

Para os testes pré-analíticos, nas etapas de padronizações foram utilizadas o total de 20 amostras de soros previamente avaliadas pelo método Elecsys Toxo IgM/IgG e ELISA IgA, sendo elas: 3 amostras de soro IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* positivas, 7 amostras positivas apenas para anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii*, 5 amostras positivas apenas para IgG anti- *T. gondii* e 5 amostras IgG negativas, IgM negativas e IgA negativas anti-*T. gondii*. Para os testes analíticos, na etapa de validação do FISAt foram utilizadas 500 amostras, dentre elas 420 gestantes e 80 participantes jovens e adultos do HCFMUSP.

4.4 Etapas do desenvolvimento do FISAt

O FISAt para detecção de IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* foi padronizado e validado de acordo com as etapas apresentadas no fluxograma da Figura 8.

Figura 8 - Fluxograma do desenvolvimento do FISAt para detecção conjunta de IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii*, com etapas na construção, validação e aplicação do teste. Autoria própria.

4.5 Ensaios pré-analíticos: construção do FISAt

4.5.1 Seleção dos fluorocromos da linha Alexa Fluor®

Os fluorocromos da linha Alexa Fluor® foram selecionados e escolhidos de acordo com 2 parâmetros: a) maior distância possível da emissão máxima (Área sombreada da Figura 5) dos fluorocromos disponíveis para minimizar as interferências na detecção: emissão 440nm BW 40nm (BW- Bandwidth: largura em nm da banda passante do filtro) para o AF350; 535nm BW 40nm para o AF488; e 670nm BW 40nm para o AF647, e b) brilho ou intensidade de fluorescência máxima emitida (Figura 9).

Figura 9 - Espectros de excitação (linha tracejada) e emissão (linha contínua e área sombreada) para Alexa Fluor® 350 (azul), Alexa Fluor® 488 (verde) e Alexa Fluor 647 (vermelho). Imagem modificada a partir de Becton, Dickinson Company¹⁵⁵.

4.5.2 Marcação dos anticorpos secundários com fluorocromos

Para produzir os conjugados fluorescentes foram utilizados anti-IgM humano, anti-IgG humano e anti-IgA humano obtidos comercialmente (Pierce®, Rockford, IL, USA). Os fluorocromos Alexa Fluor® -AF (Life Technologies, Carlsbad, California,

USA) apresentam um terminal NHS-ester que reage com aminas primárias de anticorpos, o que possibilita o acoplamento desses fluorocromos com os anticorpos secundários. De acordo com as propriedades dos fluorocromos escolhidos, realizamos a marcação de anti-IgG humano com AF350, anti-IgM humano com AF647 e anti-IgA humano com AF488. Foi adicionado em um eppendorf, anti-IgM humano, anti-IgG humano ou anti-IgA humano diluído em tampão borato de sódio pH 8.3 para concentração final de 1 mg/mL. Os fluorocromos foram diluídos na concentração de 10 mg/mL em Dimetilformamida – DMF (Sigma®, St Louis, MO, USA) e adicionados no eppendorf contendo os anticorpos secundários sob agitação em vórtex. A solução foi incubada em temperatura ambiente por 1 hora sob agitação. O fluorocromo adicionado foi diluído conforme:

- a) A quantidade (μL) de fluorocromo foi adicionada baseada nas propriedades de intensidade de fluorescência dos fluorocromos. O fluorocromo AF selecionado para o estudo que emite maior intensidade de fluorescência, ou maior brilho (AF647) foi adicionado com uma razão molar de 10, o AF488 foi adicionado em uma razão molar de 15 e o AF350 (menor intensidade de fluorescência) foi adicionado em uma razão molar de 20, conforme protocolo do fabricante.

Para o fluorocromo AF647, foram utilizadas outras 2 metodologias de conjugação ao anti-IgM humano, com a finalidade de aumentar o sinal de fluorescência:

- b) Metodologia de conjugação baseada na razão molar F/P: A quantidade de fluorocromo adicionada no poço de reação com o anticorpo secundário foi baseada na razão molar F/P (fluorocromo/proteína) que proporcionou maior intensidade de fluorescência, de acordo com Anderson e Nerurkar, 2002¹⁵⁶.
- c) Metodologia de conjugação via Poly-L-Lysine -PLL (4-15 KDa): A Poly-L-Lysine é um polímero catiônico que contém grupos aminas (R-NH_2) protonáveis, que por meio de um ligante, como o glutaraldeído, pode ser acoplada a anticorpos via grupos aldeídos reativos¹⁵⁷. A conjugação foi

baseada na quantidade recomendada de AF647 para ótima proporção molar (F/P), de acordo com protocolo do fabricante. Após ligação com o fluorocromo, a solução com PLLF (Poly-L-Lysine-Fluorocromo) foi purificada por cromatografia de exclusão molecular em coluna de 10 mL com Sephadex G-25-40 para remoção do fluorocromo excedente. O procedimento seguinte: ligação da PLLF com anticorpo secundário (40 µg/mL) foi realizada com 1 % de glutaraldeído sob agitação e incubação por 1 hora em temperatura ambiente (Glutaric dialdehyde solution, Pentane-1,5-dial Sigma®).¹⁵⁸

Para a marcação do conjugado anti-IgM humano, utilizamos também outros dois fluorocromos NHS-ester: o NHS-Rodamina (Sigma®), e o Alexa Fluor® 568 (Figura 10), com a finalidade também de testar outras possibilidades para a detecção conjunta com os outros dois fluorocromos AF488 e AF350 e também na tentativa de aumentar o sinal de detecção dos anticorpos IgM anti-*T. gondii*. Os dois fluorocromos foram marcados de acordo com a metodologia “a” descrita anteriormente, com a razão molar de 10.

Figura 10 - Espectros de excitação (linha tracejada) e emissão (linha contínua e área sombreada) para Alexa Fluor 350 (azul), Alexa Fluor 488 (verde), NHS-Rodamina (amarelo) e Alexa Fluor 568 (laranja). Imagem modificada a partir de Becton, Dickinson Company¹⁵⁵.

4.5.3 Purificação dos conjugados marcados

Após a etapa de incubação dos fluorocromos com os anticorpos secundários, para remoção dos fluorocromos excedentes, a solução foi purificada por cromatografia de exclusão molecular em coluna de 5 mL de resina Sephadex G-25-40 (GE Healthcare®), utilizando como tampão de corrida, uma solução de borato de sódio a 0.1 M, pH 8.3. As frações foram coletadas com volume de 1 mL por tubo de coleta. A seguir, cada uma das soluções dos tubos de coleta foram aplicadas em microplacas de UV (UV-Star Microplates, Greiner bio-one®, Frikenhausen, GER) para a leitura em espectrofluorímetro Multi-mode Microplate Reader FilterMax F5 (Molecular Devices®, Califórnia, USA) em filtros de absorbância de 280nm para determinar a concentração proteica, por meio do coeficiente de absorção (A_{280}) da IgG de 1.43 e nas absorbâncias de 340nm para o AF350, 495nm para o AF488 e 650nm para o AF647, que são comprimentos de onda em que ocorrem o máximo de absorção por cada fluorocromo, para o cálculo da taxa molar Fluorocromo/Proteína (F/P) e análise da eficiência de acoplamento¹³⁴, conforme protocolo do fabricante (Molecular Probes, Invitrogen detection technologies). Após esse procedimento, o conjugado purificado foi estocado ao abrigo da luz a 4°C até o momento do uso.

4.5.3.1 Determinação da média molar da quantidade de fluorocromo por anticorpo (F/P)

A eficiência de acoplamento do fluorocromo nas moléculas de anticorpos foi avaliada através das características de cada conjugado (Tabela 2) calculados como descrito a seguir:

Tabela 2 - Características dos fluorocromos utilizados para marcação dos anticorpos secundários.

Fluorocromo	Peso molecular (Da)	$\lambda_{\max}^*/$ Excitação	Emissão	$\Sigma +$	$CF_{280} \pm$
Alexa Fluor [®] 350	410	346	442	19.000	0,19
Alexa Fluor [®] 488	643	496	519	71.000	0,11
Alexa Fluor [®] 647	~1300	650	665	239.000	0,03
Alexa Fluor [®] 568	791.8	578	602	88.000	0,08
NHS-Rhodamine	528	552	575	80.000	0,34

*comprimento de onda que ocorre o máximo de absorção da molécula de corante dos fluorocromos ($\lambda_{\max}$), emissão máxima e excitação máxima em nm. + Coeficiente de extinção molar a $\lambda_{\max}$ em $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$. $\pm$ Fator de correção para a leitura do fluorocromo a (A_{280}) 280nm.

a) Concentração de anticorpo (M):

$$M = \frac{[A_{280} - (\lambda_{\max} \times CF_{280})]}{\Sigma \text{ IgG} = 210.000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}}$$

b) Moles de fluorocromo por moles de proteína (F/P):

$$\frac{\lambda_{\max} \text{ do fluorocromo}}{\Sigma + \times \text{concentração de proteína (M)}}$$

4.5.4 Padronização dos filtros de excitação para os fluorocromos AF647 e AF568 para uso em ensaios fluorescentes de fase sólida.

Para aumentar a eficiência de detecção dos anticorpos IgM anti-*T. gondii*, foi testado os filtros de excitação 595nm com banda passante (BW) de 8nm, 590nm BW 30nm, e 590nm BW 20nm para o fluorocromo AF647 (Figura 11). E para o fluorocromo AF568 foram testados os filtros de excitação de 585nm BW 8nm, 565nm BW 30nm e 535nm BW 25nm (Figura 12).

Figura 11 - Filtros com diferentes comprimentos de onda de banda passante (BW) para o fluorocromo AF647. Filtro de excitação 595nm BW8nm (A), filtro de excitação 590nm BW 20nm (B) e filtro de excitação de 615nm BW30nm (C). A linha tracejada representa o comprimento de onda de excitação e a linha contínua com área sombreada representa o comprimento de onda de emissão do fluorocromo AF647. Imagem modificada a partir de Becton, Dickinson Company¹⁵⁵.

Figura 12 - Filtros de excitação com diferentes comprimentos de onda de banda passante (BW) para o fluorocromo AF568. Filtro de excitação 585nm BW8nm (A), filtro de excitação 565nm BW30nm (B) e filtro de excitação 535nm BW25nm (C). A linha tracejada representa o comprimento de onda de excitação e a linha contínua com área sombreada representa o comprimento de onda de emissão do fluorocromo AF568. Imagem modificada a partir de Becton, Dickinson Company¹⁵⁵.

4.5.5 Obtenção de IgG, IgM e IgA humana para controle das reações fluorescentes

As imunoglobulinas humanas de classes M e A foram obtidas comercialmente (Sigma®). Já a imunoglobulina humana de classe G foi purificada no laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo em resina com proteína A (GE Healthcare®, Wavwatos, WT, USA) e utilizada para controle desses ensaios conforme descrito em trabalho anterior pelo nosso grupo¹⁵⁹.

4.5.6 Ensaio enzimático (ELISA) e fluorescente (FISA) de fase sólida para comparação dos conjugados fluorescentes produzidos e conjugados peroxidase comerciais

Microplacas Costar de alta ligação (High Binding, Corning®) pretas (FISA) e transparentes (ELISA) foram sensibilizadas com concentrações de IgG purificada a partir de 1 µg/mL até 0,0009 µg/ml diluída em tampão carbonato de sódio (Na₂CO₃-NaHCO₃ 0,1 M, pH 9,5). As microplacas foram incubadas por 18 horas em câmara úmida a 4°C e em seguida, lavadas com tampão fosfato de sódio com tween-20 -PBST (PBS + Tween-20®) na lavadora HidroSpeed™ (Tecan Trading AG®, Suíça, SWI). Após o bloqueio com PBSTL (PBS + Tween-20® + Leite Molico 0.3%)¹⁶⁸, as microplacas foram incubadas a 37°C durante 1h, e novamente lavadas. Foram adicionados os conjugados anti-IgG humano AF350 e anti-IgG humano peroxidase (Sigma®) diluídos nas concentrações de 1:400 e o conjugado fluorescente 1:4000 respectivamente. A seguir, as microplacas foram incubadas novamente a 37°C e lavadas. Para o ELISA, após esse procedimento, foi adicionado substrato cromógeno TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, Sigma®). E após a incubação das microplacas, a temperatura ambiente por 15 minutos ao abrigo da luz, a reação foi bloqueada com HCL 4 N. A leitura das placas foi realizada no espectrofluorímetro em filtro de absorbância de 450nm quando utilizado o conjugado peroxidase e em filtros de excitação de 360nm e emissão de 430nm, para o conjugado fluorescente. Para a comparação dos conjugados anti-IgM humano foi utilizada a mesma metodologia, porém com conjugado anti-IgM humano marcado com AF647 diluído a 1:400 com

leitura realizada em filtros de excitação de 595nm e emissão de 670nm e conjugado anti-IgM humano peroxidase comercial (Sigma®) diluído a 1:4000; E para a comparação dos conjugados anti-IgA humanos foi usada também a mesma metodologia, com conjugado anti-IgA humano marcado com AF488 na diluição de 1:400 com leitura realizada em filtros de excitação de 495nm e emissão de 535nm e conjugado anti-IgA humano peroxidase comercial (Sigma®) diluído a 1:1000. As diferenças nas etapas da realização do ELISA e do FISA estão representadas na Figura 13.

4.5.7 Ensaio Fluorescente de fase sólida isolado e triplex para detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii*.

A sensibilização de microplacas pretas Costar de alta ligação (High Binding, Corning®) foi realizada com extrato total de taquizoítos de *T. gondii* (100µL/poço nas placas de 96 poços e 50µL/poço nas placas de 384 poços) diluído em tampão carbonato de sódio. Após incubação por 18 horas em câmara úmida a 4°C, as placas foram lavadas com PBST na lavadora HidroSpeed™. A seguir, as microplacas foram bloqueadas (250 µL/poço nas placas de 96 poços e 120µL/poço nas placas de 384 poços), incubadas a 37°C durante 1h e lavadas. As amostras de soro foram diluídas em PBST. Nos ensaios isolados, após novas lavagens, foi adicionado conjugado anti-IgG humano diluído em PBST e as placas foram incubadas em estufa de 37°C. As microplacas foram lavadas e foi adicionado em cada poço tampão PBS. Para detecção de IgM e IgA anti-*T. gondii* foi utilizada a mesma metodologia, porém com o uso de anti- IgM humano AF647 e anti-IgA humano AF488. As concentrações utilizadas de antígeno, soro, conjugados e bloqueio estão descritas para cada etapa de padronização do FISA isolado e do FISA triplex na Tabela 3.

Figura 13 - Etapas da realização dos ensaios de fase sólida com detecção enzimática (ELISA) e detecção fluorescente (FISA) para detecção de anticorpos anti-*T. gondii*. Autoria própria.

Tabela 3 - Construção do FISA para detecção de IgG, IgM e IgA anti-*T.gondii*: concentrações de antígeno, bloqueio, soro e conjugados em placas de 96 e 384 poços e padronização da marcação de fluorocromos.

Etapas FISA	AgTg*	Bloqueio	Soro	Conj*
Padronização das concentrações de soros e conjugados anti-IgG AF350, anti-IgM AF647, anti-IgA AF488 humanos no FISA isolado em placas de 96 poços	10	Leite 0.3 %		1:100
			1:100	1:200
			1:200	1:400
				1:800
Padronização da ordem de adição dos conjugados e análise da interferência de leitura conjunta em cada amostra de soro no FISA triplex em placas de 96 poços	10	Leite 0.3 %	1:200	1:400
Padronização das concentrações de extrato total de <i>T. gondii</i> , dos soros e dos tipos de proteína bloqueadora no FISA triplex em placas de 384 poços	1			
	2	Leite 0.3 %	1:100	1:400
	3	Albumina 1 %	1:200	
	6			
	12			
Padronização da metodologia de marcação do fluorocromo AF647 em placas de 384 poços	3	Albumina 1 %	1:200	1:400

*AgTg (µg/mL): Antígeno de *Toxoplasma gondii*. FISA: Ensaio fluorescente de fase sólida. *Conj: Concentração dos conjugados utilizados nos ensaios

A leitura das placas foi realizada no espectrofluorímetro com filtros de excitação e emissão para cada conjugado fluorescente como descrito anteriormente. Nos ensaios triplex (FISAt), para detecção conjunta de IgG, IgM e IgA anti- *T. gondii*, os conjugados também foram diluídos em PBST na concentração de 1:400 e a ordem de adição foi avaliada. Condição 1- incubação dos conjugados separados: anti-IgM humano AF647, anti-IgA humano AF488 e anti-IgG humano AF350 respectivamente; Condição 2- incubação dos conjugados separados: anti-IgG humano AF350, anti-IgM humano AF647 e anti-IgA humano AF488 respectivamente, Condição 3- incubação dos conjugados separados: anti-IgA humano AF488, anti-IgG humano AF 350 e anti-

IgM humano AF647 respectivamente, Condição 4- única etapa de incubação dos conjugados (Figura 14).

Figura 14 - Representação esquemática do ensaio fluorescente de fase sólida para detecção de IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii*. Incubação dos conjugados anti-IgM humano AF4647, anti-IgA humano AF488 e anti-IgG humano AF350 (A) Incubação dos conjugados anti-IgG humano AF350, anti-IgM humano AF647 e anti-IgA humano AF488 (B), incubação dos conjugados anti-IgA humano AF488, anti-IgG humano AF350 e anti-IgM humano AF647 e única etapa de incubação dos conjugados (C). Autoria própria.

4.6 Ensaios analíticos: Validação e aplicação do FISAt

Após as padronizações realizamos os ensaios para validação do FISAt baseado no protocolo Ep12-A2¹⁶⁰, descritos a seguir:

4.6.1 Ensaios para avaliar a Sensibilidade, Especificidade, Valor Preditivo Positivo e Valor Preditivo Negativo e concordância Kappa

Para esses ensaios realizamos o FISA triplex após padronizações e comparamos com o método automatizado Elecsys Toxo IgG/IgM, com o IFAT IgM realizados no setor de Imunologia do HCFMUSP e comparamos também com o ELISA IgG/IgM/IgA. Para essas comparações e análise da sensibilidade (Se) e especificidade (Sp) utilizamos uma classificação nas formas de expressão: ótima (Se>90% e Sp>95%), boa (Se>70% e Sp>80%) e moderada (Se<70% e Sp<80%). O coeficiente K (Cohen's Kappa coefficient) foi usado para comparar os resultados do método Elecsys Toxo IgM/IgG, ELISA IgG/IgM/IgA e IFAT IgM com o método triplex FISAt IgM/IgG/IgA. A melhor comparação entre o Elecsys Toxo ou ELISA ou IFAT com o FISAt aumenta o valor do coeficiente Kappa. A concordância perfeita é o coeficiente Kappa igual a 1 e concordância casual o coeficiente Kappa é igual a 0. Coeficiente Kappa entre 0.81 e 0.99 é considerado como uma concordância quase perfeita ou excelente, enquanto que o valor entre 0.61 e 0.80 indica substancial ou boa concordância e o valor entre 0.41 e 0.60 indica concordância moderada.¹⁶¹

4.6.2 Ensaio fluorescente triplex para detecção simultânea de IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii*

A sensibilização de microplacas pretas de 96 poços Costar de alta ligação (High Binding, Corning®) foi realizada com extrato total de taquizoítos de *T. gondii* com 100µL/poço diluído em tampão carbonato de sódio. Após incubação por 18 horas em câmara úmida a 4°C, as placas foram lavadas 5 vezes com PBST. A seguir, as microplacas foram bloqueadas com 250µL/poço com PBSTA (PBS + Tween-20® +

Albumina bovina 1%) e incubadas a 37°C durante 1h e lavadas. As amostras de soro foram diluídas em PBSTA e aplicadas 100µL/poço em triplicatas. Após essa etapa, o conjugado anti-IgM humano AF647 foi diluído em PBSTA na concentração de 1:400 e aplicado nos poços da microplaca, seguido de incubação por 1h a 37°C. Após esse procedimento, as microplacas foram lavadas e foi adicionado o conjugado anti-IgA humano AF488 diluído em PBSTA na concentração de 1:400, seguido de incubação durante 1h a 37°C e por fim após lavagens foi adicionado o conjugado anti-IgG humano AF350 também diluído em PBSTA na concentração de 1:400, como padronizado anteriormente. As microplacas foram incubadas durante 1h a 37°C e lavadas. Foi adicionado 100µL/poço de PBS e foi realizada a leitura no espectrofluorímetro nos filtros de excitação de 590nm BW 20nm e emissão de 670nm BW 40nm para a detecção de IgM anti-*T. gondii*, nos filtros de excitação de 485nm BW 20nm e emissão de 535nm BW 25nm para a detecção de IgA anti-*T. gondii*, e nos filtros de excitação de 360nm BW 35nm e emissão de 430nm BW 35nm para a detecção de IgG anti-*T. gondii*.

4.6.3 Ensaio imunoenzimático de fase sólida (ELISA) e ensaio de avidéz de IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii*.

A sensibilização de microplacas transparentes de 384 poços Costar (Corning®, Steube, NY, USA) foi realizada com extrato total de taquizoítos de *T. gondii* (50 µL/poço), diluído em tampão carbonato de sódio. As microplacas foram incubadas por 18 horas em câmara úmida a 4°C e em seguida, lavadas com PBST (PBS + Tween-20® 0,05 %). A seguir, as microplacas foram bloqueadas com leite desnatado Molico® 1 % (PBSTL) (120µL/poço), incubadas a 37°C durante 1h e lavadas. As amostras de soro foram diluídas, na concentração de 1:200 em PBSTL e aplicadas 50µL por poço, em triplicatas. As microplacas foram incubadas a 37°C por 1h e lavadas novamente. Para a detecção de anticorpos IgG foi adicionado o conjugado peroxidase anti-IgG humano (Sigma®, St Louis, MO, USA), diluído em PBSTL, na concentração de 1:5000 (50µL/poço). As microplacas foram incubadas a 37°C por mais 1h e lavadas. A seguir, foram aplicados 50µL/poço de solução cromógena TMB (3,3',5,5'-

tetramethylbenzidine, Sigma®). Após a incubação das microplacas a temperatura ambiente por 15 minutos ao abrigo da luz, a reação foi interrompida com HCL 4 N (25µL/poço). A leitura das placas foi realizada no espectrofluorímetro Multi-mode Microplate Reader FilterMax F5 (Molecular Devices®, Califórnia, USA) em filtro de absorbância de 450nm. Para a detecção de IgM e IgA foi utilizado o mesmo procedimento descrito anteriormente com adição do conjugado anti-IgM humano peroxidase (Sigma®) na diluição de 1:4000 ou anti-IgA humano peroxidase (Sigma®) na diluição de 1:500. E para a detecção da avidéz de anticorpos IgG anti-*T. gondii* foi usada a mesma metodologia descrita acima exceto pela adição de ureia 6M em duplicatas com período de incubação de 15 minutos a 37°C após a lavagem da etapa de adição e incubação dos soros, e pela adição de conjugado peroxidase anti-IgG humano (1:5000, Sigma®). O índice de avidéz (IA) em porcentagem foi calculado com o resultado de absorbância da leitura da placa lavada com o tampão com ureia 6M (ABS U+) dividido pela absorbância da leitura da placa sem a lavagem com o tampão de ureia (ABS U-) e multiplicado por 100, como indicado pela fórmula: $IA = [(ABS\ U+)/ (ABS\ U-)] \times 100$. Os resultados foram expressos em porcentagem de avidéz e os parâmetros foram: baixa avidéz - menor ou igual a 30 %, avidéz intermediária - entre 31-60 % e alta avidéz - maior que 60 %¹⁶².

4.6.4 Determinação do cut-off no ELISA e no FISAt para detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii*

Para o ELISA e para o FISAt, o *cut-off* foi obtido pelo cálculo da média das leituras dos soros negativos adicionado de dois desvios-padrão. Além disso, para o FISA triplex o *cut-off* também foi obtido através da análise da curva ROC com o Elecsys Toxo ou o ELISA como teste de referência.

4.6.5 Ensaio de estabilidade dos conjugados marcados com fluorocromos

Para esses ensaios realizamos o FISAt como descrito em 5.6.2, porém com algumas modificações na etapa de adição do anticorpo primário e sensibilização. Fizemos 3 testes de estabilidade dos conjugados fluorescentes: a) Avaliação da leitura da reatividade dos conjugados fluorescentes no espectrofluorímetro em até 24 horas após a finalização do FISAt com concentrações de IgG, IgM e IgA humano a partir de uma diluição seriada base 2 de 10µg/mL até 0.005µg/mL em tampão carbonato bicarbonato na etapa de sensibilização e b) Avaliação dos conjugados fluorescentes após 18 meses de marcação dos anticorpos secundários com os fluorocromos Alexa Fluor® também com concentrações de imunoglobulinas específicas humanas como descrito no item a.

4.6.6 Ensaio de reprodutibilidade

O ensaio de reprodutibilidade foi realizado no FISAt como descrito em 5.6.2 com 40 amostras de soro: 20 amostras positivas e 20 amostras negativas para IgG, IgM e IgA após 6 meses da realização do primeiro ensaio.

4.6.7 Ensaio de repetitividade

Para a análise de repetitividade realizamos 2 ensaios: um ensaio com amostras de soro positivas e negativas para a detecção de IgG, IgM e IgA anti- *T. gondii* e um ensaio com imunoglobulinas humanas IgG, IgM e IgA adsorvidas nas microplacas que foram utilizadas também como controle da reatividade dos conjugados fluorescentes anti-IgG humano AF350, anti-IgM humano AF647 e anti-IgA humano AF488.

4.6.7.1 Amostras de soro

As microplacas do FISAt foram sensibilizadas com 10µg/mL de extrato total de taquizoítos de *T. gondii* com 100µL/poço diluído em tampão carbonato bicarbonato de sódio, incubadas por 18 horas em câmara úmida a 4°C e lavadas 5 vezes com PBST. Foram adicionados um soro positivo e um negativo para IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* em 30 replicatas a 100µL/poço diluídos em PBSTA. A microplaca foi incubada a 37°C durante 1h e as etapas seguintes de adição dos conjugados, incubações e lavagens foram realizadas como descrito em 5.6.2.

4.6.7.2 Imunoglobulinas humanas IgG, IgM e IgA

As microplacas do FISAt foram sensibilizadas com imunoglobulinas humanas IgG purificada e IgM e IgA comerciais (Sigma®) como controle de reatividade de cada um dos conjugados produzidos (Figura 15). A análise dos controles foi realizada em 15 ensaios diferentes durante 6 dias: 2 ensaios por dia e no último dia foram feitos 3 ensaios. Foram adicionadas na etapa de sensibilização do FISAt, tres concentrações de imunoglobulinas humanas, e essas concentrações foram padronizadas e escolhidas de acordo com o valor de um soro fortemente positivo, fracamente positivo e negativo no FISAt na detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii*. As concentrações de IgG foram de 3µg/mL, 0.5µg/mL e 0.05µg/mL, de IgM foram 0.5µg/mL, 0.2µg/mL e 0.05µg/mL e IgA foram 0.1µg/mL, 0.05µg/mL e 0.005µg/mL (Figura 10). Os poços com os controles de IgG, IgM e IgA foram bloqueados com PBSTA. As microplacas foram lavadas e incubadas a 37 °C com os conjugados anti-IgG humano AF350, anti-IgM humano AF647 e anti-IgA humano AF488 separadamente e após novas lavagens foi adicionado em todos os poços PBS e realizada a letiura como descrito anteriormente.

A Controle da reação dos conjugados em imunoensaios convencionais

B Controle da reação dos conjugados no FISA triplex

Figura 15 - Representação esquemática de controles das reações de imunoensaios convencionais (**A**) com soros positivos (Pos) e soros negativos (Neg) e controles utilizados para a reatividade dos conjugados fluorescentes anti-IgG humano (azul) anti-IgM humano (vermelho) e anti-IgA humano (verde) com concentrações de imunoglobulinas humanas IgG, IgM e de IgA (**B**). Autoria própria.

4.7 Controle de qualidade interno do FISAt

A partir dos resultados obtidos no ensaio anterior de repetitividade de imunoglobulinas humanas purificadas IgG, IgM e IgA em concentrações escolhidas como controles positivos e negativos em 15 ensaios diferentes, realizamos um teste de controle de qualidade interno do FISAt. Esse teste foi realizado através do mapa de Levey Jennings a partir dos resultados obtidos nas dosagens diárias dos controles positivos e negativos compreendidos entre ± 3 desvios-padrão.¹⁶³

4.8 Análise estatística

A análise da curva padrão de unidades arbitrárias de fluorescência em relação à quantidade de imunoglobulinas foi feita pelo teste de regressão não-linear e o teste de reprodutibilidade foi feito pela regressão linear. A comparação de valores quantitativos foi feita pelo teste ANOVA ou pelo teste t, verificando-se a homogeneidade de variâncias. Foram consideradas significativas as comparações cuja probabilidade de igualdade foi menor que 5 % ($p < 0.05$). O coeficiente de variação (CV) foi estabelecido como limite $CV < 25\%$ de acordo com o protocolo de validação. Os testes mencionados anteriormente e os índices de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e a curva ROC foram feitos utilizando o pacote estatístico GraphPad Prism 5.0 (GraphPad software, Inc San Diego, Califórnia, USA). O coeficiente Kappa foi realizado no pacote estatístico BioEstat 5.0 (BioEstat software).

5 RESULTADOS

5.1 Ensaio pré-analítico

Caracterização dos fluorocromos, análise de interferência dos filtros para detecção, padronização dos filtros para detecção dos fluorocromos, padronização das concentrações de conjugados com anticorpos específicos comerciais e soro humano e escolha do melhor conjugado para detecção de anticorpos IgM.

5.1.1 *Caracterização dos conjugados fluorescentes*

Antes de iniciar as padronizações da técnica imunofluorescente de fase sólida, testamos a interferência da largura da banda passante (BW) dos filtros escolhidos para excitação e emissão dos fluorocromos e a interferência da detecção de cada um dos fluorocromos pelos filtros não específicos. Na análise dos filtros, observamos que não houve interferência de variação de banda entre os filtros de excitação e seus correspondentes de emissão utilizados para cada fluorocromo (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Seleção do comprimento de onda dos filtros de excitação e emissão utilizados para os fluorocromos AF350, AF647 e AF488. **A:** Filtro de excitação 350nm com variação de banda (BW) de 35nm e filtro de emissão de 460nm com BW de 35nm. **B:** Filtro de excitação 595nm com BW de 8nm e emissão 670nm com BW de 40nm. **C:** Filtro de excitação 485nm com BW de 20nm e emissão de 535nm com BW de 25nm.

Na análise de leitura dos fluorocromos AF350, AF488 e AF647 com os filtros de excitação e emissão utilizados, observa-se que os fluorocromos só foram detectados pelo seu filtro específico de excitação e emissão: o fluorocromo AF350 excita a 360nm e emite a 430nm (Gráfico 2A), o fluorocromo AF488 excita a 488nm e emite a 535nm (Gráfico 2B) e o fluorocromo AF647 excita a 595nm e emite a 670nm (Gráfico 2C).

Gráfico 2 - Análise de Interferência de detecção dos fluorocromos Alexa Fluor 350 (A) Alexa Fluor 647 (B) e Alexa Fluor 488 (C). Detecção dos fluorocromos pelos filtros de Excitação: 360nm, 595nm e 488nm e Emissão: 430nm, 670nm e 535nm.

5.1.2 *Purificação dos anticorpos marcados com fluorocromos*

Na cromatografia de exclusão molecular dos anticorpos marcados com fluorocromos foram coletadas 25 frações de 1mL. Os perfis cromatográficos estão representados no Gráfico 4. A taxa média molar da quantidade de fluorocromo por anticorpo (F/P) do maior pico cromatográfico (tubo 6) foi de 16.80 moles de AF350 por mol de anti-IgG humano conjugado. Entre as frações 10 e 15 observa-se que houve um aumento da absorbância a 340nm, detectando a separação do fluorocromo excedente. A fração 6 foi utilizada nos ensaios imunofluorescentes (Gráfico 3A). Já a marcação do anti-IgM humano com AF647 obteve uma taxa média molar de fluorocromo por anticorpo (F/P) do maior pico cromatográfico observado (tubo 6) de 3.73 moles de AF647 por mol de anticorpo. Houve uma pequena quantidade de fluorocromo excedente que podemos observar entre as frações 9 e 11 e a fração 6 foi utilizada nos ensaios imunofluorescentes (Gráfico 3B). Após a marcação e purificação do anti-IgA humano com o fluorocromo AF488 observou-se uma taxa média molar de fluorocromo por anticorpo (F/P) do maior pico cromatográfico (tubo 5) de 4.28 moles de AF488 por mol de anticorpo. Entre as frações 8 e 15 podemos observar o AF488 excedente. A fração 5 foi utilizada nos ensaios imunofluorescentes (Gráfico 3C).

Gráfico 3 - Perfis cromatográficos de exclusão molecular dos anticorpos marcados com fluorocromos em coluna Sephadex G-25-40; 10-40 μ M, sob o fluxo de 1mL por minuto e frações de 1mL. **A:** Conjugado anti-IgG humano após marcação com AF350. **B:** Conjugado anti-IgM humano após marcação com AF647. **C:** Conjugado anti-IgA humano após marcação com AF488.

5.1.3 Análise da eficiência dos conjugados anti-IgG humano AF350, anti-IgM humano AF647 e anti-IgA humano AF488 com diferentes concentrações de imunoglobulinas de classe IgG, IgM e IgA comerciais

Para o conjugado anti-IgG humano marcado com AF350, observa-se alta correlação de Pearson com $r^2 \geq 90\%$ em todas as diluições do conjugado para reatividade à IgG adsorvida em microplaca (Gráfico 4A). Para o conjugado anti-IgM humano marcado com AF647 observa-se também uma alta correlação de Pearson, mantendo o perfil de reatividade à IgM adsorvida em microplaca com $r^2 \geq 90\%$ (Gráfico 4B). E para o conjugado anti-IgA humano marcado com AF488 observa-se que também se manteve o mesmo perfil de reatividade às concentrações de imunoglobulina de classe A humana, com $r^2 \geq 90\%$ até a diluição de 1/1600 (Gráfico 4C).

Gráfico 4 - Reatividade em unidades arbitrárias de fluorescência dos conjugados purificados em relação às diferentes concentrações de imunoglobulinas humanas específicas adsorvidas na microplaca. **A:** conjugado anti-IgG humano AF350. **B:** conjugado anti-IgM humano AF647. **C:** Conjugado anti-IgA humano AF488.

5.1.4 *Comparação entre a reatividade do conjugado comercial peroxidase e o conjugado marcado com fluorocromos em relação às imunoglobulinas comerciais*

Na comparação dos conjugados comerciais peroxidase e conjugados marcados com fluorocromos observa-se que ambos detectaram diferentes concentrações de imunoglobulinas específicas adsorvidas na microplaca. A detecção das imunoglobulinas com o conjugado anti-IgG humano marcado com AF350 apresentou um r^2 de 0.91 e a detecção de IgG pelo conjugado comercial peroxidase mostrou um r^2 de 0.99. Os dois conjugados conseguiram diferenciar a detecção de imunoglobulinas específicas até a concentração de 30ng/mL (Gráfico 5A). A comparação entre os conjugados anti-IgM humanos comercial e marcado com o fluorocromo AF647 mostrou similaridade entre a detecção de imunoglobulinas específicas, com maior r^2 para detecção com o conjugado fluorescente de 0.99. A detecção com o conjugado comercial obteve um r^2 de 0.97 e para ambos os conjugados houve detecção de imunoglobulina específica até a concentração de 15ng/mL (Gráfico 5B). A comparação entre os conjugados anti-IgA humano comercial e marcado com AF488 mostrou também uma similaridade na detecção de imunoglobulinas específicas. Para o conjugado comercial obteve-se um r^2 de 0.97 e para o conjugado fluorescente o perfil de detecção das imunoglobulinas mostrou um r^2 de 0.99. Ambos conjugados detectaram imunoglobulina A humana até a concentração de 15ng/mL (Gráfico 5C).

Gráfico 5 - Comparação da reatividade dos conjugados marcados com peroxidase e fluorescência a partir de concentrações seriadas de imunoglobulina humana específica. **A:** anti-IgG humano. **B:** anti-IgM humano. **C:** anti-IgA humano.

5.1.5 Padronização da concentração de soro e conjugados no FISA isolado

Nesse ensaio, observa-se que em todas as concentrações testadas o conjugado anti-IgG humano AF350 foi capaz de discriminar soros positivos e negativos (Gráfico 6). Observa-se uma redução da intensidade de fluorescência, sobretudo, na detecção dos soros positivos conforme maiores diluições de conjugado e soro. Apenas na concentração de conjugado 1:400, a média da reatividade dos soros positivos na diluição de 1:100 foi similar à diluição de 1:200 (Gráfico 6C).

Gráfico 6 - Padronização da diluição do conjugado anti-IgG humano marcado com AF350 com AF350 com 4 soros positivos e 2 negativos para anticorpos IgG anti-*T. gondii* em duplicatas. **A:** concentração do conjugado 1:100. **B:** concentração do conjugado 1:200. **C:** concentração do conjugado 1:400. **D:** concentração do conjugado 1:800. Diluição 1:100 dos soros positivos (pos 1:100); diluição 1:100 dos soros negativos (neg 1:100); diluição 1:200 dos soros positivos (pos 1:200) e diluição 1:200 dos soros negativos (neg 1:200).

Para a detecção de anticorpos IgM anti-*T.gondii*, o conjugado anti-IgM humano marcado com AF647 não discriminou os soros positivos e negativos apenas na concentração de conjugado 1.800 e soro 1.200 (Gráfico 7).

Gráfico 7 - Padronização da diluição do conjugado anti-IgM humano marcado com AF647 com 4 soros positivos e 2 negativos para anticorpos IgM anti-*T.gondii* em duplicatas. **A:** concentração do conjugado 1:100. **B:** concentração do conjugado 1:200. **C:** concentração do conjugado 1:400. **D:** concentração do conjugado 1:800. Diluição 1:100 dos soros positivos (pos 1:100); diluição 1:100 dos soros negativos (neg 1:100); diluição 1:200 dos soros positivos (pos 1:200) e diluição 1:200 dos soros negativos (neg 1:200).

Na detecção de anticorpos IgA anti-*T.gondii*, houve discriminação entre soros positivos e negativos em todas as concentrações de soro e conjugados sem grandes variações na média de detecção das amostras positivas na diluição de soro 1:100 e conjugados 1:400 e 1:800 (Gráfico 8C e 8D).

Gráfico 8 - Padronização da diluição do conjugado anti-IgA humano marcado com AF488 com 3 soros positivos e 2 negativos para anticorpos IgA anti-*T. gondii* em duplicatas. **A:** concentração do conjugado 1:100. **B:** concentração do conjugado 1:200. **C:** concentração do conjugado 1:400. **D:** concentração do conjugado 1:800. Diluição 1:100 dos soros positivos (pos 1:100); diluição 1:100 dos soros negativos (neg 1:100); diluição 1:200 dos soros positivos (pos 1:200) e diluição 1:200 dos soros negativos (neg 1:200).

Nos ensaios imunofluorescentes realizados com os conjugados de forma isolada, observamos que todos os conjugados marcados e purificados foram eficientes na detecção de anticorpos específicos, com discriminação entre amostras positivas e negativas. Utilizando o critério baseado na menor concentração de conjugado e soro que proporcionou discriminação entre os soros positivos e negativos, em todos os conjugados avaliados, a diluição ótima dos conjugados foi de 1:400 e soro 1:200. Essas

concentrações foram utilizadas nos próximos ensaios para a padronização da detecção conjunta de IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* no ensaio fluorescente triplex de fase sólida (FISAt).

5.1.6 Padronização da ordem de adição dos conjugados fluorescentes no FISAt

No ensaio de padronização das etapas de adição dos conjugados no ensaio fluorescente triplex, em relação ao conjugado anti-IgA humano, observamos que para os soros IgG+IgM+IgA+ ($p=0.97$), IgG+IgM+IgA- ($p=0.63$) e IgG-IgM-IgA- ($p=0.77$), a condição 1 foi a que mais se aproximou da reatividade das amostras na condição isolada; já para os soros IgG+IgM-IgA- foi a condição 3 (Gráfico 9C). Para o conjugado anti-IgM humano, observamos que para os todos os soros, a condição 1 foi a que mais se aproximou da reatividade das amostras na condição isolada e os soros IgG-IgM-IgA-, além da condição 1 ($p=1.00$), a condição 4 ($p=1.00$) obteve os mesmos resultados da condição isolada (Gráfico 9B). Para o conjugado anti-IgG humano, observamos que para os soros IgG+IgM+IgA+, a condição 1 ($p=0.63$) foi a que mais se aproximou da reatividade das amostras na condição isolada; para os soros IgG+IgM+IgA- foi a condição 3 ($p=0.24$) e para os soros IgG+IgM-IgA- ($p=0.75$) e soros IgG-IgM-IgA- ($p=0.50$) foi a condição 4 (Gráfico 9A).

Na análise de interferência da reatividade dos conjugados adicionados por diferentes formas, a condição 1: incubação separada de anti-IgM humano AF647, anti-IgA humano AF488 e anti-IgG humano AF350, adicionados nesta ordem obteve a reatividade de amostras de soro mais próximas ($0.13 < p \leq 1.00$) à reatividade dos mesmos soros nas análises isoladas para todos os conjugados avaliados. Com isso, a condição de escolha para os próximos ensaios, foi a condição 1. A condição 4: conjugados diluídos no mesmo poço e adicionados ao mesmo tempo, obteve resultados mais próximos nos soros IgG-IgM-IgA- para os conjugados anti-IgM humano ($p=1.00$) e anti-IgG humano ($p=0.7527$), diferença estatística para algumas amostras detectadas apenas pelo conjugado anti-IgG humano, e não discriminou totalmente os soros positivos e negativos apenas para o conjugado anti-IgA humano.

Gráfico 9 - Comparação da reatividade do anti-IgG humano AF350 (**A**), anti-IgM humano AF647 (**B**) e anti-IgA humano AF488 (**C**) no FISAt com todas as condições de adição dos conjugados: Condição isolada (i); incubação dos conjugados anti-IgM humano AF647, anti-IgA humano AF488 e anti-IgG humano AF350 (1); anti-IgG humano AF350, anti-IgM humano AF647 e anti-IgA humano AF488 (2) e anti-IgA humano AF488, anti-IgG humano AF 350 e anti-IgM humano AF647 (3) cada adição seguida de incubação e lavagem; e única etapa de incubação dos conjugados (4). 3 amostras de soro IgG, IgM e IgA positivos (Soros IgG+ IgM+ IgA+); 3 amostras de soro IgG e IgM positivas e IgA negativas (Soros IgG+ IgM+ IgA-); 3 amostras de soro IgG positivas e IgM e IgA negativas (Soros IgG+ IgM- IgA-); 3 amostras de soro IgG, IgM e IgA negativas: a faixa sombreada é a média desses soros negativos em todas as incubações para cada conjugado * $p < 0.05$.

Após padronização da metodologia de adição dos conjugados, e escolha da condição 1, realizamos a detecção conjunta de IgG, IgM e IgA em 20 amostras de soro (Gráfico 10). Observou-se que a comparação entre o FISA isolado e o triplex resultou em 100% de concordância e que há uma variação na intensidade de fluorescência avaliada em cada amostra de soro quando comparados o FISA isolado e o FISA triplex, porém essa variação não interfere na discriminação entre as amostras positivas e negativas para IgG, IgM ou IgA anti-*T. gondii* (Gráfico 11).

Gráfico 10 - Reatividade de amostras de soro na detecção de IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* pelos conjugados: anti-IgG humano AF350 (quadrado), anti-IgM humano AF647 (círculo) e anti-IgA humano AF488 (losango). FISA isolado (símbolo fechado); FISA triplex (símbolo aberto). 3 amostras de soro IgG, IgM e IgA positivas (Soros IgG+ IgM+ IgA+); 7 amostras de soro IgG e IgM positivas e IgA negativas (Soros IgG+ IgM+ IgA-); 5 amostras de soro IgG positivas e IgM e IgA negativas (Soros IgG+ IgM- IgA-); 5 amostras de soro IgG, IgM e IgA negativas (Soros IgG- IgM- IgA-). As interrupções nos eixos separam os soros positivos dos negativos para anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii*.

Gráfico 11 - Interferência da leitura de cada amostra de soro no FISA isolado (Isolado) e no FISA triplex (Triplex) para detecção de anticorpos IgG (A), IgM (B) e IgA (C) anti-*T. gondii*. As interrupções nos eixos separam os soros positivos dos soros negativos para cada anticorpo específico.

Após as análises de interferência da leitura simultânea dos anticorpos, iniciamos a padronização do FISAt em placas de 384 poços.

5.1.7 Padronização da concentração de antígeno e proteína de bloqueio no FISAt em placas de 384 poços

5.1.7.1 Bloqueio com leite

Nos ensaios com 1µg/mL de antígeno e bloqueio com leite em placas de 384 poços, não houve discriminação de todos os soros positivos e negativos para anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* em nenhuma das diluições de soro testadas. Mesmo assim, observamos discriminação entre a maioria das amostras positivas e negativas para anticorpos IgA anti-*T. gondii* nas diluições de 1:100 e 1:200 de soro. (Gráfico 12).

Gráfico 12 - FISAAt com 1µg/mL de antígeno. Reatividade das amostras de soro positivas e negativas com o conjugado anti-IgG humano (**A**), anti-IgM humano (**B**) e anti-IgA humano (**C**). 9 amostras de soro IgG positivas e 3 amostras IgG negativas, 6 amostras de soro IgM positivas e 6 amostras IgM negativas e 3 amostras de soro IgA positivas e 9 amostras IgA negativas todas as amostras diluídas nas concentrações de 1:100 (pos 1:100; neg 1:100) e 1:200 (pos 1:200; neg 1:200).

Nos ensaios FISAAt com 2µg/mL de extrato total de *T. gondii*, observa-se que houve discriminação das amostras positivas e negativas apenas para anticorpos IgG na concentração de soro 1:100 (Gráfico 13).

Gráfico 13 - FISAt com 2µg/mL de antígeno. Reatividade das amostras de soro positivas e negativas com o conjugado anti-IgG humano (A), anti-IgM humano (B) e anti-IgA humano (C). 9 amostras de soro IgG positivas e 3 amostras IgG negativas, 6 amostras de soro IgM positivas e 3 amostras IgM negativas e 3 amostras de soro IgA positivas e 9 amostras IgA negativas, todas as amostras diluídas nas concentrações de 1:100 (pos 1:100; neg 1:100) e 1:200 (pos 1:200; neg 1:200) e em duplicatas

Nos ensaios FISAt com 3µg/mL de extrato total de *T. gondii*, observa-se que houve discriminação entre os soros positivos e negativos para anticorpos IgG e IgM e IgA apenas na concentração de soro 1:100 (Gráfico 14).

Gráfico 14 - FISAt com 3 µg/mL de antígeno. Reatividade das amostras de soro positivas e negativas com o conjugado anti-IgG humano (A), anti-IgM humano (B) e anti-IgA humano (C). 9 amostras de soro IgG positivas e 3 amostras IgG negativas, 6 amostras de soro IgM positivas e 3 amostras IgM negativas e 9 amostras de soro IgA positivas e 3 amostras IgA negativas, todas as amostras diluídas nas concentrações de 1:100 (pos 1:100; neg 1:100) e 1:200 (pos 1:200; neg 1:200) e em duplicatas.

5.1.7.2 Bloqueio com albumina bovina (BSA)

Nos ensaios FISAt com bloqueio com albumina bovina e 1µg/mL de extrato total de *T. gondii*, observa-se que assim como nos ensaios com bloqueio com leite, não houve discriminação de soros positivos e negativos para anticorpos IgG, IgM e IgA, em nenhuma das diluições 1:100 e 1:200 (Gráfico 15).

Gráfico 15 - FISAt com 1 µg/mL de antígeno. Reatividade das amostras de soro positivas e negativas com o conjugado anti-IgG humano (A), anti-IgM humano (B) e anti-IgA humano (C). 9 amostras de soro IgG positivas e 3 amostras IgG negativas, 6 amostras de soro IgM positivas e 3 amostras IgM negativas e 3 amostras de soro IgA positivas e 3 amostras IgA negativas, todas as amostras diluídas nas concentrações de 1:100 (pos 1:100; neg 1:100) e 1:200 (pos 1:200; neg 1:200) e em duplicatas.

Nos ensaios FISAt com 2 µg/mL de antígeno, observa-se que apenas houve discriminação entre as amostras de soro positivas e negativas para anticorpos IgA anti-*T. gondii* nas duas diluições de soro testadas (Gráfico 16).

Gráfico 16 - Ensaio imunofluorescente triplex com $2\mu\text{g/mL}$ de antígeno. Reatividade das amostras de soro positivas e negativas com o conjugado anti-IgG humano (A), anti-IgM humano (B) e anti-IgA humano (C). 9 amostras de soro IgG positivas e 3 amostras IgG negativas, 6 amostras de soro IgM positivas e 3 amostras IgM negativas e 3 amostras de soro IgA positivas e 3 amostras IgA negativas, todas as amostras diluídas nas concentrações de 1:100 (pos 1:100; neg 1:100) e 1:200 (pos 1:200; neg 1:200) e em duplicatas.

Nos ensaios FISAt com $3\mu\text{g/mL}$ de antígeno, houve discriminação entre as amostras positivas e negativas para anticorpos IgG nas diluições 1:100 e 1:200 de soro, para anticorpos IgM na diluição de soro 1:200 e para anticorpos IgA anti- *T. gondii* nas diluições de 1:100 e 1:200 de soro (Gráfico 17).

A comparação entre a melhor condição de bloqueio com leite (soros 1:100 e antígeno a $3\mu\text{g/mL}$) com a condição escolhida para o bloqueio com albumina bovina (soros 1:200 e antígeno a $3\mu\text{g/mL}$) observamos que para os soros IgG positivos houve

um aumento significativo da intensidade de fluorescência ($p < 0.05$), porém na comparação entre os valores IgG negativos, o bloqueio com leite permitiu uma discreta diminuição da fluorescência de fundo ($p < 0.05$). Já em relação aos valores de intensidade de fluorescência para os soros IgM positivos ($p = \text{NS}$) e negativos ($p = \text{NS}$) e para os soros IgA positivos ($p = \text{NS}$) e negativos ($p = \text{NS}$) não houve diferença estatística. Além disso, o bloqueio com albumina bovina proporcionou discriminação de soros positivos e negativos com utilização de menores quantidades de soro (1:200). Com isso, consideramos que $3\mu\text{g/mL}$ de antígeno, bloqueio com albumina bovina e diluição de soro 1:200 foi a condição ideal para a realização do FISAt para detecção simultânea de IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* em placas de 384 poços.

Gráfico 17 - Ensaio imunofluorescente triplex com 3 µg/mL de antígeno. Reatividade das amostras de soro positivas e negativas com o conjugado anti-IgG humano (A), anti-IgM humano (B) e anti-IgA humano (C). 9 amostras de soro IgG positivas e 3 amostras IgG negativas, 6 amostras de soro IgM positivas e 3 amostras IgM negativas e 3 amostras de soro IgA positivas e 3 amostras IgA negativas, todas as amostras diluídas nas concentrações de 1:100 (pos 1:100; neg 1:100) e 1:200 (pos 1:200; neg 1:200) e em duplicatas.

5.1.8 Padronização da concentração de fluorocromo AF647 marcado em anti-IgM humano para aumento da intensidade do sinal de fluorescência.

A partir dos resultados obtidos da reatividade das amostras de soro na placa de 384 poços, observa-se uma queda nas unidades arbitrárias de fluorescência comparada a reatividade dos conjugados em placas de 96 poços já esperada pela menor utilização de amostras, antígenos e conjugados. Observamos também, baixa intensidade do sinal e menor discriminação em unidades arbitrárias de fluorescência entre os soros positivos e negativos para anticorpos IgM anti-*T. gondii* quando comparados com a discriminação entre os soros positivos e negativos para anticorpos IgG e IgA. Nas placas de 96 poços, a menor discriminação entre os soros positivos e negativos observada entre as amostras selecionadas para as padronizações na detecção de anticorpos IgG (conjugado anti-IgG humano AF350) foi de cerca de 6000 unidades arbitrárias de fluorescência (u.a.f.), para a detecção de anticorpos IgA (conjugado anti-IgA AF488) foi de 2700 u.a.f., e para anticorpos IgM (conjugado anti-IgM AF647), um valor muito menor de cerca de 60 u.a.f, quando comparado com os outros conjugados (Gráfico 18). Nas placas de 384 poços, a menor discriminação entre os soros positivos e negativos observada entre as amostras selecionadas para as padronizações na detecção de anticorpos IgG foi de 872 unidades arbitrárias de fluorescência (u.a.f.), para a detecção de anticorpos IgA foi de 424 u.a.f., e para anticorpos IgM foi de 29 u.a.f.

Gráfico 18 - Discriminação entre soros positivos e negativos para anticorpos anti-*T. gondii*. Comparação entre o menor valor em unidades arbitrárias de fluorescência (u.a.) da reatividade de uma amostra de soro positiva e maior valor de fluorescência de uma amostra de soro negativa entre os soros controles detectados pelos conjugados marcados com AF350, AF488 e AF647.

No ensaio de comparação entre as diferentes metodologias testadas para marcação de anticorpos anti-IgM humano com o fluorocromo AF647, observou-se que quando realizada a conjugação 2 (menores quantidades de moléculas de fluorocromo por molécula de anticorpo) foi possível detectar imunoglobulinas comerciais (Gráfico 19A), porém com menor discriminação entre as amostras positivas e negativas do que a conjugação inicial (Gráfico 19B). Quando realizada a conjugação 3, observou-se que não houve a detecção de imunoglobulinas a partir da concentração de 1.21µg/mL (Gráfico 19C). Já os conjugados produzidos pelas outras metodologias avaliadas, detectaram IgM até a concentração de 9ng/mL.

Gráfico 19 - Comparação da reatividade do anti-IgM humano marcado com AF647 em 3 conjugações diferentes concentrações seriadas de imunoglobulina M humana (A). Reatividade de amostras de soro positivas e negativas para anticorpos IgM anti-*T. gondii* com conjugados marcados por diferentes metodologias. Soros IgM positivos (Conj 1 pos) e IgM negativos (Conj 1 neg) detectados pelo conjugado obtido da primeira metodologia descrita, baseada no excesso molar. Soros IgM positivos (Conj 2 pos) e IgM negativos (Conj 2 neg) detectados pelo conjugado obtido da segunda metodologia realizada, baseada na ótima proporção molar F/P (B).

Na tentativa de aumentar o sinal de detecção das amostras IgM anti-*T. gondii*, avaliamos também a reatividade das amostras de soro com anti-IgM humano marcado com NHS-Rodamina (Pierce®) utilizado em estudo anterior, não interferente com os outros filtros utilizados para os conjugados Alexa Fluor® (Gráfico 20) e produzidos com a mesma metodologia de marcação da conjugação 1 do anti-IgM humano com AF647.

Gráfico 20 - Detecção do fluorocromo NHS-Rodamine® pelos filtros de Excitação: 360nm, 595nm, 488nm e 595nm e Emissão: 430nm, 670nm e 535nm e 670nm.

Observa-se que a intensidade de fluorescência foi maior quando ocorre a detecção pelo conjugado anti-IgM humano-NHS-Rodamina comparada com a detecção pelo conjugado anti-IgM humano marcado com AF647 pela conjugação 1, porém a menor discriminação entre os soros positivos e negativos foi de 43 unidades arbitrárias de fluorescência, similar à menor discriminação pelo conjugado anti-IgM

humano AF647 (Gráfico 21). O uso do conjugado anti-IgM humano NHS-Rodamina pode ser aprimorado, com novas padronizações e concentrações de uso em microplacas de 384 poços. Além disso, não houve detecção do NHS-Rodamina pelos outros filtros utilizados para detecção dos fluorocromos da linha Alexa Fluor. Com isso, novas abordagens fluorescentes podem ser realizadas com 4 detecções distintas em uma única reação.

Gráfico 21 - Diferença da reatividade do conjugado anti-IgM humano AF647 e do conjugado anti-IgM humano NHS-Rodamina na detecção de amostras positivas e negativas em duplicatas para anticorpos IgM anti-*T. gondii* no FISAt. Soros IgM positivos detectados pelo AF647 (AF647 pos). Soros IgM negativos detectados pelo AF647 (AF647 neg). Soros IgM positivos detectados pelo NHS-Rodamina (NHS-Rod pos). Soros IgM negativos detectados pelo NHS-Rodamina (NHS-Rod neg).

5.1.9 Padronização dos filtros de excitação de fluorocromos para uso em ensaios fluorescentes de fase sólida.

Analizamos a detecção do fluorocromo AF647 por outros dois filtros de excitação (Ex 590nm BW 20nm e Ex 615nm BW 30nm) com uma largura de banda passante um pouco maior que a do filtro anterior (BW 8nm) (Gráfico 22A), não interferente com o filtro de emissão (Gráfico 22B) e também com espectro de excitação também não interferente com os outros fluorocromos utilizados (Gráfico 23A).

Gráfico 22 - Interferência dos comprimentos de onda dos filtros testados para excitação do AF647 (A). Comprimento de onda do filtro de excitação 590nm com variação da banda passante (BW) de 20nm e do filtro de emissão 670nm com variação da BW de 40nm (B).

A maior largura da banda passante (BW 20nm) possibilitou uma maior energia de excitação, o que foi suficiente para aumentar a intensidade de fluorescência na detecção do fluorocromo AF647 (Gráfico 23B) e a discriminação entre os soros positivos e negativos para anticorpos IgM anti-*T.gondii* (Gráfico 24) (300 u.a.f - Ex615nm, 29 u.a.f.- Ex595nm).

Gráfico 23 - Detecção dos fluorocromos Alexa Fluor[®] 488, Alexa Fluor[®] 350 e Alexa Fluor[®] 647 pelos filtros de excitação 590nm BW20nm e emissão 670nm (A). Fluorescência do Alexa Fluor[®] 647 detectada pelo filtro de excitação 595nm BW 8nm e 590nm BW 20nm (B).

Gráfico 24 - Diferença da reatividade do conjugado anti-IgM humano AF647 na detecção de amostras positivas e negativas em duplicatas para anticorpos IgM anti-*T. gondii* no FISA triplex. Soros IgM positivos detectados pelo filtro de excitação padronizar 595nm BW8nm (Ex 595.8 pos). Soros IgM negativos detectados pelo filtro de Excitação 595nm BW 8nm (Ex 595.8 neg). Soros IgM positivos detectados pelo filtro de Excitação 590nm BW 20nm (Ex 590.20 pos). Soros IgM negativos detectados pelo filtro de Excitação 590nm BW 20nm (Ex 590 neg).

A padronização do uso dos filtros também resultou na detecção de outro fluorocromo disponível comercialmente, o Alexa Fluor® 568. O filtro para detecção deste fluorocromo escolhido de acordo com o espectro máximo de excitação (Ex 578nm BW8nm) também não possibilitou a leitura devido à sobreposição do comprimento de onda desse filtro com o filtro de emissão e, com isso, testamos outros filtros de excitação para o uso deste fluorocromo (Ex 535nm BW25nm e 565nm BW30nm) (Gráfico 25A).

Gráfico 25 - Interferência dos filtros de excitação para o fluorocromo AF568 no filtro de emissão (A). Comprimento de onda dos filtros de excitação 535nm com variação da banda passante (BW) de 25nm e 585nm com BW de 8nm e do filtro de emissão 595nm com variação da BW de 35nm (B).

O filtro de excitação 535nm BW 25nm apesar de não se aproximar do espectro máximo de excitação do fluorocromo, não interferiu com o espectro de emissão correspondente de 595nm BW5nm (Gráfico 25B) e aumentou a intensidade de fluorescência detectada para este fluorocromo (Gráfico 26).

Gráfico 26 - Intensidade de fluorescência do Alexa Fluor® 568 detectada pelo filtro de excitação dos outros fluorocromos (A). Intensidade de fluorescência do AF568 detectada pelos filtros de excitação 585nm BW8nm e 535nm BW25nm, ambos com emissão 595nm (B).

Além disso, este fluorocromo não foi detectado pelos filtros de excitação 350nm e 488nm e emissão 430nm e 535nm, utilizados para os outros fluorocromos escolhidos para o FISAt, apesar de observarmos uma pequena detecção deste fluorocromo pelo filtro de excitação 590nm e emissão 670nm utilizado para o AF647 (Gráfico 26A).

Gráfico 27 - Diferença da reatividade do conjugado anti-IgM humano AF647 e do conjugado anti-IgM humano AF568 na detecção de amostras positivas e negativas em duplicatas para anticorpos IgM anti-*T. gondii*. Soros IgM positivos detectados pelo AF647 (AF647 pos). Soros IgM negativos detectados pelo AF647 (AF647 neg). Soros IgM positivos detectados pelo AF568 (AF568 pos). Soros IgM negativos detectados pelo AF568 (AF568 neg).

Apesar da eficiência da detecção de anticorpos IgM pelo conjugado anti-IgM humano marcado com AF568 com discriminação entre as amostras positivas e negativas (Gráfico 27), observa-se menor intensidade de fluorescência na detecção dos soros IgM positivos e menor discriminação entre as amostras positivas e negativas (44

u.a.f), quando comparados com a detecção pelo conjugado anti-IgM humano marcado com AF647 utilizando o filtro 590nm BW20nm (300 u.a.f.). Com isso, optamos por continuar as padronizações do teste utilizando o anticorpo anti-IgM humano conjugado com o fluorocromo AF647 com detecção pelos filtros de excitação 590nm BW20nm e emissão 670nm BW40nm.

5.1.10 Reavaliação da leitura em unidades arbitrárias de fluorescência da reatividade de amostras de soro positivas e negativas para anticorpos IgG, IgM e IgA anti-T. gondii no FISA triplex nas placas de 384 poços.

Após a escolha de marcação do anti-IgM humano e padronização do filtro, testamos uma maior quantidade de amostras IgG, IgM e IgA positivas e negativas na placa de 384 poços e observamos que não foi possível a discriminação total das amostras positivas e negativas para anticorpos IgG, IgM e IgA nas concentrações de 3µg/mL (Gráfico 28), 6µg/mL (Gráfico 29) e 12µg/mL (Gráfico 30) de antígeno utilizadas nos ensaios. Apesar disso, observamos uma diferença significativa entre a detecção de amostras positivas e negativas para anticorpos IgM nas concentrações de antígeno a 3µg/mL ($p<0.0001$) e a 6µg/mL ($p<0.05$) e para anticorpos IgA a 3µg/mL ($p<0.05$) e a 6µg/mL ($p<0.05$), o que não foi possível observar na detecção de anticorpos IgG, que não apresentou diferença estatística entre as amostras positivas e negativas nas concentrações de antígeno a 3µg/mL ($p=NS$) e a 6µg/mL ($p=NS$). A maior quantidade de antígeno utilizado (12µg/mL) foi essencial para a discriminação das amostras de soro positivas e negativas tanto na detecção de anticorpos IgG ($p<0.001$), quanto de anticorpos IgM ($p<0.001$) e IgA ($p<0.005$) anti-*T. gondii*. Com isso, foi possível verificar que quanto maior a concentração de antígeno melhor a discriminação das amostras IgG positivas e negativas no FISA triplex.

Gráfico 28 - FISAt em microplacas de 384 poços com 3 µg/mL de antígeno. Reatividade das amostras de soro positivas e negativas com o conjugado anti-IgG humano (**A**), anti-IgM humano (**B**) e anti-IgA humano (**C**). 8 amostras de soro IgG, IgM e IgA positivas (pos) e 8 amostras IgG, IgM e IgA negativas (neg) em duplicatas.

Gráfico 29 - FISAt em microplacas de 384 poços com 6 $\mu\text{g/mL}$ de antígeno. Reatividade das amostras de soro positivas e negativas com o conjugado anti-IgG humano (**A**), anti-IgM humano (**B**) e anti-IgA humano (**C**). 8 amostras de soro IgG, IgM e IgA positivas (pos) e 8 amostras IgG, IgM e IgA negativas (neg) em duplicatas.

Gráfico 30 - FISAt em microplacas de 384 poços com 12 $\mu\text{g/mL}$ de antígeno. Reatividade das amostras de soro positivas e negativas com o conjugado anti-IgG humano (A), anti-IgM humano (B) e anti-IgA humano (C). 8 amostras de soro IgG, IgM e IgA positivas (pos) e 8 amostras IgG, IgM e IgA negativas (neg) em duplicatas.

Apesar da diferença estatística entre as amostras positivas e negativas das imunoglobulinas testadas na concentração de antígeno a 12 $\mu\text{g/mL}$, tivemos algumas amostras discordantes em relação aos resultados obtidos no Elecsys Toxo IgG/IgM e no ELISA IgA. Algumas amostras positivas não foram detectadas e algumas amostras negativas tiveram alta intensidade de fluorescência, o que não ocorreu quando testamos os mesmos soros nas placas de 96 poços com discriminação total entre amostras positivas e negativas (Gráfico 31). Assim, escolhemos as placas de 96 poços para continuar as análises do FISAt.

Gráfico 31 - FISAt em microplacas de 96 poços com 10 µg/mL de antígeno. Reatividade das amostras de soro positivas e negativas com o conjugado anti-IgG humano (A), anti-IgM humano (B) e anti-IgA humano (C). 8 amostras de soro IgG, IgM e IgA positivas (pos) e 8 amostras IgG, IgM e IgA negativas (neg) em duplicatas.

5.1.11 Comparação entre a reatividade de amostras de soro positivas e negativas para IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* no FISAt pelos dois lotes de conjugados fluorescentes produzidos

Os anticorpos secundários marcados com os fluorocromos da linha Alexa Fluor® foram reproduzidos de acordo com a metodologia baseada no excesso molar como descrito em métodos (Lote 2) e comparados com o lote anterior (Lote 1). A nova marcação resultou em uma taxa F/P de 12.5 (Lote 1 F/P=16.8) para o conjugado anti-IgG humano AF350, uma taxa F/P de 3.0 (Lote 1 F/P=3.7) para o conjugado anti-IgM

humano e uma taxa F/P de 2.9 (Lote 1 F/P= 4.2) para o conjugado anti-IgA humano. Observamos que a comparação entre a reatividade de amostras de soro positivas e negativas tanto para a detecção de anticorpos IgG ($p=NS$) (Gráficos 32A e 32B), quanto para a detecção de anticorpos IgM ($p=NS$) (Gráficos 32C e 32D não apresentaram diferença estatística e foram similares entre os dois lotes produzidos e que a comparação entre a reatividade das amostras de soro positivas e negativas para anticorpos IgA anti-*T. gondii* resultou em uma diminuição da intensidade de fluorescência para as amostras positivas quando detectadas pelo lote 2 do conjugado anti-IgA humano AF488 produzido (Gráficos 32E e 32F). Mesmo com essa diminuição a marcação dos anticorpos secundários com os fluorocromos AF488 pela metodologia empregada não resultou em diferenças estatísticas entre a detecção das amostras de soro pelos dois lotes de conjugados ($p=NS$).

Gráfico 32 - Comparação dos Lotes de conjugados produzidos (LOTE 1 e 2) a partir da análise da reatividade de amostras de soro positivas e negativas e regressão linear para anticorpos IgG (A e D), IgM (B e E) e IgA (C e F) anti-*T. gondii*.

5.2 Ensaios analíticos: validação do FISAt

Ensaios para validação do ensaio fluorescente triplex de fase sólida para detecção simultânea de IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii*.

5.2.1 Estabilidade dos conjugados anti-IgG AF350, anti-IgM AF647 e anti-IgA AF488

No ensaio de estabilidade dos conjugados fluorescentes observa-se que após 18 meses de sua marcação houve em média uma diminuição em unidades arbitrárias de fluorescência tanto para o conjugado anti-IgG humano AF350 (31.6%) (Gráfico 33A), quanto para os conjugados anti-IgM humano AF647 (39.8%) (Gráfico 33B) e anti-IgA humano AF488 (8.07%) (Gráfico 33C).

Gráfico 33- Reatividade em unidades arbitrárias de fluorescência de imunoglobulinas IgG, IgM e IgA pelos conjugados anti-IgG humano AF350 (A), anti-IgM humano AF647 (B) e anti-IgA humano AF488 (C) logo após marcação (Ensaio 1) e após 18 meses da marcação dos anticorpos secundários (Ensaio 2).

Mesmo com a diminuição, todos os conjugados detectaram as concentrações de imunoglobulinas adsorvidas na microplaca. Além disso, comparando os valores de intensidade de fluorescência observa-se que não houve diferença estatística tanto na detecção de IgG ($p=NS$) quanto na detecção de IgA ($p=NS$). Mesmo com diferença estatística na detecção de IgM ($p<0.05$) e apesar da diminuição da intensidade de fluorescência, houve discriminação das amostras de soro positivas e negativas (Gráfico 34) mesmo após 18 meses de marcação dos anticorpos secundários com os fluorocromos AF647, AF350 e AF488.

Gráfico 34- Reatividade em unidades arbitrárias de fluorescência de amostras positivas e negativas pelos conjugados anti-IgG humano AF350 (A), anti-IgM humano AF647 (B) e anti-IgA humano AF488 (C). Amostras positivas (IgG pos, IgM pos e IgA pos) e negativas (IgG neg, IgM neg e IgA neg) detectadas pelos conjugados fluorescentes logo após marcação e purificação dos fluorocromos e amostras positivas (IgGap pos IgMap pos e IgAap pos) e negativas (IgGap neg, IgMap neg e IgAap neg) detectadas pelos conjugados fluorescentes após 1 ano de marcação dos fluorocromos.

Também avaliamos a estabilidade dos conjugados fluorescentes com leitura da reatividade de imunoglobulinas humanas IgG, IgM e IgA sensibilizadas nas microplacas até 24 horas após a finalização do ensaio. Após as leituras em tempos diferentes observa-se similaridade tanto na detecção de IgG quanto na detecção de IgM e IgA. Comparando os valores de intensidade de fluorescência das imunoglobulinas a 0h e a 24h observa-se que não houve diferença estatística tanto na detecção de

anticorpos IgG ($p=NS$, $CV=7.2\%$) (Gráfico 35A), quanto na detecção de anticorpos IgM ($p=NS$, $CV=16\%$) (Gráfico 35B) e IgA ($p=NS$, $CV=2.6\%$) (Gráfico 35C).

Gráfico 35- Reatividade em unidades arbitrárias de fluorescência de imunoglobulinas IgG, IgM e IgA pelos conjugados anti-IgG humano AF350 (A), anti-IgM humano AF647 (B) e anti-IgA humano AF488 (C) após reação finalizada 0h (símbolo redondo fechado) e com leituras após 2h (símbolo redondo aberto), 4h (símbolo quadrado fechado) e 24h (símbolo quadrado aberto).

5.2.2 Reprodutibilidade do FISAt

Na análise de reprodutibilidade do ensaio fluorescente triplex, a comparação entre a média da reatividade de amostras de soro, em unidades arbitrárias de fluorescência, avaliadas para a detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, resultou em uma correlação $r^2=0,8513$ (IC 95% 0.7514-0.9796) (Gráfico 36A), para a detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii* uma correlação $r^2=0,8812$ (IC 95% 0.8591-1.84) (Gráfico 36B) e para a detecção e anticorpos IgA anti-*T. gondii*, uma correlação de $r^2=0,8222$ (IC 95% 0.7567-1.006) (Gráfico 36C).

Gráfico 36 - Comparação entre a média das leituras da reatividade de 40 amostras de soro avaliadas pelo FISA triplex. FISAt para detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* (A). FISAt para detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii* (B) e FISAt para detecção de anticorpos IgA anti-*T. gondii*.

5.2.3 Repetitividade

5.2.3.1 Amostras de soro

Na análise de repetitividade do FISAt, observa-se que após 30 repetições da mesma amostra positiva, sem o desconto da u.a.f. do fundo da placa (valor do branco do ensaio), o coeficiente de variação (CV) para detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* foi de 16.64%, para a detecção de anticorpos IgM foi de 14.91% e para a detecção de anticorpos IgA foi de 6.11%. E após as repetições da mesma amostra negativa no FISAt, o CV para detecção de anticorpos IgG foi de 4.42%, para detecção de anticorpos IgM foi de 6.81% e para detecção de anticorpos IgA foi de 2.60% (Gráfico 37).

Gráfico 37 - Distribuição dos valores em unidades arbitrárias de fluorescência da reatividade de amostras positivas (símbolo fechado: IgG+, IgM+ e IgA+) e negativas (símbolo aberto: IgG-, IgM- e IgA-) para IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* para análise da repetitividade no FISAt. A interrupção nos eixos foi feita para melhor visualizar a distribuição dos valores da amostra negativa.

5.2.3.2 Imunoglobulinas IgG, IgM e IgA humanas purificadas

Nesses ensaios testamos 15 repetições em diferentes ensaios de imunoglobulinas humanas purificadas IgG, IgM e IgA para uso como controle dos conjugados no ensaio fluorescente triplex. No Gráfico 51, verifica-se a variação da reatividade do anti-IgG humano AF350 (Gráfico 38A), do anti-IgM humano AF647 (Gráfico 38B) e do anti-IgA humano AF488 (Gráfico 38C) às concentrações de imunoglobulinas humanas em 15 imunoenaios diferentes. Observa-se que para cada ensaio a diferença de detecção para conjugado anti-IgG humano, em unidades arbitrárias de fluorescência (u.a.) à imunoglobulina IgG humana adsorvida nas concentrações de 3µg/mL (CV=7.35%), 0.5µg/mL (C/V=9.47%) e 0.05µg/mL (CV=8.03%) não foi significativa ($p>0.05$), assim como a diferença da reatividade do conjugado anti-IgM humano para cada ensaio, às concentrações de IgM humana adsorvida a 0.5µg/mL (CV=7.50%), 0.2µg/mL (CV=8.25%) e 0.005µg/L (CV=10.54%) e do conjugado anti-IgA humano às concentrações de 0,1µg/mL (CV=6.68%), 0,05µg/mL (CV=5.29%) e 0.005µg/mL (CV=5.65%) de IgA humana. Para todas as concentrações obtivemos um valor do CV dentro dos limites estabelecidos pelo protocolo de validação (CV<25%).

Gráfico 38 - Controle dos conjugados fluorescentes com diferentes concentrações de imunoglobulinas adsorvidas na microplaca. Reatividade do conjugado anti-IgG AF350 humano à IgG adsorvida (A). Reatividade do conjugado anti-IgM humano à IgM AF647 adsorvida nas microplacas (B). Reatividade do conjugado anti-IgA humano AF488 à IgA adsorvida nas microplacas (C).

5.2.4 Controle interno de qualidade do ensaio fluorescente de fase sólida para detecção simultânea de IgG, IgM e IgA anti-T. gondii

Na análise de controle de qualidade interna do FISAt, observamos um excelente perfil de exatidão dos ensaios para os controles positivos e negativos tanto na detecção de IgG (Gráfico 39), quanto de IgM (Gráfico 40) e IgA (Gráfico 41) pelos conjugados fluorescentes anti-IgG AF350, anti-IgM AF647 e anti-IgA AF488 humanos. Para os controles positivos, observa-se apenas uma violação de alerta, ou regra 1_{2s} , que é aplicada quando o valor do controle excede 2 desvios-padrão, no ensaio 14 para detecção da imunoglobulina IgA (Gráfico 41A). E para os controles negativos, observa-se a mesma violação de alerta no ensaio 10 para a detecção de IgG (Gráfico 39B) e IgM (Gráfico 40B) e no ensaio 13 para a detecção de IgA (Gráfico 41B).

Gráfico 39 - Perfil de exatidão de controles positivos (A) e negativos (B) a partir da relação entre o valor em unidades arbitrárias de fluorescência da reatividade do conjugado anti-IgG humano AF350 pelo valor do controle de cada placa de imunoensaio (UFA/CO) em 15 ensaios diferentes durante 15 dias.

Gráfico 40 - Perfil de exatidão dos controles positivos (A) e negativos (B) a partir da relação entre o valor de unidades arbitrárias de fluorescência da reatividade do conjugado anti-IgM humano AF647 pelo valor do controle de cada placa de imunoensaio (UFA/CO) em 15 ensaios diferentes durante 15 dias.

Gráfico 41 - Perfil de exatidão dos controles positivos (**A**) e negativos (**B**) a partir da relação entre o valor de unidades arbitrárias de fluorescência da reatividade do conjugado anti-IgA humano AF488 pelo valor do controle de cada placa de imunoensaio (UFA/CO) em 15 ensaios diferentes durante 15 dias.

5.2.5 Análise de concordância do ensaio fluorescente triplex de fase sólida pela comparação dos valores obtidos no teste comercial Elecsys IgG/IgM.

Para analisar a eficiência e concordância entre as técnicas de imunoensaio, amostras de soro de 500 participantes, dentre eles 420 gestantes, do HCFMUSP foram submetidas a triagem prévia pelos ensaios Elecsys Toxo IgG/IgM e IFAT IgM e posterior análise pelo ensaio fluorescente triplex.

A comparação entre a detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* pelo FISA triplex e Elecsys resultaram em uma boa concordância Kappa=0.77, sensibilidade de 76.2% (IC 99% 67.9-84.0) e especificidade de 96.8% (IC 99% 94.6-98.3), com valor preditivo positivo de 88.1% (IC 99% 80.1-93.7) e negativo de 93.2% (IC 99% 90.3-95.4). Já para a detecção de anticorpos IgM, o FISAt obteve uma sensibilidade menor de 62.1% (IC 99% 44.7-77.5) e similar especificidade de 97.6% (IC 99% 95.7-98.8), com valor preditivo positivo de 67.6% (IC 99% 49.4-82.6) e negativo de 96.9% (IC 99% 94.9-98.3) e com uma boa concordância Kappa=0.63 (Tabela 4).

Tabela 4 - Índices de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo do FISA triplex em 500 amostras de adultos participantes do HCFMUSP avaliados pela comparação com os métodos Elecsys Toxo IgG/IgM.

Subtipo Ig FISAt	Elecsys Toxo IgG/IgM		FISAt% 99%IC Se	FISAt% 99%IC Sp	FISAt% 99%IC VPP	FISAt% 99%IC VPN
	Positivo	Negativo				
IgG						
Positivo	89	12	76.2	96.8	88.1	93.2
Negativo	27	372	(67.9-84.0)	(94.6-98.3)	(80.1-93.7)	(90.3-95.4)
IgM						
Positivo	23	11	62.1	97.6	67.6	96.9
Negativo	14	452	(44.7-77.5)	(95.7-98.8)	(49.4-82.6)	(94.9-98.3)

IgG: imunoglobulina G; IgM: imunoglobulina M; ELISA: ensaio imunoenzimático; FISAt: ensaio fluorescente triplex; IC: intervalo de confiança; Se: sensibilidade; Sp: especificidade; VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo.

A correlação entre FISAt IgG e Elecsys Toxo IgG mostrou um Pearson $r=0.67$ (IC 99% 0.60-0.73) e 39 resultados discordantes: 12 amostras de soro FISAt IgG positivas e Elecsys IgG negativas e 27 amostras FISAt IgG negativas e Elecsys IgG positivas, com uma concordância de 92.2% ($n=461$) (Gráfico 42A). Já a correlação entre o FISAt IgM e Elecsys IgM mostrou uma correlação de Pearson $r=0.62$ (IC 99% 0.54-0.69) e 25 resultados discordantes: 11 amostras de soro positivas para FISAt IgM e negativas para o Elecsys IgM e 14 amostras negativas para o FISAt IgM e positivas para Elecsys IgM com concordância de 95% ($n=475$) (Gráfico 43A).

O *cut-off* também foi calculado pela análise da curva ROC e os resultados estão descritos na Tabela 5. Pode-se observar que a melhor discriminação dos soros positivos e negativos para a detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* foi com o valor > 0.80 , com sensibilidade de 82.6% (IC 99% 74.4-89.0) e especificidade de 91.6% (IC 99% 88.4-94.2) (Gráfico 42B). E para a detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii*, o *cut-off* escolhido foi >0.91 , com sensibilidade de 64.1% (IC 99% 47.1-78.8) e especificidade de 93.0% (IC 99% 90.3-95.2) (Gráfico 43B).

Gráfico 42 - Comparação da reatividade de 500 amostras de soro pelo FISAt e pelos métodos Elecsys Toxo para detecção de IgG (A), e análise pela curva ROC para discriminação de anticorpos IgG anti-*T. gondii* no FISAt (B). A interrupção nos eixos indica o *cut-off* dos ensaios.

Gráfico 43 - Comparação da reatividade de 500 amostras de soro pelo FISAt e pelos métodos Elecsys Toxo para detecção de IgM (**A**), e análise pela curva ROC para discriminação de anticorpos IgM anti-*T. gondii* no FISAt (**B**). A interrupção nos eixos indica o *cut-off* dos ensaios.

Tabela 5 - Valores do *cut-off* e características da análise da curva ROC para a detecção de IgG e IgM anti-*T. gondii*.

<i>Cut-off</i>	Sensibilidade (%)	99% IC	Especificidade (%)	99% IC	LR
IgG					
≥1.00 a	76.5	67.7-83.9	96.6	94.3-98.1	22.66
≥0.80b	82.6	74.4-89.0	91.6	88.4-94.2	9.94
IgM					
≥1.01a	61.5	44.6-76.6	97.8	96.0-98.9	28.37
≥0.91b	64.1	47.1-78.8	93.0	90.3-95.2	09.23

IC: intervalo de confiança; a: valor do *cut-off* na curva ROC de acordo com a média dos soros negativos adicionados de dois desvios padrão; b: valor do melhor *cut-off* de acordo com a distribuição dos soros negativos e positivos pela curva ROC; LR: Likelihood.

As amostras de soro positivas no método automatizado de triagem Elecsys Toxo IgM foram avaliadas por outro método para confirmação, o IFAT IgM. A comparação entre o FISA triplex para detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii* com o método confirmatório IFAT IgM mostrou uma concordância de 94.8% (n=474) e Kappa=0.46, com aumento da sensibilidade para 100% e especificidade de 94.6%, resultados similares quando comparados os métodos Elecsys Toxo IgM e IFAT IgM, incluindo o número de discordantes (Tabela 6).

Tabela 6 - Índices de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo do FISAt IgM em 500 amostras avaliados pela comparação com o método confirmatório IFAT IgM.

Testes	IFAT IgM		FISAt%	FISAt%	FISAt%	FISAt%
	Positivo	Negativo	99%IC Se	99%IC Sp	99%IC PPV	99%IC NPV
FISAt IgM						
Positivo	12	26	100	94.6	31.5	100
Negativo	0	462	(73.5-100)	(92.2-96.4)	(17.5-48.6)	(99.2-100)
Elecsys IgM						
Positivo	12	28	100	94.2	30.0	100
Negativo	0	460	(73.5-100)	(91.8-96.1)	(16.6-46.5)	(99.2-100)

IgM: imunoglobulina M; IFAT: teste de imunofluorescência indireta; FISAt: ensaio fluorescente triplex IC: intervalo de confiança; Se: sensibilidade; Sp: especificidade; VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo.

Avaliamos também a discriminação das amostras positivas e negativas para IgM anti-*T. gondii* considerando o método IFAT IgM como método de escolha para avaliação do *cut-off*, sensibilidade e especificidade na análise da curva ROC (Gráfico 44). O melhor *cut-off* foi >1.1 com sensibilidade de 100% (IC 99% 73.5-100) e especificidade de 98.9% (IC 99% 97.4-99.6) do FISA triplex.

Gráfico 44 - Discriminação das amostras IgM anti-*T. gondii* a partir da comparação do método confirmatório IFAT IgM pela análise da curva ROC.

5.2.6 Análise de concordância do ensaio fluorescente tríplice de fase sólida pela comparação dos valores obtidos no ELISA IgG/IgM/IgA.

Após a análise de concordância do FISAt com o teste automatizado Elecsys Toxo, também avaliamos a concordância do FISAt com o teste de ELISA, utilizando mesmo tipo de antígeno, para detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* nas mesmas 500 amostras de participantes do HCFMUSP. Os dados de correlação entre o FISAt e o ELISA para detecção de IgG e IgM anti-*T. gondii* mostram um aumento da concordância Kappa=0.82 e da sensibilidade para 82.5% (IC 99% 74.1-

89.1), com similar especificidade de 97.1% (IC 99% 95.0-98.5), valor preditivo positivo de 89.1% (IC 99% 81.3-94.4) e valor preditivo negativo de 92.0% (IC 99% 92.6-97.1) para a detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* e também um aumento da concordância Kappa= 0.71 e da sensibilidade para 82.1% (IC 99% 63.1-93.9), também com similar especificidade de 97.6% (IC 99% 95.8-98.9), valor preditivo positivo de 67.6% (IC 99% 49.4-83.8) e valor preditivo negativo de 98.8% (IC 99% 97.5-99.6) na detecção de anticorpos IgM em relação à correlação entre o FISAt e o Elecsys Toxo. E para a detecção de anticorpos IgA, o FISAt obteve uma alta sensibilidade de 92.0% (IC 99% 73.9-99.0) e especificidade de 98.3% (IC 99% 96.7-99.2), com valor preditivo positivo de 74.1% (IC 99% 55.3-88.1), e negativo de 99.5% (IC 99% 98.4-99.9), com excelente concordância Kappa=0.77 (Tabela 7).

Tabela 7 - Índices de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo do FISAt IgG/IgM/IgA em 500 amostras de soro avaliados pela comparação com o ELISA IgG/IgM/IgA.

Subtipo Ig FISAt	ELISA		FISAt% 99%IC Se	FISAt% 99%IC Sp	FISAt% 99%IC PPV	FISAt% 99%IC NPV
	IgG/ IgM/ IgA Positivo	Negativo				
IgG						
Positivo	90	11	82.5	97.1	89.1	92.0
Negativo	19	380	(74.1-89.1)	(95.0-98.5)	(81.3-94.4)	(92.6-97.1)
IgM						
Positivo	23	11	82.1	97.6	67.6	98.9
Negativo	5	461	(63.1-93.9)	(95.8-98.8)	(49.4-82.6)	(97.5-99.6)
IgA						
Positivo	23	8	92.0	98.3	74.1	99.5
Negativo	2	467	(73.9-99.0)	(96.7-99.2)	(55.3-88.1)	(98.4-99.9)

IgM: imunoglobulina M; IgG: imunoglobulina G; IgA: imunoglobulina A; ELISA: teste imunoenzimático de fase sólida; FISAt: ensaio fluorescente triplex IC: intervalo de confiança; Se: sensibilidade; Sp: especificidade; VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo.

Observa-se que a comparação entre o FISAt IgG e o ELISA IgG resultou em um menor número de discordantes: 11 amostras de soro FISAt IgG positivas e ELISA IgG negativas e 19 amostras de soro FISAt IgG negativas e ELISA IgG positivas em relação à correção entre o FISAt IgG e o Elecsys Toxo IgG, com uma correlação de Pearson de $r=0.56$ (IC 99% 0.48-0.64) (Gráfico 45A). Nota-se também, que houve uma diminuição de soros discordantes na detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii* com a comparação da reatividade das 500 amostras nos testes FISAt IgM e ELISA IgM em relação à comparação nos testes FISAt IgM e Elecsys Toxo IgM, com apenas 16 amostras discordantes: 5 amostras negativas para FISAt IgM e positivas para o ELISA IgM e 11 amostras positivas para o FISAt IgM e negativas para o ELISA e com uma correlação de Pearson $r=0.45$ (IC 99% 0.35-.53) (Gráfico 46A). Tanto na detecção de anticorpos IgG quanto na detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii* observamos que houve uma diminuição de soros discordantes principalmente em amostras falso-negativas quando realizamos a comparação entre o FISAt e o ELISA. Já a comparação entre FISAt IgA e ELISA IgA mostrou uma maior correlação de Pearson $r=0.70$ (IC 99% 0.64-0.75) e 10 resultados discordantes: 8 amostras positivas para FISAt IgA e negativas para ELISA IgA e 2 amostras negativas para FISAt IgA e positivas para ELISA IgA com concordância de 97.6% ($n=488$) (Gráfico 47A).

O *cut-off* do FISAt na análise das 500 amostras de soro também foi calculado pelo teste da curva ROC considerando-se o ELISA como teste de referência (Tabela 8), e podemos observar que a melhor discriminação dos soros positivos e negativos para a detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* foi com o valor >0.80 , com sensibilidade de 85.3% (IC 99% 77.2-91.3) e especificidade de 91.5% (IC 99% 88.3-94.1) (Gráfico 45B). Para a detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii*, o melhor *cut-off* foi >0.98 , com sensibilidade de 85.1% (IC 99% 77.2-91.3) e especificidade de 97.4% (IC 99% 95.3-98.7) (Gráfico 46B) e para a detecção de anticorpos IgA anti-*T. gondii*, o melhor *cut-off* foi >1.0 , com sensibilidade de 91.6% (IC 99% 73.0-98.9) e especificidade de 98.3% (IC 99% 96.7-99.2) (Gráfico 47B).

Gráfico 45 - Comparação da reatividade de 500 amostras de soro pelo FISAt e pelo método de ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii*. A interrupção nos eixos indica o *cut-off* de cada ensaio (A). Análise pela curva ROC para discriminação de anticorpos IgG anti-*T. gondii* no FISAt (B).

Gráfico 46 - Comparação da reatividade de 500 amostras de soro pelo FISAt e pelo método de ELISA para detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii*. A interrupção nos eixos indica o *cut-off* de cada ensaio (A). Análise pela curva ROC para discriminação de anticorpos IgM anti-*T. gondii* no FISAt (B).

Gráfico 47 - Comparação da reatividade de 500 amostras de soro pelo FISAt e pelos métodos Elecsys Toxo para detecção de IgA (A), e análise pela curva ROC para discriminação de anticorpos IgA anti-*T. gondii* no FISAt (B). A interrupção nos eixos indica o *cut-off* dos ensaios.

Tabela 8 - Valores do *cut-off* e características da análise da curva ROC para a detecção de IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii*.

<i>Cut-off</i>	Sensibilidade (%)	99% IC	Especificidade (%)	99% IC	LR
IgG					
≥1.00 a	82.5	74.1-89.1	97.4	95.3-98.7	32.37
≥0.80b	85.3	77.2-91.3	91.5	88.3-94.1	10.14
IgM					
≥1.00a	81.4	61.9-93.7	97.6	95.8-98.8	34.89
≥0.98b	85.1	66.2-95.8	97.4	95.5-98.6	33.44
IgA					
≥1.01a	91.6	73.0-98.9	97.9	96.1-98.9	48.4
≥1.02b	91.6	73.0-98.9	98.3	96.7-99.2	54.5

IC: intervalo de confiança; a: valor do *cut-off* na curva ROC de acordo com a média dos soros negativos adicionados de dois desvios padrão; b: valor do melhor *cut-off* de acordo com a distribuição dos soros negativos e positivos pela curva ROC; LR: Likelihood.

Após essas análises, avaliamos os índices de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos somente com as amostras que foram positivas e negativas para anticorpos IgG (n=470) e IgM (n=479) anti-*T. gondii* pelos dois métodos Elecsys Toxo IgG/IgM e ELISA IgG/IgM simultaneamente, e pode-se observar na Tabela 9 uma maior sensibilidade para detecção de anticorpos IgG de 89.6% (IC 99% 81.8-94.9) e similar especificidade de 97.5% (IC 99% 95.4-98.8), com valor preditivo positivo de 90.6% (IC 99% 82.9-95.6) e negativo de 97.3% (IC 99% 96.1-99.2) e com uma excelente concordância Kappa=0.87. E para detecção de anticorpos IgM, uma sensibilidade de 91.6% (IC 99% 73.0-98.9) e especificidade de 98.0% (IC 99% 96.2-99.0), com valor preditivo positivo de 70.9% (IC 99% 51.9-85.7) e valor preditivo negativo de 99.5% (IC 99% 98.4-99.9), e com uma boa concordância Kappa=0.78.

Tabela 9 - Índices de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo do FISA triplex nas amostras que foram positivas para anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii* pelos dois métodos, Elecsys Toxo e ELISA.

Subtipo Ig FISAt	Elecsys Toxo		FISAt% 99%IC Se	FISAt% 99%IC Sp	FISAt% 99%IC VPP	FISAt% 99%IC VPN
	IgG/IgM e ELISA IgG/IgM					
	Positivo	Negativo				
IgG						
Positivo	87	9	89.6	97.5	90.6	97.3
Negativo	10	364	(81.8-94.9)	(95.4-98.8)	(82.9-95.6)	(95.1-98.7)
IgM						
Positivo	22	9	91.6	98.0	70.9	99.5
Negativo	2	446	(73.0-98.9)	(96.2-99.0)	(51.9-85.7)	(98.4-99.9)

IgG: imunoglobulina G; IgM: imunoglobulina M; ELISA: ensaio imunoenzimático; FISAt: ensaio fluorescente triplex; IC: intervalo de confiança; Se: sensibilidade; Sp: especificidade; VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo.

5.3 Aplicação do FISAt

5.3.1 Amostras positivas para IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* pelos testes FISAt, ELISA e Elecsys de acordo com a idade de 500 participantes do HCMUSP.

A porcentagem de amostras positivas para anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* em relação à idade dos 500 participantes foi similar em todos os testes com $p>0.05$. Podemos observar no Gráfico 47 que conforme o aumento da idade ocorre também o aumento de amostras positivas para anticorpos IgG em todos os testes avaliados (Gráfico 48). Do total das amostras com idade menor que 12 anos ($n=3$), uma delas foi positiva apenas para anticorpos IgG e no teste Elecsys Toxo. Na detecção de anticorpos IgM e IgA, observamos uma maior porcentagem de positivos entre 12 e 20 anos e mais evidente entre 40-70 anos em todos os testes realizados (Gráfico 48B e 48C).

Gráfico 48 - Amostras de soro positivas para IgG e IgM anti-*T. gondii* avaliadas pelo Elecsys Toxo, ELISA e FISAt entre 2013-2016, de acordo com a faixa etária dos participantes. NS: diferença não significativa.

5.3.2 Reatividade quantitativa dos imunoenaios Elecsys Toxo, FISAt e ELISA para a detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* em 500 amostras de participantes do HCFMUSP.

O gráfico 49 mostra a distribuição da reatividade das amostras de soro positivas e negativas para anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* pelo método comercial Elecsys Toxo, pelo ELISA e FISAt. Do total das 500 amostras, para o Elecsys Toxo, 116 foram positivas para anticorpos IgG, o que corresponde a uma prevalência de 23.2%. A prevalência de anticorpos IgG pelo FISAt foi de 20.2% (n=101) e pelo ELISA foi de 21.8% (n=109). Na detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii* pelo Elecsys observa-se 7.4% (n=37) de amostras IgM positivas, 6.8% (n=34) pelo FISAt e 5.6% (n=28) pelo ELISA. E para a detecção de anticorpos IgA pelo ELISA observa-se 5.0% (n=25) de amostras IgA positivas e pelo FISAt 6.2% (n=31).

A análise das amostras de participantes do HCFMUSP com pedido de exame para toxoplasmose com a finalidade de diagnóstico (n=80) para o Elecsys Toxo resultou em 46 amostras positivas para anticorpos IgG, o que corresponde a uma prevalência de 57.5%, pelo FISAt a prevalência de anticorpos IgG foi de 45.0% (n=36), e para o ELISA a prevalência foi de 55.0% (n=44) (Gráfico 49A). Na detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii* pelo Elecsys observa-se 25% (n=20) de amostras IgM positivas, pelo FISAt foi de 17.5% (n=14) e pelo ELISA foi de 13.7% (n=11) (Gráfico 49B). E para a detecção de anticorpos IgA pelo FISAt e pelo ELISA observa-se 17.5% (n=14) de amostras IgA positivas (Gráfico 49C).

Em relação às gestantes com pedido de exame para toxoplasmose na realização do pré-natal triadas pelos 3 testes (n=420), 65 amostras foram positivas para anticorpos IgG, resultando em uma prevalência de 15.4% no FISAt, 64 amostras positivas no ELISA com uma prevalência de 15.2% e 70 amostras IgG positivas no Elecsys Toxo, uma prevalência de 16.6% (Gráfico 49D). Para a detecção de anticorpos IgM, pelo Elecsys Toxo foram identificadas 4.0% de amostras positivas (n=17), pelo FISAt observa-se 4.2% (n=18) e pelo ELISA 3.3% (n=14) (Gráfico 49E). E para a detecção de anticorpos IgA anti-*T. gondii* observa-se uma maior proporção de amostras positivas pelo FISAt, com 3.8% (n=16) do que pelo ELISA, com 2.3% (n=10) de amostras IgA positivas (Gráfico 49F).

Gráfico 49 - Reatividade quantitativa dos imunoenaios Elecsys Toxo (símbolo fechado), FISAt (símbolo aberto) e ELISA (símbolo semi-aberto) para detecção de anticorpos IgG (A), IgM (B) e IgA (C) anti-*T. gondii* em 80 amostras de soro de participantes do HCFMUSP e para detecção de IgG (D), IgM (E) e IgA (F) em 420 amostras de gestantes. As interrupções nos eixos indicam o *cut-off* dos ensaios.

5.3.3 Avidéz de anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* e correlação com os valores de IgG, IgM e IgA obtidos no ELISA, FISAt e Elecsys Toxo.

Nas amostras de soro com resultados positivos no método comercial Elecsys Toxo IgM, e/ou no FISAt IgM e/ou no ELISA IgM, incluindo as 12 amostras com confirmação de IgM pelo IFAT IgM, realizamos o ensaio de ELISA para detecção da avidéz de anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* (Gráfico 50). Neste ensaio, 3 amostras de soro obtiveram resultados de baixa avidéz de IgG (<30%), além disso, observamos uma alta ou intermediária avidéz de anticorpos IgA, um perfil bem diferente da avidéz de amostras IgM positivas, com um resultado de no máximo 35%, e com uma média de 23.9% de avidéz de anticorpos IgM. Das 3 amostras com baixa avidéz de IgG, 2 foram positivas para IgG, IgM e IgA e 1 para IgG e IgM tanto no FISAt quanto no ELISA. A maioria das amostras IgA positivas no ELISA obtiveram uma avidéz acima de 50% com uma média de 58% de avidéz de anticorpos IgA, e para as duas amostras com baixa avidéz de anticorpos IgG anti-*T. gondii* e com resultado de IgA positivo, observamos que a avidéz de anticorpos IgA foi intermediária (46.0% e 39.4%).

Gráfico 50 - Avidéz de anticorpos IgG, IgM e IgA das amostras que foram positivas na detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii* pelo método comercial Elecsys Toxo e/ou pelo ELISA e/ou pelo FISAt.

Após análise de avidéz de IgG das amostras, correlacionamos os resultados de baixa ou intermediária e alta avidéz com os índices de reatividade (IR) de IgG, IgM e IgA pelo ELISA e pelo FISAt e com os valores de unidades internacionais (UI/mL) pelo Elecsys Toxo. Pode-se observar que em média a reatividade de amostras IgG positivas e com o perfil de alta avidéz de anticorpos IgG aumentou de maneira significativa quando avaliadas pelo Elecsys Toxo ($p < 0.0001$) e pelo ELISA ($p < 0.05$) em comparação com a reatividade de amostras IgG positivas com o perfil de avidéz baixa ou inconclusiva (Gráfico 51A). Já para o FISAt, também observamos um discreto aumento do índice de reatividade das amostras IgG positivas com o perfil de alta avidéz de IgG. Na avaliação do índice de reatividade para detecção de anticorpos IgM, observa-se que ocorre o inverso do que o observado com a detecção de IgG pelas

técnicas sorológicas. Os índices de IgM de amostras com perfil de alta avidéz de anticorpos IgG diminuíram em relação aos índices de IgM de mostras com perfil de avidéz de IgG baixa ou inconclusiva, porém sem diferenças significativas tanto no Elecsys Toxo, quanto no ELISA e no FISAt (Gráfico 51B). E na avaliação do índice de reatividade para detecção de anticorpos IgA anti-*T. gondii* observamos um aumento significativo ($p<0.05$) da avidéz de anticorpos IgA também em amostras com perfil de alta avidéz de anticorpos IgG e um aumento dos valores do índice de reatividade dessas amostras pelo ELISA, porém sem resultados significativos (Gráfico 51C).

Gráfico 51 - Índices de reatividade (IR) e unidades internacionais (UI/mL) em média de IgG (A), IgM (B) e IgA (C) anti-*T. gondii* pelo FISAt, ELISA e Elecsys Toxo de amostras com perfil de avididade de anticorpos IgG anti-*T. gondii* baixo e inconclusivo (<50% em preto) ou alto (>50% em cinza). *** $p < 0.001$ e ** $p < 0.01$.

Também correlacionamos os resultados de avidéz (>50%<) dos anticorpos IgA anti-*T. gondii* com os valores dos índices de reatividade na detecção de IgA nas amostras pelo ELISA e pelo FISAt, e pode-se observar um perfil semelhante à correlação das amostras IgG positivas com a avidéz de anticorpos IgG: houve um aumento significativo dos índices de reatividade das amostras com avidéz >50% em comparação com as amostras que tiveram um perfil de avidéz <50% pelo ELISA ($p<0.05$). Pelo FISAt, os valores de reatividade, em média, na detecção de IgA em amostras com >50% de avidéz foram praticamente os mesmos ($p=0.95$) nas amostras com perfil <50% de avidéz de IgA anti-*T. gondii* (Gráfico 52).

Gráfico 52 - Índice de reatividade (IR) em média de IgA anti-*T. gondii* pelo ELISA e FISAt de amostras com perfil de avidéz de anticorpos IgA anti-*T. gondii* <50% (cinza) e >50% (sem cor). * $p<0.05$.

5.3.4 Perfil de amostras positivas e negativas para anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* pelo Elecsys Toxo, FISAt e ELISA.

O fluxograma (Figura 16) mostra a quantidade e a porcentagem de diferentes perfis de amostras com anticorpos IgG, IgM e IgA positivos ou negativos triadas pelo FISAt, Elecsys Toxo e ELISA. Das 32 amostras com resultados positivos para IgG e IgM anti-*T. gondii* pelo Elecsys Toxo, 12 foram confirmadas pelo IFAT IgM. Das 15 amostras IgG e IgM positivas no FISAt, 11 foram confirmadas pelo IFAT. E das 13 amostras com resultado IgG e IgM positivos no ELISA, 10 foram confirmadas pelo IFAT IgM. De todas as amostras IgM positivas confirmadas pelo IFAT, apenas uma amostra não obteve resultado de IgG positivo pelo FISAt, mas obteve resultado de IgM positivo, e 2 amostras obtiveram resultados de IgG negativo pelo ELISA, e também com resultado de IgM positivo. Das 3 amostras com baixa avidade de IgG, todas obtiveram resultados IgG e IgM e/ou IgA positivos nos 3 testes, porém apenas uma amostra foi confirmada com resultado de IgM positivo pelo IFAT.

De todas as amostras positivas para anticorpos IgM nos métodos de triagem Elecsys Toxo, FISAt e ELISA das gestantes (n=17), apenas 3 amostras foram positivas no teste confirmatório IFAT IgM. Além disso, 2 amostras positivas para IgG e IgM pelos 3 testes, mas que não foram confirmadas IgM positivas pelo IFAT obtiveram resultados de baixa avidade de anticorpos IgG no ELISA. A única amostra com PCR positivo no líquido amniótico foi também positiva para IgG e IgM pelos 3 testes, com confirmação de IgM positiva pelo IFAT e com um resultado de avidade intermediária ou inconclusivo de anticorpos IgG igual a 35%. E de todas as 12 amostras confirmadas pelo IFAT IgM, 7 amostras (58.3%) foram positivas também para anticorpos IgA anti-*T. gondii*.

O FISAt, ELISA e o Elecsys Toxo identificaram todas as amostras IgM positivas confirmadas pelo IFAT IgM e as 3 amostras com baixa avidade de anticorpos IgG identificadas no pré-natal das gestantes obtiveram resultados de IgG e IgM e/ou IgA positivos.

Figura 16 - Fluxograma da porcentagem e do número de amostras positivas e negativas para anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* pelos métodos FISAt, ELISA e Elecsys Toxo.

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho, desenvolvemos um diagnóstico sorológico fluorescente de fase sólida para detecção conjunta de anticorpos IgG, IgM e IgA contra *T. gondii*, passível de uso em triagem sorológica de gestantes e em outros envolvimento desta infecção. Mostramos que a fluorimetria em microplacas permite o desenvolvimento de protocolos com detecção múltipla de diferentes tipos de anticorpos de maneira simples, com baixo custo e com alto rendimento.

Para o desenvolvimento deste ensaio, construímos os anticorpos secundários com marcação com fluorocromos NHS reativos Alexa Fluor® de espectros de emissão não interferente e que mostraram uma reatividade adequada aos nossos objetivos com eficiência similar à de conjugados comerciais marcados com enzimas. Estes conjugados fluorescentes foram construídos com uma ótima relação de fluorocromo-proteína (F/P) de aproximadamente 3-4 mols de fluorocromos para os conjugados anti-IgM e anti-IgA. Apesar de eficiente, a marcação do conjugado anti-IgG teve uma maior relação molar (F/P=12-16), o que pode ter interferido no seu desempenho na detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, mas como a IgG é o anticorpo mais prevalente, este efeito não afetou a avaliação da sensibilidade do ensaio. Estudos relatam que uma alta concentração molar de fluorocromos conjugados à molécula de anticorpo pode resultar na inativação de epítomos importantes para a ligação desse conjugado fluorescente no anticorpo primário^{164,165}. Boylan et al.¹⁶⁵ testaram diferentes proporções de marcação de anticorpos IgG via Fc com o AF350 e relataram que até as taxas F/P de 3-8 ocorre o aumento da sensibilidade da detecção fluorescente, e com relações molares maiores pode ocorrer a diminuição do desempenho deste fluorocromo. Padronizações na marcação do AF350 na IgG seriam necessárias para verificar a melhor proporção molar e, com isso, aumentar a eficiência de detecção com este fluorocromo. Outras avaliações também poderiam aprimorar a eficiência do uso deste fluorocromo em ensaios de fase sólida, como a automatização do teste, ou ainda o uso de maiores concentrações de antígenos purificados.

Em nossos ensaios de padronização, os conjugados marcados apresentaram excelente perfil de reatividade às imunoglobulinas humanas IgG, IgM e IgA

purificadas em todas as concentrações avaliadas e com eficiente discriminação de amostras positivas e negativas para anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* em todas as diluições testadas tanto no FISA isolado ou multiplexado no mesmo poço. Além disso, todos os procedimentos de sequência de adição dos fluorocromos no FISAt foram eficientes para a discriminação das amostras positivas e negativas para anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii*. O procedimento de adição dos conjugados em tempos diferentes no mesmo poço, com intervalos de incubação e lavagem, foi o método de escolha por ter sido mais eficiente do que o procedimento de adição conjunta, que resultou em valores mais distantes da condição inicial no FISA isolado ($p < 0.05$) de algumas amostras positivas para IgG, como também observado em um trabalho anterior do nosso grupo de detecção simultânea de IgG e IgM anti-*T. gondii*¹⁵⁹. Mesmo assim, não descartamos a possibilidade de realizar a adição dos conjugados por essa condição. Futuros ensaios com concentrações diferentes de cada conjugado para adição simultânea poderiam otimizar a realização desse tipo de procedimento resultando na diminuição das etapas do FISA triplex, tornando o método mais rápido e eficiente.

O FISAt também foi padronizado em placas de 384 poços de alto rendimento com bom desempenho na detecção simultânea de IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii*. O uso de placas com maior número de poços e menor volume de reação é adequado para triagens de grandes quantidades de amostras e em condições de operação robótica. Hoje, com o aumento da rede de atenção à saúde e o uso de algoritmos no pré-natal com maior número de ensaios para vigilância de infecções congênitas, este tipo de abordagem é essencial tanto em grandes cidades como em sistemas de drenagem de exames para institutos regionais de realização dos ensaios. Segundo o IBGE, o número de nascimentos no estado de São Paulo foi de em média 600.000 nos últimos anos¹⁶⁶, o que implica em um uso de algoritmos para vigilância de conversão sorológica da toxoplasmose feito com 6 exames realizados nas gestantes previamente soronegativas, que hoje são relatadas em cerca de 70%¹⁶⁷, uma alta proporção, que também foi observada neste trabalho, em que cerca de 84% das gestantes triadas estão susceptíveis a toxoplasmose. Assim, usando 1 teste para detectar as soropositivas no primeiro trimestre e para o acompanhamento das gestantes soronegativas seriam necessários anualmente 3.120.000 exames, o que seria 250.000 exames por mês, ou seja, 652 testes

por mês em placas de 384 poços, ou 164 testes por mês em placas de 1536 poços para a detecção precoce e bloqueio da toxoplasmose congênita por terapia materna.

Na padronização do tipo de bloqueio da inespecificidade do FISAt, o uso do leite desnatado e da albumina bovina foram eficientes para minimizar a fluorescência de fundo da reação. O bloqueio com albumina bovina foi a condição de escolha por ter permitido utilizar amostras de soro mais diluídas (1:200) para a detecção simultânea de IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii*, devido ao fato de que a preparação de BSA utilizada é composta majoritariamente por uma proteína mais pura em comparação com o uso de proteínas do leite, uma mistura de proteínas, o que também já foi relatado em outro estudo¹⁶⁸. Em muitos trabalhos, os bloqueadores das interações hidrofóbicas ou eletrostáticas não específicas em microplacas mais utilizados e mais eficazes para suportes sólidos é a utilização de proteínas, como a BSA, as proteínas do leite e a gelatina associado ao uso de detergentes não iônicos, como o Tween-20 e o Triton X-100, que também auxiliam ao mesmo propósito com alta eficiência^{169,170}. Nossos resultados demonstraram que a comparação entre as médias das leituras da reatividade dos conjugados, em unidades arbitrárias de fluorescência, não mostrou diferenças significativas entre cada tipo de bloqueio. Além disso, nos nossos ensaios, também utilizamos o Tween 20 no tampão de lavagem e no tampão de diluição das amostras e dos conjugados, o que também contribuiu para diminuir a fluorescência de fundo da placa, bloqueando as interações inespecíficas. Ainda no ensaio de padronização das placas de 384 poços, observa-se que com o aumento da concentração de antígeno, há o aumento também da discriminação das amostras positivas e negativas tanto na detecção de anticorpos IgG, quanto de IgM e IgA anti-*T. gondii*. Nesses ensaios, maiores concentrações de antígenos forneceram ao sistema maior quantidade de epítopos necessários para ligação de uma quantidade ideal das três imunoglobulinas que possibilitem a detecção e reatividade de fluorescência adequada para a discriminação das amostras positivas e negativas.

Apesar da discriminação eficiente de amostras positivas e negativas no FISA triplex realizado nas placas de 384 poços, observamos uma menor intensidade do sinal de fluorescência na detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii* quando comparado com a detecção desses anticorpos na placa de 96 poços e ainda uma intensidade de fluorescência muito inferior à detecção de anticorpos IgG e IgA anti-*T. gondii*. Devido

a isso, testamos outras metodologias para a conjugação do anti-IgM humano baseadas na quantidade de fluorocromo por molécula de anticorpo. A conjugação inicial foi realizada com um excesso molar do fluorocromo, porém conjugações com alta taxa molar de fluorocromo por proteína resultam em altos DOLs (Degree of Labeling - grau de marcação) ou altas taxas F/P que podem levar à perda da fluorescência devido à interação fluorocromo-fluorocromo, tais como o empilhamento de fluorocromos próximos ou formação de agregados-H¹⁷¹. Um estudo recente relata a diminuição do brilho ou intensidade de fluorescência quando muitas aminas estão ligadas ao NHS-ester dos fluorocromos¹³⁵. Com isso, realizamos outra metodologia de conjugação baseada na quantidade de fluorocromo pelo DOL ótimo¹⁵⁶, que resultou na adição de bem menos fluorocromos em relação à conjugação inicial. Nesse ensaio, observamos que a intensidade de fluorescência e a discriminação de amostras positivas e negativas ainda foi maior utilizando a conjugação inicial. Alguns autores relatam que a diminuição da taxa F/P nas reações de conjugação, apesar de reduzir a quantidade de anticorpos marcados com muitos fluorocromos, pode resultar em uma significativa proporção de anticorpos não marcados, diminuindo a intensidade de fluorescência na detecção da ligação antígeno-anticorpo, o que pode não ser suficiente para a discriminação entre amostras positivas e negativas^{172,132}. Assim, com a finalidade de aumentar a quantidade de moléculas de fluorocromos sem excessos realizamos a conjugação de aproximadamente 4 fluorocromos com Poly-L-lysine via glutaraldeído. Porém, obtivemos baixa eficiência na detecção de anticorpos. O glutaraldeído é um ligante homobifuncional que pode se acoplar de forma inespecífica quando adicionado em excesso¹⁷³. A auto-conjugação pode ser evitada utilizando-se reações altamente diluídas ou ligantes heterobifuncionais que apresenta sítios reativos distintos¹⁷³. Nesse ensaio, o glutaraldeído pode ter se ligado a duas moléculas de anticorpos ou a dois fluorocromos, resultando em baixa eficiência de ligação Poly-L-Lysine-F-anticorpo. Após todas as tentativas de acoplamento dos fluorocromos AF647 ao anti-IgM humano, a conjugação inicial, baseada no excesso molar de fluorocromos, foi mais eficiente do que as outras conjugações testadas para a discriminação de soros positivos e negativos IgM anti-*T. gondii*.

A fluorimetria em microplacas é uma abordagem nova, e ainda não há estudos que padronizaram ou testaram a detecção de anticorpos anti-*T.gondii* no

espectrofluorímetro de maneira isolada ou conjunta. Por isso, os filtros construídos pelo fabricante comercial do equipamento não foram eficientes para a detecção conjunta dos diversos fluorocromos que existem atualmente no mercado para a detecção de anticorpos ou antígenos em um ensaio de fase sólida. Neste trabalho, escolhemos os fluorocromos de acordo com o brilho e emissão máxima para maior intensidade de fluorescência possível, a fim de se obter melhor eficiência da técnica simultânea. Mas nem todos os fluorocromos, como foi o caso do AF647 (excitação máxima: 650nm e emissão máxima: 670nm) podem ser detectados no comprimento de onda máximo. Isso porque o comprimento de onda de excitação e emissão são muito próximos, e a largura do comprimento de onda da banda passante (BW) do filtro disponível para leitura desse fluorocromo no espectrofluorímetro se sobrepõe com o filtro disponível para a emissão (BW cross-talk), o que impossibilitou a leitura no máximo de brilho que o fluorocromo permite. Com isso, fizemos a leitura com outro filtro (Ex595nm BW 8nm) que não excitou no comprimento de onda ideal do fluorocromo, diminuindo muito o sinal de fluorescência, porém sem se sobrepor com o filtro de emissão, o que permitiu o uso de fluorocromo, apesar de um resultado quantitativo menor.

A partir do estudo dos espectros de excitação e escolha de um novo filtro (Ex 590nm BW 20nm), mais próximo da excitação ideal do fluorocromo, porém sem interferência com a emissão, e com a banda passante mais larga (BW 20nm), observamos uma melhor eficiência na detecção do AF647, com aumento da intensidade de fluorescência e maior discriminação de amostras positivas e negativas para os anticorpos IgM anti-*T. gondii*. Nossa abordagem foi semelhante à de Almlie et al.¹⁷⁴ que desenvolveram uma técnica para reduzir a sobreposição dos comprimentos de onda de emissão de fluorescência quando são utilizados mais de dois fluorocromos com emissão próxima. Esse método consistiu principalmente na redução da banda espectral de excitação com ajuste também da largura de banda de emissão e com o uso de filtros mais apropriados. Em outro estudo para otimização de detecções fluorescentes, os autores relatam que um dos parâmetros mais importantes para a maior eficiência da técnica é a padronização da largura de banda do filtro de excitação¹⁷⁵. A escolha da BW ideal nos filtros de excitação também foi essencial para possibilitar a detecção do fluorocromo AF568. Para esse fluorocromo, o filtro de excitação máxima

(Ex585nm BW 8nm) também se sobrepôs ao filtro de emissão máxima (Em 595nm BW 35nm), não possibilitando a leitura. Com o uso de um filtro de excitação com menor comprimento de onda, e com uma banda passante mais larga, porém sem interferência com outros filtros (Ex535nm BW 25nm), foi possível a leitura deste fluorocromo, bem como a discriminação de amostras positivas e negativas para IgM anti-*T. gondii* também no FISAt com os outros dois fluorocromos AF350 e AF488. Apesar de observarmos detecção deste fluorocromo pelos filtros utilizados para a detecção do fluorocromo AF647, não descartamos a possibilidade da detecção simultânea deste fluorocromo com todos os outros filtros utilizados e até com 4 tipos de detecções distintas a partir de uma padronização e desconto de interferência como ocorre na técnica da citometria de fluxo, que também utiliza múltiplas marcações. Assim, o uso de filtros adequados de excitação de fluorocromos podem ampliar a intensidade do sinal de fluorescência e a discriminação entre soros positivos e negativos para anticorpos anti-*T. gondii* na fluorimetria de fase sólida. Neste trabalho, a escolha de filtros ideais e da largura da banda passante foi essencial para fornecer a energia necessária e suficiente de excitação sem sobreposições com outros filtros, o que permitiu o aumento da eficiência da detecção fluorescente. A associação de filtros de excitação e emissão que realizamos nesses ensaios permitiu a detecção conjunta e eficiente de anticorpos IgG, IgM e IgA contra *T. gondii* em um ensaio fluorescente de fase sólida. Além disso, mostramos que a escolha dos filtros para detecção dos fluorocromos disponíveis comercialmente é essencial para viabilizar o desenvolvimento de técnicas fluorimétricas de fase sólida com maior número de detecções simultâneas e não interferentes.

O uso de filtros mais eficientes no FISAt foi essencial para o aumento da fluorescência de detecção dos anticorpos IgM anti-*T. gondii* nas placas de 384 poços, porém com a análise de uma maior quantidade de amostras com diferentes perfis de anticorpos IgG, IgM e IgA, observamos que ainda não foi possível realizar a total discriminação entre os positivos e negativos. As microplacas de 384 poços permitem ensaios de alto rendimento com menores volumes de reagentes e com alto custo-benefício para triagens de grandes números de amostras¹⁷⁶. Apesar de muitas vantagens, o manuseio de placas de 384 poços em modo manual, mesmo usando pipetas multicanais pode ser altamente impreciso devido a miniaturização do ensaio¹⁷⁷.

Essas microplacas apresentam o mesmo formato das placas convencionais de 96 poços (modelo de poços 8x12), porém com poços de reação com diâmetros menores, resultando em um modelo de placa de 16x24 poços. Assim, cada poço da microplaca de 384 poços é de um tamanho 4 vezes menor do que a microplaca de 96 poços¹⁷⁸. Por isso, o uso de dispositivos automatizados de dispensadores de reagentes ou estações de trabalho automáticas de aplicação e aspiração são recomendados para facilitar o uso dessas placas e aumentar a exatidão e precisão das análises realizadas¹⁷⁸. Nos nossos ensaios nas placas de 384 poços utilizamos um pipetador semi-automatizado para dispensar os reagentes em apenas 4 pipetagens, o que minimiza os erros de aplicação das amostras, e ainda utilizamos uma lavadora de microplacas de 384 poços. Apesar disso, muitas amostras negativas obtiveram uma reatividade em unidades arbitrárias de fluorescência muito elevada, e por isso, a melhor padronização deste ensaio com maior número de lavagens ou utilizando outras concentrações de detergentes e ainda a utilização de dispositivos automatizados podem otimizar o teste e reduzir as interferências encontradas, possibilitando a realização do FISAt em placas de alta performance.

O FISAt apresentou excelente desempenho nas análises de repetitividade e reprodutibilidade tanto na detecção de anticorpos IgG, quanto na detecção de anticorpos IgM e IgA, com apenas a violação de uma regra de alerta do controle de qualidade interno do teste (R_{12s}), indicando que deve-se realizar inspeções adicionais nos dados dos controles, porém sem a rejeição do teste¹⁶³. Para essas análises e controle do FISAt utilizamos imunoglobulinas humanas específicas, como a IgG, IgM e IgA adsorvidas nas microplacas em diferentes concentrações. Nos testes imunoenzimáticos comerciais e *in house* são utilizadas amostras de soro positivas e negativas para o anticorpo específico como controle da reação do conjugado. No entanto, com as melhorias das condições de saúde e de programas de prevenção de doenças, esse tipo de controle com amostras positivas tende a ser cada vez mais raro, pela ausência de captação de amostras de pacientes infectados. Além disso, a dificuldade de se obter controles é ainda maior para imunoglobulinas mais raras como a IgM, IgA ou IgE, que são produzidas logo no início da infecção ou ainda para os controles de doenças de baixa prevalência na população. A nossa opção de utilizar a adsorção da placa com a proteína de reação do conjugado é simples e eficiente para detectar o quanto esses

conjugados estão reagindo, em unidades arbitrárias de fluorescência, às concentrações de imunoglobulinas pré-determinadas. Esta abordagem é imunologicamente coerente pois simplifica a operação dos testes comerciais e elimina a necessidade de uso de amostras previamente validadas de difícil obtenção.

O FISAt foi sensível e específico na detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii*, com boa concordância entre as técnicas avaliadas. Alguns trabalhos têm investigado o desempenho de ensaios multiplex com detecção simultânea com sensibilidade e especificidade similares quando comparados com o ensaio imunoenzimático ELISA^{179,141}. Um estudo recente mostra o desenvolvimento de um método multiplex de detecção de IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* construído em uma plataforma plasmônica de ouro Toxo-pGOLD com concordância com o ELISA¹⁸⁰. Além disso, em um trabalho anterior realizado pelo nosso grupo, relatamos o aumento da eficiência da detecção simultânea de anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii* a partir de conjugados fluorescentes repurificados com excelente concordância com o ELISA convencional¹⁴⁶. Neste ensaio, observamos também uma diferença na sensibilidade do FISAt quando comparado com o ELISA e o Elecsys, o que ocorreu provavelmente devido à diferença de antígenos utilizados. No Elecsys é utilizado antígeno recombinante SAG1 de *T. gondii*, e no ELISA e no FISAt foram utilizados extrato total de taquizoítos, por isso a maior concordância na detecção das amostras por esses dois testes. Além disso, a forma de mensuração do Elecsys Toxo não é linear como a do FISAt e do ELISA devido a limitações estruturais do ensaio, que é voltado para sensibilidade e não quantificação. A diferença de sensibilidades em testes sorológicos é relatada em vários trabalhos e depende muito dos testes de referências utilizados para análise e dos critérios adotados para a realização do *cut-off*, que devem ser melhor avaliados dependendo da população^{89,98}. Para a triagem de gestantes, deve-se reduzir o número de amostras falso-negativas principalmente para anticorpos IgM anti-*T. gondii*, o que acaba resultando em medidas para aumentar a sensibilidade dos testes para não correr o risco da não identificação de uma gestante positiva. Uma gestante com resultado falso-negativo para toxoplasmose pode dificultar a introdução precoce do tratamento para evitar a infecção fetal.

No FISAt foi possível identificar todas as amostras IgM com resultados positivos tanto pelo método de triagem quanto pelo método confirmatório. Os soros

discordantes, positivos no método comercial não foram reagentes no método confirmatório da reação de Imunofluorescência Indireta (IFAT IgM). Testes comerciais para detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii* normalmente tem um ponto de corte mais baixo, como o utilizado na nossa análise⁸⁵. Deste modo, o exame pode detectar pacientes com sorologia falso-positiva¹⁸¹. Nossos resultados para detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii* pelo FISAt foram similares aos resultados obtidos pelo método comercial Elecsys Toxo quando comparados com o método confirmatório, com uma quantidade próxima de amostras falso-positivas.

Na detecção de IgA anti-*T. gondii* pelo FISAt, 58% das amostras IgM positivas confirmadas pelo IFAT foram também positivas para anticorpos IgA anti-*T. gondii*, assim como relatado em um estudo com a trígem de 62 gestantes pelo ISAGA, com cerca de 70% de positividade para anticorpos IgA em amostras também identificadas com IgG e IgM positivos¹⁸². Além disso, nossos dados demonstraram que a maioria dessas amostras IgA positivas mostraram um perfil de alta afinidade ao antígeno de *T. gondii*, devido provavelmente ao maior tempo de permanência desta imunoglobulina no organismo. Zorgi et al.⁸⁴ relataram que camundongos cronicamente infectados com *T. gondii* apresentaram anticorpos IgA específicos com evidências de maturação da afinidade, e ainda que camundongos imunizados com taquizoítos de *T. gondii* por via oral apresentaram uma maior produção de anticorpos IgA específicos e um menor número de cistos teciduais, o que sugere que esta imunoglobulina pode estar envolvida com proteção em processos anteriores à formação de cistos e que, portanto, este tipo de proteção foi obtido em fases iniciais da infecção. A IgA é a imunoglobulina mais abundante em mamíferos e a sua função primária é manter a homeostase em superfícies mucosas com um importante papel na proteção imunológica no intestino contra patógenos invasores. Assim, estudos complementares e mais detalhados são necessários para verificar a relação deste anticorpo com a proteção da doença. Outros estudos de comparação do FISAt com outros métodos de diagnóstico da toxoplasmose são necessários para avaliar a sensibilidade e especificidade deste teste multiplex, como por exemplo a comparação com o teste de referência do azul de metileno de Sabin e Feldman¹²³, e ainda, avaliações com maiores números de amostras, principalmente para anticorpos IgM e IgA anti-*T. gondii*. O ideal seria avaliar novas técnicas de imunoensaios com amostras clinicamente definidas ou analisadas por

técnicas mais sensíveis e específicas como a PCR, o que torna a obtenção de um painel inviável, dado a dificuldade de se obter essas amostras previamente analisadas por técnicas de biologia molecular, principalmente devido ao fato de que a toxoplasmose é uma doença sobretudo assintomática¹⁷. Devido a isso, muitos estudos de comparação e validação de novos testes sorológicos se baseiam na escolha de um teste de referência comercial, mas nem sempre esses testes fornecem um resultado verdadeiro para todas as amostras, por serem métodos sorológicos e, portanto, com resultados falso-positivos e falso-negativos^{82,83,84}. Como já comentado anteriormente, não podemos deixar de destacar também a importância da avaliação e padronização do *cut-off* (limiar de positividade do ensaio) nos ensaios sorológicos. Muitos trabalhos atuais relatam essa importância, e o quanto a sensibilidade e especificidade pode variar dependendo do *cut-off* selecionado para o ensaio^{89,98}.

O FISAt é um método simples e tem muitas vantagens econômicas, com menor custo de ensaio quando comparado com métodos sorológicos comerciais. Além de não necessitar de equipamentos sofisticados como os métodos multiplex que utilizam micropartículas, o FISAt é feito com as mesmas etapas de um ELISA convencional, como sensibilização, bloqueio, adição de amostras, incubações e lavagens, com a diferença na adição dos conjugados que são fluorescentes e na leitura dessas microplacas que dependem de filtros de excitação e emissão. Além de ser possível fazer 3 testes em 1, com a detecção simultânea de IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii*, o custo é reduzido por não necessitar de agentes colorimétricos. O valor de conjugados específicos peroxidase e fluorescentes e das microplacas são semelhantes, e os outros reagentes utilizados são os mesmos dos ensaios de fase sólida convencionais. O ensaio fluorescente desenvolvido nesse trabalho, além de possibilitar um alto rendimento é um método econômico e simples para uso em laboratórios de análise.

O ELISA convencional foi de extrema importância no século passado e mesmo no momento, utilizando o sistema biexponencial da ligação do conjugado a uma enzima. Diversas amplificações do sistema foram realizadas, ligando enzimas de maior atividade, substratos fluorescentes, e outras abordagens de amplificação, como sistemas avidina-biotina ou similares. Todos estes testes detectam apenas o único antígeno adorvido na fase sólida. Podem ser extremamente sensíveis e confiáveis, mas

para uso em triagem implicam em alto custo de teste e mão de obra. Nosso sistema de detecção simultânea de fluorocromos é completamente diferente, porque utilizamos conjugados que podem ser detectados no mesmo poço, reduzindo o número de ensaios e o tempo de reação. É possível que no futuro outros sistemas multiplexados usando micropartículas possam ser utilizados em citometria de fluxo, num modelo semelhante ao sistema Luminex hoje existente, mas citômetros de fluxo demandam compensação e lasers. Um sistema de 384 poços é lido em 5 minutos no fluorímetro e, portanto, numa velocidade muito mais eficiente e prática para ensaios de triagem de grande número de amostras. Um citômetro de fluxo leva em média 3 minutos para leitura de cada tubo de amostra individualmente, assim levaria cerca de 20 horas para o mesmo trabalho, fora o consumo de grandes quantidades de solvente utilizado em cada análise de tubo, devido ao tamanho do sistema de fluxo¹⁸³.

Devido à praticidade, rapidez e confiabilidade dos imunoenaios, a detecção automatizada de anticorpos contra *T. gondii* tem sido amplamente utilizada em laboratórios clínicos durante as últimas décadas. De fato, a tecnologia moderna forneceu várias ferramentas que facilitam o trabalho de acompanhamento dos laboratórios clínicos, bem como o acompanhamento da doença. Uma dessas ferramentas inclui o ensaio automatizado, padronizado e validado. A validação inclui procedimentos e comparações para determinar a acurácia dos testes, o que tem sua importância evidente, mas um teste comercial validado não implica em bloqueio do desenvolvimento de testes mais eficientes. Nenhum teste sorológico é perfeito, pois na sorologia sempre haverá falso-negativos e falso-positivos. Validar um exame para uso individual, ou seja, garantir ao paciente testado a acurácia do teste é um sofisma comercial, já que não existe nenhum teste com precisão absoluta. Nosso FISAt tem um resultado quantificável semelhante aos testes comerciais e seus limites de sensibilidade e especificidade são adequados para um teste de triagem. Não pretendemos que o FISAt seja o único teste para identificação da toxoplasmose congênita e nem de outras doenças relacionadas, mas acreditamos que por sua sensibilidade e especificidade possa ser um teste ideal para um alto rendimento, que permita triar a maior parte das gestantes para eventos relacionados a toxoplasmose.

Baseado em nosso desenvolvimento de um teste simples e rápido nós especulamos que um algoritmo para a triagem de gestantes para toxoplasmose

congenita envolvendo apenas o nosso teste deveria permitir a seleção de gestantes com rapidez e eficiência (Figura 17). Como nosso método detecta as 3 imunoglobulinas específicas é possível realizar uma separação na triagem pelo FISAt em pacientes protegidos com resultado de IgG positivo e IgM e IgA negativos, caracterizando a infecção crônica, e em pacientes suscetíveis com resultado de IgG, IgM e IgA negativos, mantendo um sistema de retroalimentação que prevê uma triagem mensal, e dessa forma com um único teste resolver os problemas de triagem, e claro, uma vez triado, o protocolo de atendimento deve ser especializado e envolver testes confirmatórios.

A fluorimetria de fase sólida é uma tecnologia atual e promissora com um enorme potencial, dado pela versatilidade de reagentes fluorescentes que permitem múltiplas detecções. As possibilidades de construções a partir deste teste desenvolvido são amplas. A detecção simultânea em fase sólida é facilmente padronizada e validada a partir do uso de filtros corretos. Em placas de 96 poços é possível construir até 6 marcações fluorescentes distintas e ampliar ainda mais essa quantidade de marcações com o uso de placas com poços menores, como de 384 ou 1536 poços, diminuindo a quantidade de reagentes. Além disso, essa construção em fase sólida pode ser transferida facilmente para membranas em sistema de Dot-FISA, podendo detectar não só múltiplos anticorpos como também múltiplos antígenos. E ainda, pode ser que no futuro, o FISAt seja aprimorado para um teste de avididade de anticorpos utilizando 2 leituras sequenciais da mesma placa separadas por uma lavagem com ureia desde que os anticorpos para a construção dos conjugados sejam de alta avididade, o que aumentaria a eficiência diagnóstica no mesmo poço resultando em 6 testes. Esta abordagem é teoricamente possível e demanda novos estudos, mas realça as possibilidades da tecnologia de múltiplas detecções em fase sólida empregada neste trabalho.

O ensaio fluorescente triplex de fase sólida para detecção simultânea de IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* desenvolvido neste trabalho é simples, econômico e de alto rendimento, que num futuro próximo pode ser utilizado como um método inicial de triagem pré-natal da toxoplasmose permitindo o manejo rápido e seguro das gestantes.

Figura 17 - Algoritmo do FISAt para triagem da toxoplasmose em gestantes. Autoria própria.

7 CONCLUSÕES

7.1 Geral

Desenvolvemos um ensaio fluorescente triplex de fase sólida (FISAt) sensível e específico, de alto rendimento e baixo custo para detecção de IgG, IgM e IgA para triagem da toxoplasmose humana.

7.2 Específicas

7.2.1 *Foi possível construir um ensaio fluorescente de fase sólida para detecção conjunta de IgG, IgM e IgA anti-T. gondii*

- a) Foi possível construir conjugados fluorescentes não interferentes, similares aos conjugados comerciais e eficientes para a detecção de imunoglobulinas específicas por fluorescência de fase sólida;
- b) Foi possível padronizar condições ótimas de uso de reagentes para a detecção isolada e simultânea de IgG, IgM e IgA específica contra *T. gondii* na fluorimetria de fase sólida;
- c) A ordem de adição dos fluorocromos de forma separada no mesmo poço de reação foi mais eficiente para a detecção simultânea de IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* no FISAt;
- d) Foi possível padronizar o FISAt nas placas de 384 poços com uma maior quantidade de antígeno e com uma melhor padronização da lavagem e automatização desse teste em placas de alta performance;
- e) A comparação entre as metodologias testadas para marcação do AF647 mostrou que para este fluorocromo a conjugação baseada no excesso molar foi a metodologia mais eficiente;

- f) A seleção de filtros de excitação e da largura da banda passante mais adequados permitiu a detecção conjunta e eficiente de IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* utilizando três fluorocromos distintos com aumento da intensidade de fluorescência e discriminação de amostras positivas e negativas na fluorimetria de fase sólida;
- g) Os dois lotes de conjugados fluorescentes produzidos foram eficientes e discriminaram as amostras de soro positivas e negativas para anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* de maneira similar.

7.2.2 *Foi possível validar o ensaio fluorescente triplex de fase sólida para detecção conjunta de IgG, IgM e IgA anti-T. gondii*

- a) Os conjugados fluorescentes foram estáveis e eficientes para detecção conjunta de IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* por até 18 meses após sua produção;
- b) O FISAt foi reprodutível e equivalente aos ensaios convencionais de uso em laboratórios de análise para o diagnóstico da toxoplasmose humana;
- c) O FISAt foi sensível e específico quando comparado com o ensaio automatizado Elecsys Toxo[®] e com o teste de ELISA.

7.2.3 *Foi possível aplicar o ensaio fluorescente triplex na triagem da toxoplasmose humana com alta eficiência na detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA anti-T. gondii*

- a) O FISAt obteve o mesmo perfil de detecção de amostras IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii*, com menor número de etapas e alta eficiência para uso em triagem de gestantes quando comparado com o Elecsys Toxo[®] e o ELISA convencional.

8 REFERÊNCIAS

1. Dubey JP, Lago EG, Gennari SM, Su C, Jones JL. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology*. 2012;139(11):1375–424.
2. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol*. 2000;30(12–13):1217–58.
3. Nicolle C, Manceaux L. Sur une infection a corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *Comptes rendus l'Académie des Sci*. 1908;147:763–6.
4. Splendore A. Un nuovo protozoa parassita de'conigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-zar dell'uomo. *Rev Soc Sci Sao Paulo*. 1908;3:109–12.
5. Whitelaw JA, Latorre-Barragan F, Gras S, Pall GS, Leung JM, Heaslip A, et al. Surface attachment, promoted by the actomyosin system of *Toxoplasma gondii* is important for efficient gliding motility and invasion. *BMC Biol*. 2017;15(1):1–23.
6. Jones EJ, Korcsmaros T, Carding SR. Mechanisms and pathways of *Toxoplasma gondii* transepithelial migration. *Tissue Barriers*. 2017;5(1):1–11.
7. Krishnamurthy S, Deng B, del Rio R, Buchholz KR, Treeck M, Urban S, et al. Not a simple tether: Binding of *Toxoplasma gondii* AMA1 to RON2 during invasion protects AMA1 from rhomboid-mediated cleavage and leads to dephosphorylation of its cytosolic tail. *MBio*. 2016;7(5):1–12.
8. Carruthers V, Boothroyd JC. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. *Curr Opin Microbiol*. 2007;10(1):83–9.
9. Souza W De, Martins-duarte ÉS, Lemgruber L. Organização estrutural do taquizoíto de *Toxoplasma gondii* Structural organization of the tachyzoite of *Toxoplasma gondii*. *Scientia*. 2010;20(1):131–43.

10. Nadipuram SM, Kim EW, Vashisht AA, Lin AH, Bell HN, Coppens I, et al. In Vivo biotinylation of the *Toxoplasma* parasitophorous vacuole reveals novel dense granule proteins important for parasite growth and pathogenesis. MBio. 2016;7(4):1–15.
11. Lakhrif Z, Moreau A, Hérault B, Di-Tommaso A, Juste M, Moiré N, et al. Targeted delivery of *Toxoplasma gondii* antigens to dendritic cells promote immunogenicity and protective efficiency against toxoplasmosis. Front Immunol. 2018;9:317.
12. Araújo PRB, Ferreira AW. Alta eficiência diagnóstica do IgM ELISA com o uso de múltiplos antígenos peptídicos (MAP1) de *T. gondii* ESA (SAG-1, GRA-1 e GRA-7) na toxoplasmose aguda. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2010;52(2):63–8.
13. Morrison DA, Höglund J. Testing the hypothesis of recent population expansions in nematode parasites of human-associated hosts. Heredity (Edinb). 2005;94(4):426–34.
14. Dubey JP. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol. 1997;28(7):1019–24.
15. Blader IJ, Coleman BI, Chen C-T, Gubbels M-J. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 Years Later. Annu Rev Microbiol. 2015;69:463–85.
16. Dupont CD, Christian DA, Hunter CA. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. Semin Immunopathol. 2012;34(6):793–813.
17. Weiss L, Dubey J. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. Int J Parasitol. 2009;39(8):895–901.
18. Guerra AJ, Carruthers VB. Structural features of apicomplexan pore-forming proteins and their roles in parasite cell traversal and egress. Toxins (Basel). 2017;9(9):pii E265.

19. Dumetre A, Dubey JP, Ferguson DJP, Bongrand P, Azas N, Puech P-H. Mechanics of the *Toxoplasma gondii* oocyst wall. *Proc Natl Acad Sci*. 2013;110(28):11535–40.
20. Jones JL, Dubey JP. Waterborne toxoplasmosis - Recent developments. *Exp Parasitol*. 2010;124(1):10–25.
21. Aramini JJ, Stephen C, Dubey JP, Engelstoft C, Schwantje H RC. Potential contamination of drinking water with *Toxoplasma gondii* oocysts. *Epidemiol Infect*. 1999;122(2):305–15.
22. Garcia Bahia-Oliveira LM, Jones JL, Azevedo-Silva J, Alves CCF, Oréface F, Addiss DG. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in North Rio de Janeiro State, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2003;9(1):55–62.
23. Heukelbach J, Meyer-Cirkel V, Moura RCS, Gomide M, Queiroz JAN, Saweljew P, et al. Waterborne toxoplasmosis, northeastern Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2007;13(2):287–9.
24. Lass A, Pietkiewicz H, Szostakowska B, Myjak P. The first detection of *Toxoplasma gondii* DNA in environmental fruits and vegetables samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31(6):1101–8.
25. Petersen E, Vesco G, Villari S, Buffolano W. What do we know about risk factors for infection in humans with *Toxoplasma gondii* and how can we prevent infections? *Zoonoses Public Health*. 2010;57(1):8–17.
26. Montoya JG, Boothroyd JC, Kovacs JA. *Toxoplasma gondii* [Internet]. [cited 2018 Sep 29]. Available from: <https://oncohemakey.com/toxoplasma-gondii/>
27. Jones JL, Dargelas V, Roberts J, Press C, Remington JS, Montoya JG. Risk Factors for *Toxoplasma gondii* Infection in the United States. *Clin Infect Dis*. 2009;49(6):878–84.

28. Egorov AI, Converse R, Griffin SM, Styles J, Klein E, Sams E, et al. Environmental risk factors for *Toxoplasma gondii* infections and the impact of latent infections on allostatic load in residents of Central North Carolina. *BMC Infect Dis.* 2018;18(1):421.
29. Jiang RL, Ma LH, Ma ZR, Hou G, Zhao Q, Wu X. Seroprevalence and associated risk factors of *Toxoplasma gondii* among Manchu pregnant women in northeastern China. *Microb Pathog.* 2018;123:398–401.
30. Elmore SA, Jenkins EJ, Huyvaert KP, Polley L, Root JJ, Moore CG. *Toxoplasma gondii* in Circumpolar People and Wildlife. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 2012;12(1):1–9.
31. Robert-Gangneux F, Dardé ML. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev.* 2012;25(2):264–96.
32. Boia MN, Carvalho-Costa FA, Sodre FC, Pinto GM, Amendoeira MR. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among indian people living in Iauarete, Sao Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2008;50(1):17–20.
33. Araújo AC, Villela MM, Sena-lobes Â, Farias R, Maria L, Faria J De, et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Toxocara canis* in a human rural population of Southern Rio Grande do Sul. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2018;60(18):e28.
34. Secretaria de Município da Saúde. Santa Maria, Rio Grande do Sul. [Internet]. 2018 [cited 2019 Jan 6]. Available from: <http://www.santamaria.rs.gov.br/saude/noticias/17533-orgaos-de-saude-divulgam-novos-dados-referentes-ao-surto-de-toxoplasmose-em-santa-maria>
35. Rodrigues JP, Frei F, Navarro IT, Silva LP, Marcelino MY, de Andrade-Junior HF, et al. Seroepidemiological analysis of toxoplasmosis in college students. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2015;21(1):1–7.
36. Sampaio BFC, Macre MS, Meireles LR, Andrade HF. Saliva as a source of anti-*Toxoplasma gondii* IgG for enzyme immunoassay in human samples. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(1):72–4.

37. Villena I, Ancelle T, Delmas C, Garcia P, Brézin A P, Thulliez P, Wallon M, King L G V. Congenital toxoplasmosis in France in 2007: first results from a national surveillance system. *Eurosurveillance*. 2010;15(25):pii 19600.
38. Hofhuis A, Van Pelt W, Van Duynhoven YTHP, Nijhuis CDM, Mollema L, Van Der Klis FRM, et al. Decreased prevalence and age-specific risk factors for *Toxoplasma gondii* IgG antibodies in The Netherlands between 1995/1996 and 2006/2007. *Epidemiol Infect*. 2011;139(4):530–8.
39. Halonen SK, Weiss LM. Toxoplasmosis. In: Hector H. Garcia, Herbert B. Tanowitz OHDB, editor. *Handbook of clinical neurology*. Elsevier E. São Paulo; 2014. p. 125–45.
40. de Barros JLVM, Barbosa IG, Salem H, Rocha NP, Kummer A, Okusaga OO, et al. Is there any association between *Toxoplasma gondii* infection and bipolar disorder? A systematic review and meta-analysis. *J Affect Disord*. 2017;209:59–65.
41. Ansari-Lari M, Farashbandi H, Mohammadi F. Association of *Toxoplasma gondii* infection with schizophrenia and its relationship with suicide attempts in these patients. *Trop Med Int Heal*. 2017;22(10):1322–7.
42. Cursino SRT, Costa TB da, Yamamoto JH, Meireles LR, Silva MALG, Andrade Junior HF de. Increased frequency of anti-retina antibodies in asymptomatic patients with chronic *T. gondii* infection. *Clinics*. 2010;65(10):1027–32.
43. Butler NJ, Furtado JM, Winthrop KL, Smith JR. Ocular toxoplasmosis II: clinical features, pathology and management. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2013;41(1):95–108.
44. Kamath YS, Rathinam SR, Kawali A. Ocular toxoplasmosis associated with scleritis. *Indian J Ophthalmol*. 2013;61(6):295–7.
45. Mikhail MA, Varikkara M. The absence of vitreous inflammation: One more challenge in diagnosing toxoplasma papillitis. *BMJ Case Rep*. 2013;1–3.

46. Khurana S, N. B. Toxoplasmosis in organ transplant recipients: Evaluation, implication, and prevention. *Trop Parasitol.* 2016;6(2):123–8.
47. Robert-gangneux F, Meroni V, Dupont D, Botterel F, Garcia JMA, Accoceberry I, et al. Toxoplasmosis in Transplant. 2018;24(8):2010–4.
48. Passos LN, De Araújo Filho OF, De Andrade HF. *Toxoplasma* encephalitis in aids patients in são paulo during 1988 and 1991. A comparative retrospective analysis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2000;42(3):141–5.
49. Antinori A, Larussa D, Cingolani A, Lorenzini P, Bossolasco S, Finazzi MG, et al. Prevalence, associated factors, and prognostic determinants of AIDS-related toxoplasmic encephalitis in the era of advanced highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis.* 2004;39(11):1681–91.
50. Robert-Gangneux F, Sterkers Y, Yera H, Accoceberry I, Menotti J, Cassaing S, et al. Molecular diagnosis of toxoplasmosis in immunocompromised patients: A 3-year multicenter retrospective study. *J Clin Microbiol.* 2015;53(5):1677–84.
51. Corrêa C, Maximino L, Weber S. Hearing Disorders in Congenital Toxoplasmosis: A Literature Review. *Int Arch Otorhinolaryngol.* 2018;22(3):330–3.
52. Ghasemi FS, Rasti S, Piroozmand A, Bandehpour M, Kazemi B, Mousavi SGA, et al. Toxoplasmosis-associated abortion and stillbirth in Tehran, Iran. *J Matern Neonatal Med.* 2016;29(2):248–51.
53. Elbez-Rubinstein A, Ajzenberg D, Dardé M, Cohen R, Dumètre A, Yera H, et al. Congenital Toxoplasmosis and Reinfection during Pregnancy: Case Report, Strain Characterization, Experimental Model of Reinfection, and Review. *J Infect Dis.* 2009;199(2):280–5.
54. Calamy L, Goudjil F, Godineau N, Bolot P. Toxoplasmose congénitale sévère secondaire à une réactivation toxoplasmique chez une mère infectée par le VIH. *Arch Pediatr.* 2015;22(2):181–4.

55. Fernandes RCDSC, Vasconcellos VP, Araújo LC De, Medina-Acosta E. Vertical transmission of HIV and toxoplasma by reactivation in a chronically infected woman. *Braz J Infect Dis.* 2009;13(1):70–1.
56. Montoya JG, Remington JS. Clinical Practice: Management of *Toxoplasma gondii* Infection during Pregnancy. *Clin Infect Dis.* 2008;47(4):554–66.
57. Rabilloud M, Wallon M, Peyron F. In utero and at birth diagnosis of congenital toxoplasmosis: Use of likelihood ratios for clinical management. *Pediatr Infect Dis J.* 2010;29(5):421–5.
58. Dunn D, Wallon M, Peyron F, Petersen E, Peckham C, Gilbert R. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: Risk estimates for clinical counselling. *Lancet.* 1999;353(9167):1829–33.
59. Avelar MV, Martinez VO, de Moura DL, Barros IA, Primo AA da S, Duarte AO, et al. Association between seroprevalence of IgG anti-*Toxoplasma gondii* and risk factors for infection among pregnant women in climério de oliveira maternity, Salvador, Bahia, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2017;59:90.
60. Sroka S, Bartelheimer N, Winter A, Heukelbach J, Ariza L, Ribeiro H, et al. Prevalence and risk factors of toxoplasmosis among pregnant women in Fortaleza, Northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;83(3):528–33.
61. Da Silva MG, Vinaud MC, De Castro AM. Prevalence of toxoplasmosis in pregnant women and vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in patients from basic units of health from Gurupi, Tocantins, Brazil, from 2012 to 2014. *PLoS One.* 2015;10(11):1–15.
62. Avelino MM, Amaral WN, Rodrigues IMX, Rassi AR, Gomes MBF, Costa TL, et al. Congenital toxoplasmosis and prenatal care state programs. *BMC Infect Dis.* 2014;14:33.
63. Lopes-Mori FMR, Mitsuka-Breganó R, Capobianco JD, Inoue IT, Reiche EMV, Morimoto HK, et al. Programs for control of congenital toxoplasmosis. *Rev Assoc Med Bras.* 2011;57(5):581–6.

64. Cohen SB, Denkers EY. The gut mucosal immune response to *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol.* 2015;37(3):108–17.
65. Bliss SK, Gavrilescu LC, Alcaraz ANA, Denkers Y, Alcaraz ANA. Neutrophil Depletion during *Toxoplasma gondii* Infection Leads to Impaired Immunity and Lethal Systemic Pathology Neutrophil Depletion during *Toxoplasma gondii* Infection Leads to Impaired Immunity and Lethal Systemic Pathology. *Infect Immun.* 2001;69(8):4898–905.
66. Gazzinelli RT, Hieny S, Wynn TA, Wolf S, Sher A. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(13):6115–9.
67. Yarovsky F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(2):109–21.
68. Denkers EY, Gazzinelli RT. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(4):569–88.
69. Denkers EY, Butcher BA, Del Rio L, Bennouna S. Neutrophils, dendritic cells and *Toxoplasma*. *Int J Parasitol.* 2004;34(3):411–21.
70. Gazzinelli R, Xu Y, Hieny S, Cheever A SA. Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* 1992;149(1):175–80.
71. Jensen L. Adaptive Immunity of parasites [Internet]. [cited 2018 Sep 24]. Available from: <http://faculty.ucmerced.edu/kjensen5/index.php/research/adaptive-immunity/>
72. Vercammen M, Scorza T, El Bouhdidi A, Van Beeck K, Carlier Y, Dubremetz JF, et al. Opsonization of *Toxoplasma gondii* tachyzoites with nonspecific immunoglobulins promotes their phagocytosis by macrophages and inhibits their proliferation in nonphagocytic cells in tissue culture. *Parasite Immunol.* 1999;21(11):555–63.

73. Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: Transmission, diagnosis, and prevention. Clin Microbiol Infect. 2002;8(10):634–40.
74. Robert-Gangneux F, Belaz S. Molecular diagnosis of toxoplasmosis in immunocompromised patients. Curr Opin Infect Dis. 2016;29(4):330–9.
75. Filisetti D, Sterkers Y, Brenier-Pinchart MP, Cassaing S, Dalle F, Delhaes L, et al. Multicentric Comparative assessment of the bio-evolution *Toxoplasma gondii* detection kit with eight laboratory-developed PCR assays for molecular diagnosis of congenital toxoplasmosis. J Clin Microbiol. 2015;53(1):29–34.
76. Fricker-Hidalgo H, Brenier-Pinchart MP, Schaal JP, Equy V, Bost-Bru C, Pelloux H. Value of toxoplasma gondii detection in one hundred thirty-three placentas for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. Pediatr Infect Dis J. 2007;26(9):845–6.
77. Dard C, Fricker-Hidalgo H, Brenier-Pinchart MP, Pelloux H. Relevance of and New Developments in Serology for Toxoplasmosis. Trends Parasitol. 2016;32(6):492–506.
78. Villard O, Cimon B, L'Ollivier C, Fricker-Hidalgo H, Godineau N, Houze S, et al. Serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection. Recommendations from the French National Reference Center for Toxoplasmosis. Diagn Microbiol Infect Dis. 2016;84(1):22–33.
79. Camargo ME, Leser PG. Diagnostic information from serological tests in human toxoplasmosis. II Evolutive study of antibodies and serological patterns in acquired toxoplasmosis, as detected by hemagglutination, complement fixation, IgG and IgM-immunofluorescence tests. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1976;18(4):227–38.
80. Suzuki LA, Rocha RJ, Rossi CL. Evaluation of serological markers for the immunodiagnosis of acute acquired toxoplasmosis. J Med Microbiol. 2001;50(1):62–70.
81. Csep A. Clinical and biological correlations in acute toxoplasmosis. BMC Infect Dis. 2014;14(7):15.

82. 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.
83. Waldo Sepulveda, Amy E. Wong, Alexandra Casasbuenas AS and JLA. Congenital diaphragmatic hernia in a first-trimester ultrasound aneuploidy screening program. *Prenat Diagn.* 2008;28(6):531–4.
84. Zorgi NE, Jimenez A, Jr G, Notomi M. Immunity in the spleen and blood of mice immunized with irradiated *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Med Microbiol Immunol.* 2016;205(4):297–314.
85. Prusa AR, Hayde M, Unterasinger L, Pollak A, Herkner KR, Kasper DC. Evaluation of the Roche Elecsys Toxo IgG and IgM electrochemiluminescence immunoassay for the detection of gestational *Toxoplasma* infection. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010;68(4):352–7.
86. Trotta M, Borchì B, Zammarchi L, Sterrantino G, Brogi M, Kiros ST, et al. Immunoglobulin M indirect-fluorescent antibody test for the diagnosis of acute toxoplasmosis during pregnancy in the avidity era: A 14-year experience at the Tuscany Reference Center for Infectious Diseases in Pregnancy, Florence, Italy. *J Obstet Gynaecol Res.* 2016;42(12):1699–703.
87. Murat JB, Dard C, Hidalgo HF, Dardé ML, Brenier-Pinchart MP, Pelloux H. Comparison of the Vidas system and two recent fully automated assays for diagnosis and follow-up of toxoplasmosis in pregnant women and newborns. *Clin Vaccine Immunol.* 2013;20(8):1203–12.
88. Murat JB, Hidalgo HF, Brenier-Pinchart MP, Pelloux H. Human toxoplasmosis: which biological diagnostic tests are best suited to which clinical situations? *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2013;11(9):943–56.
89. Meylan P, Paris L, Liesenfeld O, Elecsys T, Igg T. Multicenter evaluation of the Elecsys Toxo IgG and IgM tests for the diagnosis of infection with *Toxoplasma gondii*. *Eur J Microbiol Immunol.* 2015;5(2):150–8.

90. Leslé F, Touafek F, Fekkar A, Mazier D, Paris L. Discrepancies between a new highly sensitive *Toxoplasma gondii* ELISA assay and other reagents : interest of Toxo IgG Western blot. 2011;1207–12.
91. Zhang K, Lin G, Han Y, Li J. Serological diagnosis of toxoplasmosis and standardization. Clin Chim Acta. 2016;461:83–9.
92. Gardner IA, Greiner M, Dubey JP. Statistical evaluation of test accuracy studies for *Toxoplasma gondii* in food animal intermediate hosts. Zoonoses Public Health. 2010;57(1):82–94.
93. Naghili B, Abbasalizadeh S, Tabrizi S, Rajaii M. Comparison of IIF , ELISA and IgG avidity tests for the detection of anti-*Toxoplasma* antibodies in single serum sample from pregnant women. 2017;50–6.
94. Pour Abolghasem S, Bonyadi MR, Babaloo Z, Porhasan A, Nagili B, Gardashkhani OA, et al. IgG avidity test for the diagnosis of acute *Toxoplasma gondii* infection in early pregnancy. Iran J Immunol. 2011;8(4):251–5.
95. Jenum PA, Stray-Pedersen B, Gundersen AG. Improved diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in early pregnancy by determination of antitoxoplasma immunoglobulin G avidity. J Clin Microbiol. 1997;35(8):1972–7.
96. Flori P, Tardy L, Patural H, Belleste B, Varlet M-N, Hafid J, et al. Reliability of immunoglobulin G antitoxoplasma avidity test and effects of treatment on avidity indexes of infants and pregnant women. Clin Diagn Lab Immunol. 2004;11(4):669–74.
97. Findal G, Stray-Pedersen B, Holter EK, Berge T, Jenum PA. Persistent low *Toxoplasma* IgG avidity is common in pregnancy: Experience from antenatal testing in Norway. PLoS One. 2015;10(12):1–10.
98. Mouri O, Kendjo E, Touafek F, Fekkar A, Konte O, Imbert S, et al. The impact of lowering the cut-off value on the sensitivity of the Platelia Elisa IgG (Bio-Rad) test for toxoplasmosis diagnosis. Parasite. 2015;22:22.

99. Villard O, Cimon B, L'Ollivier C, Fricker-Hidalgo H, Godineau N, Houze S, et al. Help in the choice of automated or semiautomated immunoassays for serological diagnosis of toxoplasmosis: Evaluation of nine immunoassays by the French National Reference Center for Toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 2016;54(12):3034–42.
100. Wilson M, Remington JS, Clavet C, Varney G, Press C, Ware D, et al. Evaluation of Six Commercial Kits for Detection of Human Immunoglobulin M Antibodies to *Toxoplasma gondii*. *Microbiology.* 1997;35(12):3112–5.
101. Petersen E, Borobio MV, Guy E, Meroni V, Naessens A, Spranzi E, et al. 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 European Multicenter Study of the LIAISON Automated Diagnostic System for Det. 2005;43(4):1570–4.
102. Calderaro A, Piccolo G, Peruzzi S, Gorrini C, Chezzi C, Dettori G. Evaluation of *Toxoplasma gondii* immunoglobulin G (IgG) and IgM assays incorporating the new Vidia analyzer system. *Clin Vaccine Immunol.* 2008;15(7):1076–9.
103. Maudry A, Chene G, Chatelain R, Patural H, Belleste B, Tisseur B, et al. Bicentric evaluation of six anti-*Toxoplasma* immunoglobulin G (IgG) automated immunoassays and comparison to the Toxo II IgG Western blot. *Clin Vaccine Immunol.* 2009;16(9):1322–6.
104. Mahinc C, Flori P, Delaunay E, Guillerme C, Charaoui S, Raberin H, et al. Evaluation of a new immunochromatography technology test (LDBio diagnostics) to detect *Toxoplasma* IgG and IgM: Comparison with the routine architect technique. *J Clin Microbiol.* 2017;55(12):3395–404.
105. Gay-Andrieu F, Fricker-Hidalgo H, Sickinger E, Espern A, Brenier-Pinchart MP, Braun HB, et al. Comparative evaluation of the ARCHITECT Toxo IgG, IgM, and IgG Avidity assays for anti-*Toxoplasma* antibodies detection in pregnant women sera. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009;65(3):279–87.
106. Sickinger E, Braun HB, Praast G, Stieler M, Gundlach C, Birkenbach C, et al. Evaluation of the Abbott ARCHITECT Toxo IgM assay. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009;64(3):275–82.

107. Murat JB, L'Ollivier C, Hidalgo HF, Franck J, Pelloux H, Piarroux R. Evaluation of the new Elecsys Toxo IgG avidity assay for toxoplasmosis and new insights into the interpretation of avidity results. *Clin Vaccine Immunol*. 2012;19(11):1838–43.
108. Laurent Mandelbrot, François Kieffer, Rémi Sitta, Hélène Laurichesse-Delmas, Norbert Winer, Louis Mesnard, Alain Berrebi, Gwenaëlle Le Bouar, Jean-Paul Bory, Anne-Gaëlle Cordier, Yves Ville FP. Prenatal therapy with pyrimethamine + sulfadiazine vs spiramycin to reduce placental transmission of toxoplasmosis: a multicenter, randomized trial. *J Obstet Gynecol*. 2018;2019(4):386.
109. Rostami A, Karanis P, Fallahi S. Advances in serological, imaging techniques and molecular diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection. *Infection*. 2018;46(3):303–15.
110. Pomares C, Montoya JG. Laboratory diagnosis of congenital toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*. 2016;54(10):2448–54.
111. Mitsuka-breganó R, Lopes-mori FMR. Toxoplasmose adquirida na gestação e congênita: vigilância em saúde, diagnóstico, tratamento e condutas. In: *Rotina para toxoplasmose adquirida na gestação*. EDUEL. Londrina; 2010. p. 31–8.
112. Liesenfeld O, Montoya JG, Tathineni NJ, Davis M, Brown BW, Cobb KL, et al. Confirmatory serologic testing for acute toxoplasmosis and rate of induced abortions among women reported to have positive *Toxoplasma* immunoglobulin M antibody titers. *Am J Obstet Gynecol*. 2001;184(2):140–5.
113. Stajner T, Bobic B, Klun I, Nikolic A, Srbljanovic J, Uzelac A, et al. Prenatal and Early Postnatal Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis in a Setting With No Systematic Screening in Pregnancy. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(9):2979.
114. Chêne G, Thiébaud R. Options for clinical trials of pre and post-natal treatments for congenital toxoplasmosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(2):299–304.

115. Lago EG, Baldisserotto M, Hoefel Filho JR, Santiago D, Jungblut R. Agreement between ultrasonography and computed tomography in detecting intracranial calcifications in congenital toxoplasmosis. *Clin Radiol*. 2007;62(10):1004–11.
116. Carral L, Kaufer F, Pardini L, Durlach R, Moré G, Venturini MC, et al. Toxoplasmosis congénita: Diagnóstico serológico, RPC, aislamiento y caracterización molecular de *Toxoplasma gondii*. *Rev Chil infectología*. 2018;35(1):36–40.
117. Pinon JM, Dumon H, Chemla C, Franck J, Petersen E, Zufferey J, et al. Strategy for Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis: Evaluation of Methods Comparing Mothers and Newborns and Standard Methods for Postnatal Detection of Immunoglobulin G , M , and A Antibodies Strategy for Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis : Evaluati. *J Clin Microbiol*. 2001;39(6):2267–71.
118. Gilbert RE, Thalib L, Hooi KT, Paul M, Wallon M, Petersen E. Screening for congenital toxoplasmosis: Accuracy of immunoglobulin M and immunoglobulin A tests after birth. *J Med Screen*. 2007;14(1):8–13.
119. Murat JB, Souvignet A, Pelloux H, Fricker-Hidalgo H, Brenier-Pinchart MP, Bost-Bru C, et al. Assessment of the IgA immunosorbent agglutination assay for the diagnosis of congenital toxoplasmosis on a series of 145 toxoplasmic seroconversions. *Clin Vaccine Immunol*. 2015;22(4):456–8.
120. Fonseca LT, Silveira RC, Procianoy RS. Ureaplasma bacteremia in very low birth weight infants in Brazil. *Pediatr Infect Dis J*. 2011;30(12):1052–5.
121. de Castro Zacche-Tonini A, Fonseca GSF, de Jesus LNNP, Barros GB, Coelho-dos-reis JGA, Béla SR, et al. Establishing tools for early diagnosis of congenital toxoplasmosis: Flow cytometric IgG avidity assay as a confirmatory test for neonatal screening. *J Immunol Methods*. 2017;451:37–47.
122. Magi B, Migliorini L. Western blotting for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. *New Microbiol*. 2011;34(1):93–5.
123. Sabin AB, Feldman HA. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (*Toxoplasma*). *Science*. 1948;108(2815):660–3.

124. Jacobs L, Lunde MN. Hemagglutination test for toxoplasmosis. *Science*. 1957;125(3256):1035.
125. Kelen AE, Ayllon-Leindl L, Labzoffsky NA. Indirect Fluorescent Antibody Method in Serodiagnosis of Toxoplasmosis. *Can J Microbiol*. 1962;8(4):545–545.
126. Fricker-Hidalgo H, L'Ollivier C, Bosson C, Imbert S, Bailly S, Dard C, et al. Interpretation of the Elecsys Toxo IgG avidity results for very low and very high index: study on 741 sera with a determined date of toxoplasmosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017;36(5):847–52.
127. Fonseca ZC, Maria I, Rodrigues X, Avelar JB, Castro AM, Avelino MM. IgG Avidity Test in Congenital Toxoplasmosis Diagnoses in Newborns. *Pathogens*. 2017;6(2):26.
128. Holec-Gasior L. *Toxoplasma gondii* recombinant antigens as tools for serodiagnosis of human toxoplasmosis: Current status of studies. *Clin Vaccine Immunol*. 2013;20(9):1343–51.
129. Mirzadeh A, Saadatnia G, Golkar M, Babaie J, Noordin R. Production of refolded *Toxoplasma gondii* recombinant SAG1-related sequence 3 (SRS3) and its use for serodiagnosis of human toxoplasmosis. *Protein Expr Purif*. 2017;133:66–74.
130. Hegazy S, Farid A, Rabae I, El-Amir A. Novel IMB-ELISA assay for rapid diagnosis of human toxoplasmosis using SAG1 antigen. *Jpn J Infect Dis*. 2015;68(6):474–80.
131. Binnicker MJ, Jespersen DJ, Harring JA. Multiplex detection of IgM and IgG class antibodies to *Toxoplasma gondii*, rubella virus, and cytomegalovirus using a novel multiplex flow immunoassay. *Clin Vaccine Immunol*. 2010;17(11):1734–8.
132. Vira S, Mekhedov E, Humphrey G, Blank PS. Fluorescent-labeled antibodies: Balancing functionality and degree of labeling. *Anal Biochem*. 2010;402(2):146–50.

133. Hemmila I. Fluoroimmunoassays and immunofluorometric assays. *Clin Chem.* 1985;31(3):359–70.
134. Panchuk-voloshina N, Haugland RPRP, Bishop-stewart J, Bhalgat MK, Millard PJ, Mao F, et al. Alexa Dyes , a Series of New Fluorescent Dyes that Yield. *J Histochem Cytochem.* 1999;47(9):1179–88.
135. Jacobsen MT, Fairhead M, Fogelstrand P, Howarth M. Amine Landscaping to Maximize Protein-Dye Fluorescence and Ultrastable Protein-Ligand Interaction. *Cell Chem Biol.* 2017;24(8):1040–7.
136. Gautam S, Loh KC. Immobilization of hydrophobic peptidic ligands to hydrophilic chromatographic matrix: A preconcentration approach. *Anal Biochem.* 2012;423(2):202–9.
137. So WH, Zhang Y, Kang W, Wong CTT, Sun H, Xia J. Site-selective covalent reactions on proteinogenic amino acids. *Curr Opin Biotechnol.* 2017;48:220–7.
138. Giannelli S, Taddeo A, Presicce P, Villa ML, Della Bella S. A six-color flow cytometric assay for the analysis of peripheral blood dendritic cells. *Cytom Part B - Clin Cytom.* 2008;74(6):349–55.
139. Iijima M, Matsuzaki T, Yoshimoto N, Niimi T, Tanizawa K, Kuroda S. Fluorophore-labeled nanocapsules displaying IgG Fc-binding domains for the simultaneous detection of multiple antigens. *Biomaterials.* 2011;32(34):9011–20.
140. Eaton SL, Hurtado ML, Oldknow KJ, Graham LC, Marchant TW, Gillingwater TH, et al. A Guide to Modern Quantitative Fluorescent Western Blotting with Troubleshooting Strategies. *J Vis Exp.* 2014;(93):1–10.
141. Leligdowicz A, Conroy AL, Hawkes M, Zhong K, Lebovic G, Matthay MA, et al. Validation of two multiplex platforms to quantify circulating markers of inflammation and endothelial injury in severe infection. *PLoS One.* 2017;12(4):1–14.

142. Griffin SM, Chen IM, Fout GS, Wade TJ, Egorov AI. Development of a multiplex microsphere immunoassay for the quantitation of salivary antibody responses to selected waterborne pathogens. *J Immunol Methods*. 2011;364(1–2):83–93.
143. De Jager W, Rijkers GT. Solid-phase and bead-based cytokine immunoassay: A comparison. *Methods*. 2006;38(4):294–303.
144. Wong SJ, Furuya A, Zou J, Xie X, Dupuis AP, Kramer LD, et al. A Multiplex Microsphere Immunoassay for Zika Virus Diagnosis. *EBioMedicine*. 2017;16:136–40.
145. Davey HM, Kell DB. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. *Microbiol Rev*. 1996;60(4):641–96.
146. Rodrigues JP, Andrade HF. Efficient duplex solid-phase fluorescent assay (dFISA) for the simultaneous detection of specific anti-*T. gondii* IgG and IgM due to refined conjugates. *J Immunol Methods*. 2015;420:11–7.
147. Bioquest. AAT Bioquest Spectrum Viewer [Internet]. [cited 2018 Nov 15]. Available from: <https://www.aatbio.com/spectrum/>
148. Rockland, Immunochemicals. DyLight Multiplex Fluorescent Western Blot Kits [Internet]. [cited 2018 Nov 15]. Available from: <https://rockland-inc.com/DyLight-Multiplex-Fluorescent-Western-Blot-Kits.aspx>
149. Zhang W, Lou X, Meng X, Zhu L. Representation method for spectrally overlapping signals in flow cytometry based on fluorescence pulse time-delay estimation. *Sensors (Switzerland)*. 2016;16(11):1–16.
150. Meireles LR, Ekman CCJ, Andrade Jr HF de, Luna EJ de A. Human Toxoplasmosis Outbreaks and the Agent Infecting Form. Findings From a Systematic Review. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2015;57(5):369–76.

151. Prusa A, Kasper DC, Sawers L, Walter E, Hayde M, Stillwaggon E. Congenital toxoplasmosis in Austria: Prenatal screening for prevention is cost-saving. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;10(17):5648.
152. Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 8th ed. Washington: National Academies Press. 2011.
153. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. *Princípios Éticos na Experimentação Animal*. São Paulo: COBEA; 1991.
154. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72(1-2):248-54.
155. Becton, Dickinson, Company. *BD Biosciences Spectrum Viewer* [Internet]. [cited 2018 Nov 15]. Available from: <http://www.bdbiosciences.com/us/s/spectrumviewer>
156. Anderson GP, Nerurkar NL. Improved fluoroimmunoassays using the dye Alexa Fluor 647 with the RAPTOR, a fiber optic biosensor. *J Immunol Methods*. 2002;271(1-2):17-24.
157. Fujiwara K, Kitagawa T. A new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for spermidine using glutaraldehyde coupling of the hapten to carrier-coated microtiter plates. *J Biochem*. 1993;114(5):708-13.
158. Shen WC, Ryser HJ. Conjugation of poly-L-lysine to albumin and horseradish peroxidase: a novel method of enhancing the cellular uptake of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978;75(4):1872-6.
159. Rodrigues JP. *Testes fluorimétricos na sorologia da toxoplasmose humana: detecção simultânea de anticorpos IgG e IgM específicos*. [dissertação]. São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2014.

160. Clinical and Laboratory Standards Institute. User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved guideline, document EP12-A2. 2th ed. Wayne, Pennsylvania: CLSI; 2008.
161. Landis JR, Koch GG. An Application of Hierarchical Kappa-type Statistics in the Assessment of Majority Agreement among Multiple Observers. *Biometrics*. 1977;33(2):363.
162. Mioranza SDL, Meireles LR, Mioranza EL, De Andrade HF. Evidência sorológica da infecção aguda pelo *Toxoplasma gondii* em gestantes de Cascavel, Paraná. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008;41(6):628–34.
163. Henry RJ, Segalove M. The running of standards in clinical chemistry and the use of the control chart. *J Clin Pathol*. 1952;5:305–11.
164. Szabó Á, Szendi-Szatmári T, Ujlaky-Nagy L, Rádi I, Vereb G, Szöllősi J, et al. The Effect of Fluorophore Conjugation on Antibody Affinity and the Photophysical Properties of Dyes. *Biophys J*. 2018;114(3):688–700.
165. Boylan NJ, Zhou W, Proos RJ, Tolbert TJ, Wolfe JL, Laurence JS. Conjugation site heterogeneity causes variable electrostatic properties in Fc conjugates. *Bioconjug Chem*. 2013;24(6):1008–16.
166. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas. São Paulo [Internet]. [cited 2018 Oct 10]. Available from: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/sp/pesquisa/20/0?tipo=grafico&indicador=29778>
167. Souza C de O, Tashima NT, Silva MA da, Tumitan ARP. [Cross-sectional study on toxoplasmosis among female students on a university course in the Presidente Prudente region, State of Sao Paulo]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010;43(1):59–61.
168. Vogt R V., Phillips DL, Omar Henderson L, Whitfield W, Spierto FW. Quantitative differences among various proteins as blocking agents for ELISA microtiter plates. *J Immunol Methods*. 1987;101(1):43–50.

169. Huber D, Rudolf J, Ansari P, Galler B, Führer M, Hasenhindl C, et al. Effectiveness of natural and synthetic blocking reagents and their application for detecting food allergens in enzyme-linked immunosorbent assays. *Anal Bioanal Chem.* 2009;394(2):539–48.
170. Hakami AR, Ball JK, Tarr AW. Non-ionic detergents facilitate non-specific binding of M13 bacteriophage to polystyrene surfaces. *J Virol Methods.* 2015;221:1–8.
171. Randolph JB, Waggoner AS. Stability, specificity and fluorescence brightness of multiply-labeled fluorescent DNA probes. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(14):2923–9.
172. Stenberg M, Nygren H. Kinetics of antigen-antibody reactions at solid-liquid interfaces. *J Immunol Methods.* 1988;113(1):3–15.
173. Domeradzka NE, Werten MWT, Wolf FA d., de Vries R. Protein cross-linking tools for the construction of nanomaterials. *Curr Opin Biotechnol.* 2016;39:61–7.
174. Almlie CK, Hsiao A, Burrows SM. Dye-Specific Wavelength Offsets to Resolve Spectrally Overlapping and Co-Localized Two-Photon Induced Fluorescence. *Anal Chem.* 2016;88(2):1462–7.
175. Roy M, Niu CJ, Wilson BC. Effect of tissue optics on wavelength optimization for quantum dot-based surface and subsurface fluorescence imaging for quantum dot-based surface and subsurface. *J Biomed Opt.* 2012;17(2):26002.
176. Brennan JC, Tillitt DE. Development of a dual luciferase activity and fluorescamine protein assay adapted to a 384 micro-well plate format: Reducing variability in human luciferase transactivation cell lines aimed at endocrine active substances. *Toxicol Vitro.* 2018;47:18–25.
177. Tang H, Panemangalore R, Yarde M, Zhang L, Cvijic ME. 384-Well Multiplexed Luminex Cytokine Assays for Lead Optimization. *J Biomol Screen.* 2016;21(6):548–55.

178. Fiema B, Harris AC, Gomez A, Pongtornpipat P, Lamiman K, Vander Lugt MT, et al. High throughput sequential ELISA for validation of biomarkers of acute graft-versus-host disease. *J Vis Exp.* 2012;(68):6–11.
179. Karanikola SN, Krücken J, Ramünke S, De Waal T, Höglund J, Charlier J, et al. Development of a multiplex fluorescence immunological assay for the simultaneous detection of antibodies against *Cooperia oncophora*, *Dictyocaulus viviparus* and *Fasciola hepatica* in cattle. *Parasites and Vectors.* 2015;8(1):1–11.
180. Li X, Pomares C, Koh B, Zhu S, Gong M, Montoya JG, et al. Gold Chips : towards Making Mass Screening Possible with Dye Test. 2016;54(7):1726–33.
181. Flori P, Chene G, Variet MN, Tran Manh Sung R. Sérologie de la toxoplasmose chez la femme enceinte: Caractéristiques et pièges. *Ann Biol Clin (Paris).* 2009;67(2):125–33.
182. Henrique F, Murata A, Ferreira MN, Camargo NS, Santos GS, Cosentino L, et al. Short Communication Frequency of anti- *Toxoplasma gondii* IgA , IgM , and IgG antibodies in high-risk pregnancies , in Brazil. 2016;49(4):512–4.
183. Chapman G V. Instrumentation for flow cytometry. *J Immunol Methods.* 2000;243(1–2):3–12.

ANEXO A – Termo de consentimento livre e esclarecido utilizado para a coleta das amostras de pacientes com pedido de exame para toxoplasmose do HCFMUSP.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ESTUDO: TESTES FLUORIMÉTRICOS NA SOROLOGIA DA TOXOPLASMOSE HUMANA

Você está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você.

Eu, _____, portador da Cédula de identidade, RG _____, e inscrito no CPF/MF _____ nascido(a) em ____ / ____ / _____, abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade em participar como voluntário(a) do estudo “Testes fluorimétricos na sorologia da toxoplasmose humana” Eu _____, Declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas.

Estou ciente que:

- I) O estudo se faz necessário para que se possam descobrir novas metodologias para diagnóstico da doença denominada **“Toxoplasmose”**;
- II) Será feita uma única coleta de 5 mL de sangue no momento do consentimento informado ou será disponibilizado 1mL de soro de amostra coletada com finalidade semelhante;
- III) Essa (s) coleta (s) será feita apenas para este estudo e em nada influenciará (influenciarão) o meu tratamento; não vai (vão) me curar; não vai (vão) me causar nenhum problema;
- IV) A participação neste projeto não tem objetivo de me submeter a um tratamento, bem como não me acarretará qualquer ônus pecuniário com relação aos procedimentos médico-clínico-terapêuticos efetuados com o estudo;

V) Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;

VI) A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico. Não virá interferir no atendimento ou tratamento médico;

VII) Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados;

VIII) Caso eu desejar, poderei pessoalmente tomar conhecimento dos resultados, ao final desta pesquisa:

☐ Desejo conhecer os resultados desta pesquisa

☐ Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa

IX) Concordo que o material poderá ser utilizado em outros projetos desde que autorizado pela Comissão de Ética deste Instituto e pelo responsável por esta pesquisa:

☐ Sim

☐ Não

São Paulo, de de 2016

☐ Paciente / ☐ Responsável

.....
Testemunha 1: _____

Nome / RG / Telefone

Testemunha 2: _____

Nome / RG / Telefone

Responsável pelo projeto:

Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Junior – **CRM 24325**

Telefone para contato: (11) 30617010

ANEXO B- Aprovação da Comissão de Pesquisa e Ética do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (CEP-IMT) e da Comissão de Ética para Análises de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq- HC FMUSP).

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil - e-mail: cpq-imt@usp.br
Telefones: (55) 11-3061-8650, FAX (55) 11-3064-5132

São Paulo, 09 de Abril de 2014

Ilmo(a)
Dr(a). Heitor Franco de Andrade Junior
(aos cuidados de Jaqueline Polizeli Rodrigues)

Em reunião na presente data, a Comissão de Pesquisa e Ética e Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa, do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, analisou e **APROVOU**, no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, o projeto de pesquisa classificado sob número **CPE-IMT/000276A 'Testes fluorimétricos na sorologia da toxoplasmose humana: detecção conjunta de anticorpos (IgG, IgM, IgA) anti-Toxoplasma gondii para triagem de gestantes'**, sob a sua responsabilidade.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CEUA-IMT, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais – Lei n 11.794, 8 de outubro de 2008).

Com relação à parte do projeto que envolve utilização de material humano, a CEP-IMT tomou ciência, sendo que o projeto deverá ser enviado ao Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da USP, para aprovação.

Atenciosamente,

Dr. Expedito José de Albuquerque Luna
Presidente da Comissão de Pesquisa e Ética do IMT-USP

Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa do IMT-USP

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: TESTES FLUORIMÉTRICOS NA SOROLOGIA DA TOXOPLASMOSE HUMANA
Pesquisador Responsável: Heitor Franco de Andrade Junior **Versão:** 2
Pesquisador Executante: Jaqueline Polizeli Rodrigues **CAAE:** 01539512.8.0000.0068
Finalidade Acadêmica: Mestrado
Instituição: HCFMUSP
Departamento: MEDICINA TROPICAL

NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de relatório parcial
Justificativa: Encaminhamento de relatório parcial e pedido de prorrogação de prazos
Data do envio: 18/02/2014

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 8564

Número do Parecer: 535.950

Data da Relatoria: 19/02/14

Apresentação da Notificação: O relatório conciso sobre o andamento do projeto reporta o estabelecimento da padronização do ensaio fluométrico multiplex para detecção de anticorpos IgG e IgM anti *Toxoplasma gondii* foi realizada com 140 amostras de soro sendo bem sucedido. Parte das análises do projeto original foi utilizada como material de tese de mestrado da aluna Jaqueline Polizeli Rodrigues concluída em fevereiro de 2014.

Objetivo da Notificação: Solicitar a prorrogação de prazo até março de 2018 para a realização do projeto tanto da sua versão original como na nova versão que inclui o biorrepositório com 481 amostras já coletadas segundo o pesquisador responsável pelo mesmo. As análises complementares deverão fazer parte da tese de doutorado da mesma aluna sem acarretar alterações nas metodologias empregadas nem no TCLE.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Não se aplica.

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Comentários e Considerações sobre a Notificação: Notificação justificável considerando que a prorrogação visa a continuidade do projeto inicial que será material de tese de doutorado da aluna nesse período.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Não se aplicam.

Recomendações: Não se aplicam.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Não há pendências.

Situação do Parecer: Aprovado.

Necessita Apreciação da CONEP: Não.

Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

São Paulo, 19 de Fevereiro de 2014

PROF. DR. ALFREDO JOSÉ MANSUR
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com o item IX.2 da Resolução CNS nº 196/96 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

São Paulo, 19 de Julho de 2013

Prof. Dr. Alfredo José Mansur
Vice-Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq