Jaqueline Polizeli Rodrigues

**Testes fluorimétricos na sorologia da toxoplasmose humana: detecção
simultânea de anticorpos IgG e IgM específicos**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Medicina Tropical de São Paulo da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais
e Saúde Internacional

Orientador: Dr. Heitor Franco de Andrade
Junior

São Paulo

2013

Jaqueline Polizeli Rodrigues

**Testes fluorimétricos na sorologia da toxoplasmose humana: detecção
simultânea de anticorpos IgG e IgM específicos**

Dissertação apresentada ao Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: Dr. Heitor Franco de Andrade Junior

São Paulo

2013

Ficha catalográfica
Preparada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da
Universidade de São Paulo
© Reprodução autorizada pelo autor

Rodrigues, Jaqueline Polizeli

Testes fluorimétricos na sorologia da toxoplasmose humana:
detecção simultânea de anticorpos IgG e IgM específicos / Jaqueline
Polizeli Rodrigues. – São Paulo, 2013.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Medicina Tropical de São
Paulo da Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional
Orientador: Heitor Franco de Andrade Júnior

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

USP/IMTSP/BIB-19/2013.

*Dedico este trabalho especialmente
ao meu pai, Domingos, a minha mãe
Marilene e ao meu irmão Heitor*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Heitor Franco de Andrade Jr.**, pela oportunidade, orientação e confiança depositada, incentivos, paciência e ensinamentos;

Aos meus pais, **Domingos Rodrigues** e **Marilene Polizeli Rodrigues** e meu irmão **Heitor Polizeli Rodrigues**, por todo apoio, pela paciência e amor incondicional;

Ao **Francisco Luis Rodrigues**, meu querido vô, por sempre me incentivar e apoiar na realização desse trabalho;

À **Andrea da Costa**, **Nahiara Esteves Zorgi**, **Joana Gabriela Desiderato** e **Raissa Char Forgoso**, pela amizade e carinho, pelo auxílio diário nos experimentos e principalmente pelas conversas nos momentos mais difíceis. Obrigada por sempre me ouvirem.

Ao Prof. Dr. **Andrés Jimenez Galisteo Jr.**, por compartilhar seus conhecimentos e sua experiência em laboratório, pelo auxílio nas correções da dissertação;

À Dr. **Thelma Suely Okay** e ao Dr. **Cristovão Luis Pitangueira Manguiera** pelas sugestões durante a qualificação;

À **Laura Masami Sumita**, “mãe oriental”, pelo auxílio e incentivo, sempre disposta a ajudar;

À **Érika Gracielle Pinto**, pela amizade, paciência, apoio e companheirismo;

À Dr^a. **Natalya Zaidan Maluf**, Dr^a. **Eliane Aparecida Rosseto** e Prof. Dr^a **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 validação do ensaio imunofluorescente desenvolvido nesse trabalho;

À **Silvia Cristina Leopoldino**, ao **Luciano Monteiro da Silva**, à **Roselaine Pereira Alvim Cardoso** e **Solange Fernandes dos Santos**, pela assistência diária, sem a qual a execução deste trabalho não seria possível;

Aos companheiros do Laboratório de Protozoologia: **Luciana Regina Jaguaribe Ekman**, **Marina Cortez Demicheli**, **Bruna Macedo**, **Barbara Fialho Sampaio**, **Camila Aparecida de Carvalho**, **Michel Rodrigues Ferreira Grillo**, **Vanessa Rodrigues Silva**, **Nathaly Montagnana**, **Elizama Carneiro M. Bezerra**, **Talita Caroline Coelho dos Santos**, **Thiago Fidelis Ferrão**, **Alessandra Krakhecke**, **Karen Cristine**, pelas contribuições a este trabalho e pelos bons momentos compartilhados;

À **Capes**, pelo apoio financeiro;

Ao **LIM49**, pelo suporte ao projeto;

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

*"A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar,
não seremos capazes de resolver os problemas causados
pela forma como nos acostumamos a ver o mundo"*

Albert Einstein

RESUMO

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; 2013.

A toxoplasmose, protozoose disseminada de baixa morbidade, apresenta número significativo de doença ocular, congênita ou do sistema nervoso central. O diagnóstico é sorológico por diferentes testes, mas limiares baixos e variação individual levam a frequentes problemas. Novos imunoenaios fluorescentes de fase sólida (FLISA) usam a quantificação direta de anticorpos. Aqui, desenvolvemos um FLISA multiplex (FLISAm) para a detecção simultânea de anticorpos IgG e IgM contra *Toxoplasma gondii*. Após padronização, a eficiência do FLISAm com conjugados comerciais foi feita inicialmente de forma isolada para cada imunoglobulina em 140 amostras de soro de universitários previamente analisadas pelo ELISA IgG/IgM. FLISA IgG mostrou boa concordância (Kappa=0,7088), com sensibilidade de 83,3% e especificidade de 94,2%, enquanto FLISA IgM apresentou boa concordância (K=0,6026), menor sensibilidade de 55,5% e igual especificidade de 98,4%. Foram produzidos novos conjugados fluorescentes de maior especificidade e seu desempenho no FLISAm foi validado em 24 amostras e sua eficiência foi avaliada em 120 amostras conhecidas de soro de gestantes. FLISAm mostrou excelente concordância, tanto para a detecção de anticorpos IgG (K=0,8837, sensibilidade=100,0%, especificidade=87,5%), quanto para a detecção de anticorpos IgM (K=0,9187, sensibilidade=100%, especificidade=99,1%) com excelente reprodutibilidade. O teste desenvolvido é rápido, econômico, de fácil execução, alto rendimento e que pode ser utilizado como método de triagem de soroconversão em mulheres grávidas, útil em aplicações de grande número de amostras como o cuidado pré-natal.

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

ABSTRACT

Rodrigues JP. Fluorimetric immunoassay in human toxoplasmosis: simultaneous detection of specific IgG and IgM antibodies. (dissertation). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2013.

Toxoplasmosis, a disseminated low morbidity protozoan disease, presented significant numbers of affected people, mainly ocular disease, fetal infections or encephalitis in immune deficient patients. Serology is the main diagnosis with commercial antibody assays, but individual variation or low thresholds cause many inconsistencies. New solid phase immunofluorescence assays (FLISA) allows direct antibody quantification in microplates. Here, we developed a multiplex FLISA (FLISAm) for simultaneous detection of IgG and IgM anti-*Toxoplasma gondii* antibodies. After standardization, the efficiency of this method was initially analyzed in isolated FLISA for each immunoglobulin with commercial conjugates in 140 serum samples of the students previously screened by IgG/IgM ELISA. IgG FLISA showed good concordance (Kappa=0.7088), 83,3% sensitivity and 94,2% specificity, while IgM FLISA also showed good concordance (Kappa=0,6026), lower 55,5% sensitivity and similar 98,4% specificity. New higher efficiency conjugated were prepared and tested in 120 serum samples of the pregnant woman in a same well conjunct IgG/IgM FLISAm. We also validate the FLISAm in 24 serum samples. Compared to isolated ELISA IgG/IgM, FLISAm demonstrated excellent concordance for IgG (Kappa=0.8837; sensitivity=100%; specificity=87,5%,) and IgM (Kappa=0,9187; sensitivity=100%; specificity=99,1%), with excellent reproducibility. The standardized FLISAm is quick, inexpensive, easily performed and high throughput and the assay can be used for screening serum conversion in pregnant women, useful in large numbers applications as antenatal care.

Descriptors: *Toxoplasma gondii*; Serological tests; Immunoassay; Fluorometry; Fluorescent dyes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo de vida do <i>T. gondii</i> . Diferentes etapas do ciclo biológico nas três principais formas do parasita nos hospedeiros intermediários e definitivos.....	29
Figura 2	Transmissão do <i>T. gondii</i> nos hospedeiros definitivos e intermediários.....	31
Figura 3	Fluxograma de desenvolvimento do ensaio imunofluorescente multiplex (FLISAm).....	44
Figura 4	Fluxograma das amostras de soros positivas e negativas para anticorpos IgG e IgM anti- <i>T. gondii</i> utilizadas nas etapas de padronização do FLISA isolado e comparação entre ELISA <i>in house</i> e FLISA isolado.....	46
Figura 5	Fluxograma das amostras de soros positivas e negativas para anticorpos IgG e IgM anti- <i>T. gondii</i> utilizadas nas etapas de padronização do FLISA m e comparação entre ELISA <i>in house</i> e FLISAm.....	47
Figura 6	Representação esquemática do controle de reatividade dos conjugados anti-IgG humano marcado com fluoresceína (verde) e anti-IgM humano marcado com rodamina (rosa) às imunoglobulinas IgG e IgM humanas adsorvidas em microplacas de 96 poços utilizadas nos imunoenaios fluorescentes multiplex (FLISAm).....	51
Figura 7	Purificação do conjugado anti-IgM humano marcado com rodamina (NHS- Rhodamine) em coluna Sephadex G-25-40...	54
Figura 8	Representação esquemática da ligação do <i>crosslinker</i> BS ³ com os sítios de aminas primárias das partículas magnéticas via ponte NHS-éster e reação com os grupos aminas de antígenos ou anticorpos específicos.....	56
Figura 9	Representação esquemática do acoplamento das microesferas magnéticas com IgG, lavagem com suporte magnético, ligação do conjugado fluorescente e eluição do conjugado com tiocianato de amônio.....	58
Figura 10	Purificação do conjugado anti-IgG humano marcado com fluoresceína (NHS-Fluoresceína) em coluna Sephadex G-25-40.....	59
Figura 11	Representação esquemática das etapas do procedimento de realização do ensaio imunoenzimático ELISA <i>in house</i> e do FLISAm.....	61

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Reatividade de amostras de soro positivas e negativas para anticorpos IgG anti- <i>T.gondii</i> no FLISA isolado. Padronização da preparação antigênica com 2µg/mL de extrato total sonificado do parasita e 20µL por poço de taquizoítos íntegros fixados. Concentração do conjugado 1:500 e antígeno sonificado (●); Concentração do conjugado 1:1000 e antígeno sonificado (○); Concentração do conjugado 1:500 e antígeno íntegro (■); Concentração de conjugado 1:1000 e antígeno íntegro (□).....	65
Gráfico 2	Padronização do bloqueio utilizado nos ensaios imunofluorescentes com variação da quantidade de extrato total sonificado de <i>T. gondii</i> . A: Concentração 1:500 do conjugado anti-IgG humano. B: Concentração 1:1000 do conjugado anti-IgG humano. C: Concentração 1:500 do conjugado anti-IgM humano. D: Concentração 1:1000 do conjugado anti-IgM humano. PBS-Tween (1); PBS+albumina (2); PBS-Tween+leite (3); PBS+gelatina (4).....	67
Gráfico 3	Padronização das concentrações de antígeno de <i>T. gondii</i> , amostras de soro positivas e negativas para anticorpos IgG anti- <i>T. gondii</i> e conjugado anti-IgG humano para os ensaios imunofluorescentes. A: Imunoensaio com 25µg/mL de antígeno de <i>T.gondii</i> . B: Imunoensaio com 10µg/mL de antígeno. C: Imunoensaio com 5µg/mL de antígeno. D: Imunoensaio com 2µg/mL de antígeno. Concentração de soro 1:50 e conjugado 1:500 (1); Concentração de soro 1:50 e conjugado 1:2500 (2); Concentração de soro 1:250 e conjugado 1:500 (3); Concentração de soro 1:250 e conjugado 1:2500 (4).....	69
Gráfico 4	Padronização das concentrações de antígeno de <i>T. gondii</i> , amostras de soro positivas e negativas para anticorpos IgM anti- <i>T. gondii</i> e conjugado anti-IgM humano para os ensaios imunofluorescentes. A: Imunoensaio com 25µg/mL de antígeno de <i>T.gondii</i> . B: Imunoensaio com 10µg/mL de antígeno. C: Imunoensaio com 5µg/mL de antígeno. D: Imunoensaio com 2µg/mL de antígeno. Concentração de soro 1:50 e conjugado 1:200 (1); Concentração de soro 1:50 e conjugado 1:1000 (2); Concentração de soro 1:250 e conjugado 1:200 (3); Concentração de soro 1:250 e conjugado 1:1000 (4).....	70
Gráfico 5	Reatividade quantitativa dos imunoensaios para anticorpos IgG anti- <i>T. gondii</i> em 140 amostras de soro de universitários. A: ELISA <i>in house</i> IgG e FLISA isolado IgG. As interrupções nos eixos mostram o limiar de positividade dos ensaios. B: Correlação entre as amostras de soro avaliadas pelo ELISA <i>in</i>	

	<i>house</i> IgG e pelo FLISA isolado IgG.....	72
Gráfico 6	Reatividade quantitativa dos imunoensaios para anticorpos IgM anti- <i>T. gondii</i> em 140 amostras de soro de universitários. A: ELISA <i>in house</i> IgM e FLISA isolado IgM. As interrupções nos eixos mostram o limiar de positividade dos ensaios. B: Correlação entre as amostras de soro avaliadas pelo ELISA <i>in house</i> IgG e pelo FLISA isolado IgG.....	73
Gráfico 7	Comparação da reatividade de amostras de soro negativas e positivas para anticorpos IgM anti- <i>T. gondii</i> avaliadas pelo ELISA <i>in house</i> e pelo FLISA isolado.....	76
Gráfico 8	Controle dos conjugados com diferentes concentrações de imunoglobulinas adsorvidas na microplaca em 5 imunoensaios diferentes. A: Reatividade do conjugado anti-IgG humano à IgG humana adsorvida na microplaca. B: Reatividade do conjugado anti-IgM humano à IgM humana adsorvida na microplaca.....	78
Gráfico 9	Cromatografia de exclusão molecular do conjugado anti-IgM humano marcado com NHS-Rhodamine em coluna Sephadex G-25-40;10-40µM, sob o fluxo de 1mL por minuto e frações de 1mL.....	79
Gráfico 10	Reatividade em unidades arbitrárias de fluorescência do conjugado anti-IgM humano marcado com NHS-Rhodamine em relação à diferentes concentrações de IgG humana adsorvida na microplaca.....	80
Gráfico 11	Cromatografada de exclusão molecular do conjugado anti-IgG humano marcado com FITC em coluna Sephadex G-25-40;10-40µM, sob o fluxo de 1mL por minuto e frações de 1mL.....	82
Gráfico 12	Reatividade em unidades arbitrárias de fluorescência do conjugado anti-IgG humano marcado com fluoresceína em relação à diferentes concentrações de IgG humana adsorvida na microplaca.....	83
Gráfico 13	Comparação da reatividade de amostras de soro ao conjugado comercial (soros positivos - pos1 e negativos - neg1) e com o conjugado purificado por partículas magnéticas e cromatografia de exclusão molecular (soros positivos - pos2 e negativos - neg2). A: Diluição dos conjugados 1/200. B: Diluição dos conjugados 1/400.....	84
Gráfico 14	Interferência da reatividade de amostras de soro positivas e negativas para anticorpos IgG e IgM anti- <i>T. gondii</i> em microplacas com as leituras dos conjugados fluoróforos: anti-IgG humano marcado com fluoresceína (NHS-fluoresceína) (verde) e anti-IgM humano marcado com rodamina (NHS-Rhodamine) (rosa) analisados separadamente (1) e no mesmo poço (2).....	86

Gráfico 15	Reatividade de amostras de soro positivas e negativas para anticorpos IgG e IgM anti- <i>T. gondii</i> em microplacas com as leituras dos conjugados fluoróforos: anti-IgG humano marcado com fluoresceína (NHS-fluoresceína) (verde) e anti-IgM humano marcado com rodamina (NHS-Rhodamine) (rosa). FLISA isolado (símbolo fechado); FLISAm (símbolo aberto). Amostras de soro IgG e IgM positivas (soro 1); Amostras de soro IgG positivas e IgM negativas (soro 2); Amostras de soro IgG e IgM negativas (soro 3).....	87
Gráfico 16	Interferência da reatividade de amostras de soro positivas e negativas para anticorpos IgG e IgM anti- <i>T. gondii</i> em microplacas com as leituras dos conjugados fluoróforos: anti-IgG humano marcado com fluoresceína (NHS-fluoresceína) (verde) e anti-IgM humano marcado com rodamina (NHS-Rhodamine) (rosa) analisados separadamente (1) e no mesmo poço (2).....	89
Gráfico 17	Reatividade de amostras de soro positivas e negativas para anticorpos IgG e IgM anti- <i>T. gondii</i> em microplacas com as leituras dos conjugados fluoróforos: anti-IgG humano marcado com fluoresceína (NHS-fluoresceína) (verde) e anti-IgM humano marcado com rodamina (NHS-Rhodamine) (rosa). FLISA isolado (símbolo fechado); FLISAm (símbolo aberto). Amostras de soro IgG e IgM positivas (soro 1); Amostras de soro IgG positivas e IgM negativas (soro 2); Amostras de soro IgG e IgM negativas (soro 3).....	90
Gráfico 18	Reatividade de amostras de soro positivas e negativas para anticorpos IgG (A , C e E) e IgM (B , D e F) anti- <i>T. gondii</i> no FLISAm. A e B : Concentração das amostras de soro na diluição 1:50. C e D : Concentração das amostras de soro na diluição 1:100. E e F : Concentração das amostras de soro na diluição 1:200.....	92
Gráfico 19	Reatividade quantitativa dos imunoensaios para anticorpos IgG anti- <i>T. gondii</i> em 120 amostras de soro de gestantes. A : ELISA <i>in house</i> IgG e FLISAm IgG. As interrupções nos eixos mostram o limiar de positividade dos ensaios. B : Correlação entre as amostras de soro avaliadas pelo ELISA <i>in house</i> IgG e pelo FLISAm IgG.....	94
Gráfico 20	Reatividade quantitativa dos imunoensaios para anticorpos IgM anti- <i>T. gondii</i> em 120 amostras de soro de gestantes. A : ELISA IgM e FLISAm IgM. As interrupções nos eixos mostram o limiar de positividade dos ensaios. B : Correlação entre as amostras de soro avaliadas pelo ELISA <i>in house</i> IgM e pelo FLISAm IgM.....	95
Gráfico 21	Comparação entre a média das leituras em unidades arbitrárias de fluorescência (UA) da reatividade de amostras	

de soro avaliadas pelo FLISAm em tempos diferentes (UA1 e UA2) para a análise de reprodutibilidade do teste. **A:** FLISAm para detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii*. **B:** FLISAm para detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii*..... 98

Gráfico 22 Comparação da reatividade de amostras de soro negativas e positivas avaliadas pelo ELISA comercial kit e pelo FLISA multiplex. **A:** Detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii*. **B:** Detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii*..... 100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Padronização FLISA isolado: preparação e concentração do antígeno de <i>T. gondii</i> , diluição das amostras de soro e dos conjugados anti-IgG humano e anti-IgM humano marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC).....	50
Tabela 2	Padronização FLISAm: comparação do conjugado comercial e purificado, ensaio de interferência comparando o FLISA isolado com o FLISA multiplex, concentração das amostras de soro no FLISA multiplex e ensaio de comparação entre ELISA <i>in house</i> e FLISA multiplex.....	62
Tabela 3	Valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo do FLISA isolado IgG comparado aos ensaios ELISA <i>in house</i> IgG em 140 amostras de soro de estudantes de Assis-SP.....	74
Tabela 4	Valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo do FLISA isolado IgM comparado aos ensaios ELISA <i>in house</i> IgM em 140 amostras de soro de estudantes de Assis-SP.....	75
Tabela 5	Valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo do FLISAm IgG/IgM comparado aos ensaios ELISA <i>in house</i> IgG e ELISA <i>in house</i> IgM em 120 amostras de soro de gestantes de Cascavel-PR....	96
Tabela 6	Valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo do FLISAm IgG/IgM comparado aos ensaios ELISA comercial IgG e ELISA comercial IgM em amostras de soro de pacientes com pedido de exame para toxoplasmose, do Hospital das Clínicas de São Paulo.....	102
Tabela 7	Valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo do multiplex FLISAm IgM e ELISA comercial IgM comparados ao IFI IgM em amostras de soro de pacientes com pedido de exame para toxoplasmose, no Hospital das Clínicas de São Paulo.....	103

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>)
APC	Alofococianina (<i>Allophycocyanin</i>)
BSA	Albumina Bovina Sérica (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
BS ³	(<i>Bis sulfosuccinimidyl suberate</i>)
BV	Violeta brilhante (<i>Brilliant Violet</i>)
CBA	Citometria da matriz do grânulo (<i>Cytometric Bead Array</i>)
CF	Fator de correlação
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação animal
Cy	Cianina (<i>Cyanine</i>)
DLC	Divisão de Laboratório Central
DMF	N,N-dimetilformamida
EF	Índice estatístico Exato de Fisher
ELFA	Ensaio imunoenzimático fluorescente (<i>Enzyme Linked Fluorescent Assay</i>)
ELISA	Ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme Linked Immunosorbente Assay</i>)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>)
FLISA	Ensaio imunofluorescente (<i>Fluorescence Linked Immunosorbent Assay</i>)
FLISAm	Ensaio imunofluorescente multiplex (<i>Multiplex FLuorescence Linked Immunosorbent Assay</i>)
F/P	Taxa média molar da quantidade de fluorocromo por molécula de proteína (<i>Fluorescein/Protein</i>)
GRA	Antígeno do Grânulo Denso do <i>Toxoplasma gondii</i>
HBV	Vírus da Hepatite B
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo
HIV	Vírus da imunodeficiência humana

IgG	Imunoglobulina de classe G
IgM	Imunoglobulina de classe M
IgA	Imunoglobulina de classe A
IgE	Imunoglobulina de classe E
IFI	Imunofluorescência Indireta (<i>Indirect Immunofluorescence</i>)
IMTSP	Instituto de Medicina Tropical de São Paulo
K	Kappa
LPLC	Cromatografia líquida de baixa pressão (<i>Low pressure Liquid Chromatography</i>)
MAP	Múltiplos peptídeos antigênicos (<i>Multiple Antigenic Peptides</i>)
MIC	Antígeno dos micronemas do <i>Toxoplasma gondii</i>
NHS-Fluorescein	N-hidroxisuccinimidil fluoresceína (<i>Fluorescein N-hydroxysuccinimidyl</i>)
NHS-Rhodamine	N-hidroxisuccinimidil rodamina (<i>Fluorescein N-hydroxysuccinimidyl</i>)
PBS	Tampão fosfato salina (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PBSTL	Tampão fosfato salina com detergente Tween20 e leite
OPD	O-fenilenodiamina (<i>Ortho-Phenylenediamine</i>)
PCR	Reação em cadeia da Polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PE	Ficoeritrina (<i>Phycoerythrin</i>)
PECy	Cianina ficoeritrina (<i>Phycoerythrin Cyanine</i>)
PerCP	(<i>Peridinin chlorophyll protein</i>)
Rhodamine B	Sulfonil cloridr de rodamina (<i>Sulfonyl Chloride Rhodamine</i>)
RON	Antígeno do colo da roptria do <i>Toxoplasma gondii</i>
ROP	Antígeno da roptria do <i>Toxoplasma gondii</i>
SAG	Antígeno de superfície do <i>Toxoplasma gondii</i>
SRS	Sequências relacionadas com antígenos de superfície do <i>T. gondii</i> (<i>Surface Related Sequence</i>)

TORCH	Toxoplasmose, rubéola, citomegalovírus e herpes
TRITC	Isotiocianato de tetrametil rodamina (<i>Tetrametyldhodamine Isotiocyanate</i>)
UA	Unidades Arbitrárias

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	22
2 OBJETIVOS.....	25
2.1 Geral.....	25
2.2 Específicos.....	25
 3 REVISÃO DA LITERATURA.....	 26
3.1 Toxoplasmose e <i>Toxoplasma gondii</i>	26
3.2 Ciclo de vida do <i>T. gondii</i>	28
3.3 Transmissão.....	30
3.4 Manifestações clínicas da toxoplasmose.....	32
3.4.1 <i>Toxoplasmose em imunocompetentes</i>	33
3.4.2 <i>Toxoplasmose em imunodeprimidos</i>	34
3.4.3 <i>Toxoplasmose congênita</i>	35
3.5 Diagnóstico Laboratorial da toxoplasmose.....	36
3.5.1 <i>Breve histórico do diagnóstico sorológico na toxoplasmose</i>	38
 4 MÉTODOS.....	 42
4.1 Animais e antígenos.....	42
4.1.1 <i>Animais experimentais</i>	42
4.1.2 <i>Parasitas</i>	43
4.1.3 <i>Obtenção de extrato total de T. gondii</i>	43
4.1.4 <i>Obtenção de taquizoítos íntegros de T. gondii</i>	43
4.2 Caracterização das amostras de soro utilizadas nos ensaios imunofluorescente de fase sólida.....	45
4.2.1 <i>Amostras de soro para padronização do ensaio imunofluorescente de fase sólida (FLISA isolado)</i>	45
4.2.2 <i>Amostras de soro para padronização do ensaio imunofluorescente multiplex (FLISAm)</i>	46
4.2.3 <i>Amostras de soro para validação do FLISAm</i>	47
4.3 Considerações éticas.....	48
4.4 Padronização do ensaio imunofluorescente de fase sólida e seu desempenho comparado ao ELISA <i>in house</i>	48
4.4.1 <i>Ensaio imunoenzimático (ELISA) IgG e IgM in house</i>	48
4.4.2 <i>Ensaio imunofluorescente (FLISA isolado) IgG e IgM</i>	49
4.5 Padronização do ensaio imunofluorescente multiplex (FLISAm), eficiência do FLISAm comparado ao ELISA <i>in house</i> e validação com ELISA comercial.....	50
4.5.1 <i>Controle da reatividade dos conjugados com imunoglobulinas adsorvidas na microplaca</i>	51
4.5.2 <i>Obtenção de IgG e IgM humana purificada</i>	52
4.5.2.1 <i>Obtenção de IgG humana: Precipitação de imunoglobulinas por</i>	

<i>sulfato de amônio saturado.....</i>	52
<i>4.5.2.2 Purificação de IgG.....</i>	52
<i>4.5.3 Produção de anti-IgM humano marcado com NHS-Rhodamine.....</i>	53
<i>4.5.3.1 Análise da eficiência de acoplamento: Determinação da taxa média molar de NHS-Rhodamine por anticorpo (F/P).....</i>	55
<i>4.5.4 Purificação do conjugado anti-IgG humano marcado com fluoresceína.....</i>	56
<i>4.5.4.1 Purificação do conjugado anti-IgG humano marcado com fluoresceína por afinidade a IgG humana acoplada em partículas magnéticas.....</i>	57
<i>4.5.4.2 Purificação do conjugado anti-IgG humano marcado com fluoresceína por cromatografia de exclusão molecular.....</i>	58
<i>4.5.5 Ensaio imunofluorescente multiplex (FLISAm) IgG e IgM.....</i>	60
<i>4.6 Análise estatística.....</i>	63
5 RESULTADOS.....	64
<i>5.1 Padronização do ensaio imunofluorescente de fase sólida (FLISA isolado) e seu desempenho comparado ao ELISA in house.....</i>	64
<i>5.1.1 Padronização da preparação do antígeno de <i>T. gondii</i>.....</i>	64
<i>5.1.2 Padronização do bloqueio das microplacas.....</i>	66
<i>5.1.3 Padronização da concentração de soro e conjugados FITC para o FLISA isolado.....</i>	68
<i>5.1.4 Comparação da reatividade de 140 amostras de soro de estudantes pelo ELISA in house e FLISA isolado.....</i>	71
<i>5.2 Padronização do ensaio imunofluorescente multiplex (FLISAm) para detecção de anticorpos IgG e IgM anti-<i>T. gondii</i>.....</i>	77
<i>5.2.1 Controle da reatividade dos conjugados anti-IgG humano fluoresceína e anti-IgM humano rodamina.....</i>	77
<i>5.2.2 Produção do conjugado anti-IgM humano marcado com rodamina (NHS-Rhodamine).....</i>	79
<i>5.2.3 Padronização da concentração do conjugado anti-IgM humano marcado com rodamina para o FLISAm.....</i>	80
<i>5.2.4 Purificação do conjugado anti-IgG humano marcado com fluoresceína (NHS-Fluoresceína).....</i>	81
<i>5.2.5 Padronização da concentração do conjugado anti-IgG humano marcado com fluoresceína para o FLISAm.....</i>	82
<i>5.2.6 Comparação da reatividade de amostras de soro positivas e negativas com o conjugado comercial e conjugado purificado.....</i>	83
<i>5.2.7 Análise da interferência na detecção conjunta dos conjugados fluorescentes: Comparação da reatividade de amostras de soro no FLISA isolado e FLISAm.....</i>	85
<i>5.2.7.1 Reação de imunofluorescência com uma única etapa de adição dos conjugados anti-IgM humano rodamina e anti-IgG humano fluoresceína.....</i>	85

5.2.7.2 Reação de imunofluorescência com duas etapas de adição dos conjugados: Primeira incubação com anti-IgM humano e segunda incubação com anti-IgG humano.....	88
5.2.8 Padronização da concentração de soro no FLISAm.....	91
5.3 Desempenho do FLISAm pela comparação com o ELISA <i>in house</i> , análise de reprodutibilidade do FLISAm e validação do FLISAm pelo ELISA comercial.....	93
5.3.1 Comparação da reatividade de 120 amostras de gestantes avaliadas pelo ELISA <i>in house</i> e FLISAm.....	93
5.3.2 Reprodutibilidade do FLISAm para detecção de IgG e IgM anti- <i>T. gondii</i>	97
5.3.3 Validação do FLISAm pelo ELISA comercial.....	99
6 DISCUSSÃO	104
7 CONCLUSÃO	118
7.1 Geral.....	118
7.2 Específicas.....	118
REFERÊNCIAS	119
APÊNDICES	140
ANEXOS	142

1 INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma doença amplamente distribuída, causada pelo parasita Apicomplexa *Toxoplasma gondii* (Dubey, 1991). Trata-se de uma infecção pouco diagnosticada por ser geralmente assintomática, no entanto representa grande importância no âmbito de saúde pública, devido à gravidade das manifestações clínicas nos casos oculares e congênitos (Cox, 2002).

As lesões oculares são provavelmente as manifestações clínicas mais comuns na toxoplasmose aguda adquirida no período pós-natal (Holland, 2009). Em imunodeficientes, como portadores do HIV, pode ocorrer inflamação bilateral ou multifocal grave, podendo levar ao comprometimento total da visão (Comodaro et al., 2009). Na toxoplasmose congênita, os casos mais graves da doença podem ser caracterizados clinicamente por hidrocefalia, retinocoroidite, calcificação cerebral, retardo mental, comprometimentos sensoriais e aborto (Montoya e Liesenfeld, 2004, Roizen et al., 2006). Assim, diante da gravidade dessas manifestações clínicas, sobretudo nos imunodeficientes e nos casos congênitos, é essencial a instituição de metodologias rápidas e eficientes para o tratamento precoce da infecção pelo *T. gondii*. Além disso, nos casos congênitos, a viragem sorológica é um marcador muito importante e demanda testes sequenciais por toda a gestação (Bortoletti et al., 2013).

O diagnóstico da toxoplasmose é principalmente sorológico, por ser um método de fácil execução, sensível e específico. Além da praticidade de obtenção de amostras obtidas de biorrepositórios permitindo ensaios temporais com facilidade, a abordagem sorológica apresenta possibilidade de automação para análise de um grande número de amostras com custo reduzido (Dzitko et al., 2006).

A sorologia está estabelecida por diferentes testes e antígenos, mas o uso de limiares baixos e a variação individual de pacientes levam a frequentes

incongruências nos resultados. Os testes sorológicos que utilizam extratos antigênicos brutos ou semipurificados do parasita são de grande importância no diagnóstico de rotina de doenças parasitárias, no entanto, apresentam deficiências, como reações falso-positivas (Robben et al., 2002). Várias alternativas têm sido utilizadas, como o uso de testes de alta sensibilidade e antígenos específicos identificados e purificados pelas técnicas de biotecnologia, como os antígenos recombinantes e peptídeos sintéticos de proteínas específicas do parasita e até mesmo combinações antigênicas, porém, com poucas soluções eficientes (Holec-Gasior e Kur, 2010, Kong et al., 2003, Yao et al., 2010).

Os antígenos recombinantes e peptídeos sintéticos de proteínas específicas do *T. gondii* podem aumentar a especificidade diagnóstica, principalmente com ausência de reação cruzada (Zhang et al., 2011). No entanto, resultados falsos negativos foram obtidos indicando que um antígeno recombinante ou um peptídeo sintético isolado não seria capaz de diagnosticar todos os indivíduos com toxoplasmose, devido ao número limitado de epítomos presentes em um único antígeno isoladamente (Carvalho et al., 2008, Sousa et al., 2008, Sousa et al., 2009). Metodologias com o uso de combinações antigênicas sintéticas de epítomos de diferentes proteínas do parasita, como misturas de diferentes peptídeos sintéticos ou multi-epitópicos associados a antígenos recombinantes e adicionados em um único teste podem aumentar a sensibilidade e especificidade dos imunoensaios (Araújo e Ferreira, 2010). Entretanto, uma mesma mistura antigênica pode apresentar desempenho diferente quando desafiada com amostras de diferentes regiões geográficas, dada a heterogeneidade genética do *T. gondii* e das populações humanas (Velmurugan et al., 2008).

Atualmente, novas abordagens fluorimétricas foram descritas, utilizando fluoróforos de alto desempenho, sem reações enzimáticas, em suportes de rendimento convencional como a superfície de microplacas, para alguns patógenos

(Liu et al., 2003, Linares et al., 2013). A imunofluorimetria de fase sólida permite o uso de conjugados com diferentes intensidades de fluorescência, possibilitando a detecção simultânea de vários tipos de anticorpos específicos a partir de amostra única de soro, diminuindo o tempo de reação e aumentando a eficiência das análises (Sittampalam et al., 1997). Diante disso, neste projeto, desenvolvemos um diagnóstico sorológico imunofluorescente multiplex de fase sólida para a detecção conjunta de anticorpos IgG e IgM contra *T.gondii*.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Desenvolver métodos sorológicos fluorescentes para a detecção de classes específicas de anticorpos (IgG e IgM) contra *Toxoplasma gondii* em sistemas multiplex de imunofluorescência de fase sólida.

2.2 Específicos

- ✓ Padronizar um ensaio imunofluorescente em microplacas (FLISA isolado) para detecção de IgG ou IgM anti-*T. gondii*, no que se refere ao tipo e preparação de antígeno de *T. gondii*, bloqueio das microplacas, concentração ótima de soro e conjugados;
- ✓ Construir conjugados de alta eficiência e diferentes fluorescências para permitir a detecção conjunta de IgG e IgM anti-*T. gondii* em ensaios imunofluorescentes de fase sólida;
- ✓ Analisar a eficiência do ensaio imunofluorescente em fase sólida (FLISA isolado) pela comparação com o ensaio imunoenzimático (ELISA *in house*);
- ✓ Padronizar as condições de um ensaio multiplex de imunofluorescência de fase sólida para a detecção de IgG e IgM anti *T.gondii* no mesmo poço e analisar sua eficiência e reprodutibilidade;
- ✓ Validar e avaliar a eficiência do ensaio imunofluorescente multiplex em fase sólida (FLISAm) em amostras com sorologia definida por ensaios comerciais executadas por laboratório de referência.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Toxoplasmose e *Toxoplasma gondii*

A toxoplasmose, uma das infecções parasitárias mais comuns, é amplamente distribuída não apenas em humanos, como também nas demais espécies de animais homeotermos (Dubey, 1991). Estima-se que mais de um terço da população humana mundial tenha sido exposta ao *T. gondii* em algum estágio da vida (Tenter et al., 2000). Estudos soroepidemiológicos em diferentes países demonstram uma variação estimada entre 10% a 80% de prevalência dessa infecção na população humana (Doudou et al., 2014, Gao et al., 2012, Kistiah et al., 2012). Essa variação pode ocorrer devido a alguns fatores associados aos hábitos culturais e alimentares, às condições socioeconômicas, à região geográfica e até mesmo à idade da população acometida pelo *T. gondii* (Amorim et al., 2004, Frenkel, 1991, Kijlstra e Jongert, 2008).

Estudos relatam que nos EUA a grande parte da infecção pelo *T. gondii* nos seres humanos ocorre pelo consumo de carne e mariscos crus (Jones et al., 2009). Assim como na França, o hábito de ingerir produtos cárneos crus também interfere na prevalência da infecção em humanos (Hill et al., 2005). A faixa etária também pode influenciar na soropositividade pelo *T. gondii*, que aumenta com o decorrer da idade, devido à exposição aos fatores de risco durante a vida. No entanto, estudos demonstram que elevados níveis de contaminação ambiental com oocistos do parasita, e baixas condições socioeconômicas podem aumentar a prevalência em crianças (Dattoli et al., 2011, Rajaii et al., 2013). O clima e a altitude da região também podem influenciar nos índices de prevalência dos países. Em países tropicais e localizados em altitudes mais elevadas, a prevalência da toxoplasmose é

maior quando comparada com regiões áridas, frias e localizadas sob o nível do mar (Elmore et al., 2012).

No Brasil, a prevalência da toxoplasmose em humanos pode chegar a 95% em populações indígenas da região Amazônica e a 97,4% em moradores de uma fazenda no sudeste do Mato Grosso (Bóia et al., 2008, Santos et al., 2009). Porém, a infecção pelo *T. gondii* pode acometer um número menor de indivíduos, como mostra um estudo em jovens universitários de São Paulo, em que cerca de 20% apresentaram soropositividade para toxoplasmose (Sampaio et al., 2013). Essa variação ocorre, principalmente, devido às diferenças nos hábitos culturais e alimentares encontrados em diferentes regiões do país (Dubey et al., 2012).

O agente etiológico da toxoplasmose é o *Toxoplasma gondii*, parasita intracelular obrigatório, descrito pela primeira vez, por Nicolle (1908) e Manceaux (1909), na Tunísia, em células do baço e do fígado de um roedor, o *Ctenodactylus gundi*, e por Splendore (1908) no Brasil, em isolados de coelhos. *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, entre outras estruturas, como a superfície do agente, para o mecanismo de adesão, invasão e desenvolvimento na célula hospedeira (Black e Boothroyd, 2000). Estes parasitas intracelulares obrigatórios, além de apresentarem diversas estruturas comuns às demais células animais, como mitocôndria, retículo endoplasmático e complexo de Golgi, também apresentam estruturas características do filo, como anéis polares, micronemas, rôptrias e grânulos densos (Souza et al., 2010a).

Os micronemas são estruturas onde estão localizadas proteínas (MICs) envolvidas no processo de adesão do *T. gondii*, secretadas no início de interação com a célula hospedeira (Lovett et al., 2002). As rôptrias são organelas que contêm dois tipos de proteínas caracterizadas, sobretudo, por sua localização: as ROPs,

encontradas na porção basal, e as RONS, presentes no colo da organela e secretadas logo após as proteínas dos micronemas (Boothroyd e Dubremetz, 2008, Carruthers et al., 1999). Por sua vez, o conteúdo dos grânulos densos, as proteínas GRAs, são secretadas após o término do processo de entrada do parasita, durante a fase intracelular de seu ciclo de vida (Souza et al., 2010a).

3.2 Ciclo de vida do *T. gondii*

O ciclo de vida do *T. gondii* é complexo e heteroxênico, constituído por várias etapas, com fases proliferativas e latentes do parasita e caracterizado por uma fase assexuada, ou extra intestinal e uma fase sexuada ou enteroepitelial (Figura 1). A fase assexuada ocorre nos mamíferos, incluindo o homem, ou aves, que são os hospedeiros intermediários e a fase sexuada ocorre nos felídeos, hospedeiros definitivos (Dubey, 1991).

Na fase assexuada, o parasita, na 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, disseminando a infecção e caracterizando a fase aguda da doença. Alguns taquizoítos invadem as células, mas desenvolvem, após proliferações iniciais, uma cápsula cística com dupla membrana elástica resistente rica em 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 hospedeiro (Sullivan et al., 2011). Essa imunidade limita a progressão da infecção e o desenvolvimento de novas lesões, porém não erradica os cistos já existentes encontrados em vários tecidos, como muscular e nervoso. Indivíduos com comprometimento do sistema imune (portadores do HIV,

transplantados) podem apresentar uma reativação da infecção, ocasionada pelo rompimento dos cistos e liberação dos bradizoítos, que se diferenciam novamente em taquizoítos e podem promover uma infecção local ou disseminada (Derouin, 2007).

Figura 1 - Ciclo de vida do *T. gondii* (Modificado a partir de Robert-Gangneux e Dardé, 2012).

Na fase sexuada, os taquizoítos se diferenciam em gametócitos masculinos e femininos no interior dos enterócitos, onde ocorre a fecundação e formação do zigoto. Este evoluirá dentro do epitélio formando uma parede externa dupla, dando origem ao oocisto. A célula epitelial sofrerá rompimento, liberando o oocisto ainda imaturo, não esporulado, que alcançará o meio externo junto com as fezes dos

felídeos. A esporulação dos oocistos ocorre após aproximadamente cinco dias em contato com o solo e o oxigênio do ambiente, em condições de temperatura e umidade adequadas (Hill e Dubey, 2002, Jones e Dubey, 2010). Esta fase leva ao desenvolvimento de oocistos esporulados contendo dois esporocistos elipsoidais com quatro esporozoítos cada, os quais se tornam infectantes aos seus hospedeiros intermediários (Dubey et al., 1998). Ao serem ingeridos pelos hospedeiros definitivos, os bradizoítos ou os esporozoítos, liberados da digestão do cisto ou do oocisto respectivamente e após a diferenciação em taquizoítos, podem iniciar outra fase assexuada de multiplicação por endodiogenia nas células epiteliais do intestino delgado dos felídeos, assegurando a difusão e manutenção da parasitose nesses hospedeiros (Dubey, 2008).

3.3 Transmissão

Os mecanismos de transmissão da toxoplasmose ocorrem por meio do consumo de carnes cruas ou mal-cozidas contendo cistos teciduais do parasita, pela ingestão de vegetais frescos e água com oocistos esporulados, pelo contato direto com as fezes de felídeos jovens recentemente infectados, pela transmissão vertical de taquizoítos para o feto, via placenta, e por meio de transplantes de órgãos e injeção acidental em laboratório (Dubey, 1998) (Figura 2).

Historicamente, o consumo de cistos teciduais em carnes cruas ou mal-cozidas era considerado a maior rota de transmissão em humanos. Entretanto, observa-se um declínio na prevalência de *T. gondii* em muitos países desenvolvidos nas últimas décadas, que é atribuído à introdução de sistemas modernos de agricultura em relação ao manejo de criação, o que reduziu a probabilidade de cistos do parasita na carne, diminuindo a disseminação do *T. gondii* por esta via (Diza et al., 2005; Jones et al., 2007, Jones e Dubey, 2012). Mesmo assim,

trabalhos recentes relatam associação de soroprevalências com o fator de risco de infecção pelo *T. gondii* decorrente ao consumo de carne crua ou mal-cozida, como a avaliação epidemiológica em gestantes de Taiwan (Lin et al., 2008), Londres (Flatt et al., 2013) e Turquia (Doğan et al., 2012).

Figura 2 - Transmissão do *T. gondii* nos hospedeiros definitivos e intermediários (Modificado a partir de Robert-Gangneux e Dardé, 2012).

Já em relação ao risco de adquirir a toxoplasmose pelo contato com os oocistos, a água potável contaminada é uma das maiores rotas de transmissão por

esta via e desempenha um importante papel na infecção pelo *T. gondii* (Dubey, 2004). Um dos primeiros surtos relatados pela transmissão de oocistos na água ocorreu em Victoria, no Canadá, que demonstrou a potencial contaminação do abastecimento de água da cidade pelas fezes do gato doméstico e do puma, rastreados na região da bacia hidrográfica do município (Aramini et al., 1999).

Outros estudos relataram algumas variáveis correlacionadas à alta soroprevalência de toxoplasmose, como o consumo de água não filtrada, em Campos dos Goytacases-RJ, (Bahia-Oliveira et al., 2003) e o consumo de sorvete caseiro, em Cascavel-CE (Heukelbach et al., 2007). Além disso, a água contendo oocistos pode ser utilizada para irrigação agrícola ou em conjunto com pesticidas e herbicidas, contaminando vegetais crus e hortaliças, alimentos associados também como potenciais fontes de disseminação do *T. gondii* (Kniel et al, 2002). Estudos recentes demonstram a correlação entre o fator de risco associado ao consumo de vegetais frescos em restaurantes com a soroprevalência de toxoplasmose (Ekman et al., 2012, Jafari et al., 2012).

3.4 Manifestações clínicas da toxoplasmose

A infecção pelo *T.gondii* apresenta um amplo espectro de doenças que pode variar de uma infecção crônica e assintomática, podendo manifestar-se como doença sistêmica grave, levando até mesmo a óbito. Os sinais e sintomas variam de acordo com a condição imunológica do indivíduo e de seu quadro clínico: imunocompetente, imunodeprimido e toxoplasmose congênita (Montoya e Liesenfeld, 2004).

3.4.1 Toxoplasmose em imunocompetentes

A infecção pelo *T. gondii*, em imunocompetentes, é frequentemente benigna, com parasitemia auto-limitada, resultando em uma forma clínica da doença assintomática na maioria dos casos. Estudos sorológicos indicam que 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 principalmente cervicais, acompanhadas de linfadenopatia febril, astenia e linfomonocitose (Remington e McLeod, 2001). Assim, a infecção pelo *T. gondii* muitas vezes não é diagnosticada e tratada por terapêutica específica.

Apesar de, no geral, a toxoplasmose ser assintomática em indivíduos imunocompetentes, alguns casos de infecção a partir de genótipos atípicos de *T. gondii* podem desenvolver manifestações clínicas como pneumonite, miocardite, encefalite e lesões oculares graves (Dubey et al., 2012). Além disso, estudos relatam a possibilidade da infecção crônica causar diminuição no desenvolvimento psicomotor (Havlíček et al., 2001), distúrbios e efeitos compartimentais (Flegr et al., 1996) e doença mental (Bachmann et al., 2005). Estudos recentes demonstraram a associação entre a infecção crônica pelo *T. gondii* e casos de transtorno bipolar e esquizofrenia (Emelia et al., 2012, Hamdani et al., 2013, Torrey et al., 2012).

Dentre as manifestações nos indivíduos sintomáticos, 2% a 3% desenvolvem um quadro de retinocoroidite. O acometimento pode ser bilateral, ocorrendo alterações oculares com graus variáveis de degeneração, como edema de retina, lesões vasculares na coróide, microftalmia e estrabismo (Comodaro et al., 2009). Dados recentes relatam apresentações atípicas e graves de retinocoroidite em indivíduos imunocompetentes, como um estudo que demonstra

associação com esclerite (Kamath et al., 2013) e um caso clínico, que mostra o desenvolvimento de papilite toxoplásmica primária, caracterizada por focos de inflamação na papila óptica (Mikhail e Varikkara, 2013).

3.4.2 Toxoplasmose em imunodeficientes

A toxoplasmose é uma importante zoonose oportunista, frequente em pacientes com queda na atividade do sistema imunológico, como os portadores de HIV, apresentando a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) ou indivíduos portadores de neoplasias, pacientes submetidos à terapia imunossupressora e transplantados. Nesses indivíduos, pode ocorrer reativação de cistos latentes e reagudização da doença (Dubey et al., 2012).

As manifestações clínicas da toxoplasmose em transplantados ocorrem após os primeiros três meses do transplante e envolvem miocardite febril, encefalite e pneumonite (Derouin e Pelloux, 2008). Já em pacientes com HIV, os sintomas mais frequentes são as lesões cerebrais (Correia et al., 2010, Porter e Sandre, 1992). Antes da terapia anti-retroviral, uma em cada três pessoas infectadas pelo HIV desenvolviam toxoplasmose encefálica (Parmley et al., 1992). No entanto, devido a aplicação de profilaxias terapêuticas específicas, houve uma diminuição da toxoplasmose cerebral entre pacientes com AIDS (Menotti et al., 2003, Passos et al., 2000). Estudos recentes relatam 34,7% de pacientes HIV soropositivos com toxoplasmose cerebral na Rússia (Ermak et al., 2013), 36,6% no Brasil (Meira et al., 2011) e 11,7% na Tunísia (Sellami et al., 2010).

Em algumas regiões, as lesões oculares são comuns em indivíduos imunodeprimidos, presente em até 20% dos acometidos pela toxoplasmose (Garcia et al., 1999; Petersen et al., 2001; Vallochi et al., 2002). Alguns autores relataram uma prevalência elevada de toxoplasmose ocular em pacientes com AIDS no

Nepal, de cerca de 60% (Lamichhane et al., 2010). Apesar disso, dados recentes mostram uma diminuição da frequência de toxoplasmose ocular em indivíduos com HIV, como em um estudo na Nigéria, em que 11,4% desenvolveram retinocoroidite (Onakoya et al., 2012) e outro trabalho no Sul do Brasil, em que apenas 1,6% dos indivíduos com AIDS apresentaram alguma forma de lesão ocular (Xavier et al., 2013).

3.4.3 Toxoplasmose congênita

A toxoplasmose congênita ocorre devido à transmissão do *T. gondii* ao feto, via placenta, geralmente quando a mãe adquire a infecção primária durante a gestação (Remington et al., 2001). Clinicamente, nos casos mais graves, a infecção pode ser caracterizada pela tríade clássica, conhecida como Tríade de Sabin: hidrocefalia, retinocoroidite e calcificações cerebrais. Além disso, também pode ocorrer retardo mental, comprometimento sensorial e até mesmo aborto (Ajzenberg et al., 2002, Roizen et al., 2006, Wallon et al., 2004). Essa variação de manifestações clínicas depende da patogenicidade da cepa infectante, da capacidade da resposta imune do hospedeiro e do período gestacional em que ocorreu a infecção (Dubey et al., 2012). A transmissão vertical da toxoplasmose é superior durante o terceiro trimestre, contudo, a gravidade da doença no recém-nascido é menor no final da gestação (Remington et al., 2001).

Estudos anteriores demonstraram a variedade das manifestações clínicas na toxoplasmose congênita. Ambroise-Thomas e colaboradores (2001) avaliaram o seguimento clínico de crianças que foram acometidas pelo *T. gondii* no período gestacional, durante o primeiro ano de vida, e constataram que 19% tiveram diagnóstico de retinocoroidite, 16% apresentaram calcificações cerebrais, 8% apresentaram microcefalia e, em 5% dos casos, ocorreu o desenvolvimento de

convulsões e retardo neuropsicomotor. Em outro estudo, desenvolvido por Sáfadi e colaboradores (2003), com seguimento clínico-laboratorial durante cinco anos, de crianças encaminhadas com diagnóstico de toxoplasmose congênita, a incidência de retinocoroidite foi de 95% e as calcificações cerebrais ocorreram em 54% das que apresentaram alguma manifestação neurológica. Dados recentes mostram que a retinocoroidite é uma manifestação clínica ainda bastante diagnosticada na toxoplasmose congênita. Estudos em Minas Gerais e no Rio Grande do Sul relataram a ocorrência de cerca de 70% dessa lesão ocular nas crianças avaliadas (Melamed et al., 2010, Vasconcelos-Santos et al., 2009).

No Brasil, os diversos inquéritos soroepidemiológicos realizados em gestantes mostram uma ampla variedade de prevalências (Bichara et al., 2012, Carellos et al., 2008, Varella et al., 2009). Essa variação ocorre, principalmente, devido às diferenças nos hábitos e condições socioeconômicas das populações em regiões distintas do país (Montoya e Linsefeld, 2004). Assim, medidas de atenção à saúde e o diagnóstico precoce e eficiente da toxoplasmose em gestantes são essenciais para identificação e prevenção da gravidade dessa infecção nos recém-nascidos.

3.5 Diagnóstico laboratorial da toxoplasmose

O diagnóstico da toxoplasmose pode ser realizado através do isolamento do parasita, por técnicas moleculares e pela sorologia. Os métodos parasitológicos, por serem altamente invasivos, devem ser empregados em especial quando os diagnósticos sorológicos não apontam dados conclusivos. O isolamento do parasita é realizado através da inoculação intraperitoneal do material suspeito, como líquido amniótico, sangue, fluidos corporais, placenta, ou cultivo celular em animais de laboratório ou ainda em cultivo celular *in vitro* (Dubey et al., 1998). Técnicas

moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*, PCR) e suas variações, como a qPCR (*quantitative real time PCR*), são métodos altamente sensíveis e específicos, que tem melhorado a detecção de doença aguda em hospedeiros imunocomprometidos, além de serem considerados, nos últimos anos, métodos de referência (*gold standard*) para o diagnóstico pré-natal da toxoplasmose congênita (Petersen, 2007).

3.5.1 Breve histórico do diagnóstico sorológico na toxoplasmose

A avaliação soroepidemiológica da toxoplasmose na população humana e em várias espécies de animais foi possível pelo desenvolvimento do teste do corante (*Dye test*) azul de metileno por Sabin e Feldman em 1948, e por um longo tempo essa técnica foi considerada como teste de referência (Montoya e Liesenfeld, 2004). No entanto, o uso de parasitas vivos e o possível risco de infecção do manipulador levaram ao desenvolvimento de técnicas mais seguras. Assim, para suprir o manuseio e aplicabilidade deste teste surgiram outros métodos sorológicos, os aglutinantes, fluorimétricos e imunoenzimáticos.

Em 1957, Jacobs e Lunde desenvolveram um método utilizando hemácias de carneiro sensibilizadas com antígenos parasitários, denominada de hemaglutinação indireta. Este tipo de teste apresentava baixa sensibilidade e não possibilitava a detecção de anticorpos IgG e IgM, podendo levar a resultados falso-positivos por ação de anticorpos heterófilos. Posteriormente, esse teste foi otimizado, resultando em um diagnóstico mais sensível, de fácil execução e baixo custo, utilizado na triagem soroepidemiológica (Chang et al., 1985). Essa técnica é realizada em alguns países para diagnóstico de animais de criação, como ovelhas e baseia-se na formação de agregados visíveis, como resultado da interação entre anticorpos específicos (IgG e IgM) e a membrana dos eritrócitos sensibilizada com

antígenos íntegros de *T. gondii* (Swai e Kaaya, 2012). Outras reações com o mesmo princípio foram introduzidas, através do emprego de parasitas tratados com formaldeído, cetona e partículas de látex (Bozdech e Jira, 1961). Outro método baseado na aglutinação, como a técnica de aglutinação direta modificada (MAT), proposta por Desmonts e Remington em 1980, tem sido utilizada em muitas espécies de animais para evidenciar aglutininas anti-*T. gondii*, através da interação de anticorpos do soro e taquizoítos inativados. Os métodos sorológicos aglutinantes são sensíveis e úteis em estudos de campo pela facilidade de execução, porém são métodos pouco específicos (Lappin e Powell, 1991).

Com o avanço tecnológico e produção de conjugados específicos a partir de anticorpos purificados foi possível o desenvolvimento de diagnósticos mais eficientes, como a imunofluorescência indireta (IFI), desenvolvida por Kellen e colaboradores em 1962 e utilizada para triagens soropidemiológicas da toxoplasmose. Esse método baseia-se na capacidade de ligação de anticorpos e fluorocromos. É uma técnica sensível, que utiliza parasitas íntegros e formolizados como antígeno. 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 (Moirachi et al., 1976). A IFI, atualmente, é utilizada em conjunto com outros métodos para diagnóstico de IgG e IgM anti-*T. gondii*, porém é limitada pela análise subjetiva do observador (Sakata e Bellato, 2012, Sobral et al., 2005).

A utilização do método de imunofluorescência para detecção de IgG e IgM contra *T. gondii*, em conjunto com outros métodos permitiu a descrição, por Camargo e Leser (1976), de perfis sorológicos da toxoplasmose humana. O perfil I ou de infecção recente, caracterizado pela presença de IgM e IgG, o perfil II ou de transição, caracterizado por elevados níveis de IgG e redução gradativa de IgM, e o

perfil III, característico de infecção crônica ou latente, em que estão presentes apenas anticorpos IgG anti-*T. gondii*. A identificação desses marcadores foi essencial para a determinação de casos agudos, principalmente no diagnóstico sorológico de gestantes (Gross et al., 2004).

A partir da evolução no controle de qualidade e impurezas de antígenos, foi possível o desenvolvimento de métodos, como o ensaio imunoenzimático de fase sólida (ELISA), em que o grau de pureza do antígeno e do anticorpo é essencial para evitar reações cruzadas e resultados falso-positivos (Camargo et al., 1978, Szénási et al., 1997). O ensaio de ELISA é o mais utilizado nos laboratórios de análise clínica por ser sensível, específico e pelo custo benefício garantido pela automação e padronização. Com o desenvolvimento dos testes imunoenzimáticos de fase sólida, foi possível aplicar na rotina diagnóstica a identificação da avididade de anticorpos IgG pelo uso de agentes caotrópicos (Camargo et al., 1991). Essa técnica é um dos testes utilizados para a confirmação de fase aguda da toxoplasmose e baseia-se na força de interação entre o antígeno e o anticorpo (Steward e Lew, 1985). Anticorpos de baixa avididade são produzidos em um estágio precoce da infecção aguda, enquanto que anticorpos de alta avididade ou anticorpos caotrópicos resistentes são característicos da resposta de memória imunológica e infecção crônica adquirida a mais de três meses (Remington et al., 2004).

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 combinações antigênicas (MAPs- *Multiple Antigenic Peptides*) (Araújo e Ferreira, 2010, Elyasi et al., 2010). Vários kits comerciais atualmente existentes no mercado utilizam a SAG1, proteína abundante na superfície dos taquizoítos de *T. gondii* (Remington et al., 2004). Entretanto, a

combinação e composição exata desses peptídeos para a utilização em imunoenaios é uma questão que ainda deve ser aprimorada (Velmurugan et al., 2008).

Atualmente, novos diagnósticos sorológicos vem sendo desenvolvidos, com uso de conjugados fluorescentes para quantificação direta e linear de anticorpos específicos, citocinas e alguns patógenos (Linares et al., 2013, Liu et al., 2003, Matsukuma et al., 2006). O imunoensoi fluorescente de fase sólida (FLISA) é um método de fácil execução, pois as etapas do procedimento de realização, como sensibilização de antígeno, bloqueio das microplacas, adição de soro e lavagens são simples e semelhantes ao ELISA convencional. Além da praticidade de execução desse método, a utilização de conjugados fluorescentes permite a realização do imunoensoi de fase sólida com menos etapas no procedimento, pois não necessita da utilização de substratos cromógenos, essenciais nas reações enzimáticas (Le et al., 2013). Além disso, o uso dos fluorocromos possibilita a identificação simultânea de anticorpos ou antígenos específicos em uma única reação, resultando na economia de tempo e reagentes. Os fluorocromos possuem características únicas, como espectros de absorção e emissão de fótons, detectados em diferentes comprimentos de onda, o que permite a mistura de fluorescências distintas na reação (Sittampalam et al., 1997).

Corantes orgânicos sintéticos, como a fluoresceína e a rodamina, foram os primeiros compostos fluorescentes utilizados em pesquisa biológica (Hemmilä, 1985). 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 (FITC), o N-hidroxisuccinimidil fluoresceína (NHS-Fuorescein), o isotiocianato de tetrametil rodamina (TRITC), N-hidroxisuccinimidil éster rodamina (NHS-Rhodamine), e sulfonil cloridr rodamina (Rhodamine B) (Wisdom, 2005). Além disso, outros fluorocromos estão disponíveis

comercialmente para o uso em imunoenaios, como as indocarbocianinas (Cy2, Cy3 e Cy5), alofococianina (APC) e ficoeritrina (PE) (Fu et al., 2012, Groot-Mijnes et al., 2004, Iijima et al., 2011). E ainda, atualmente, novos compostos fluorescentes sintéticos mais sensíveis tem sido produzidos, como o violeta brilhante (BV421). Assim, a partir da variedade desses compostos fluorescentes e possibilidade de acoplamento com proteínas, a abordagem fluorimétrica tem sido útil para o desenvolvimento de métodos com análise múltipla de alto rendimento tanto em ensaios de fase sólida como arranjos líquidos na citofluorimetria (Chattopadhyay et al., 2012).

Além da facilidade de conjugação dos fluorocromos, outra vantagem da fluorimetria é a escala de detecção em décadas maior do que a detecção colorimétrica (Turner, 1985). Técnicas fluorimétricas alcançam melhores limites de detecção em comparação com as que utilizam medidas de absorbância, permitindo assim, quantificar componentes em baixas concentrações que não seriam detectados em uma reação imunoenzimática ou ainda, possibilitar a análise de menores quantidades de amostras (Turner, 1985). Com isso, os ensaios imunofluorescentes de fase sólida (FLISA) são métodos promissores para aumentar a eficiência das análises e possibilitar a detecção mais rápida e econômica da toxoplasmose, essencial para o diagnóstico de grupos de risco, como gestantes e imunodeprimidos.

4 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 18,2MΩcm e condutividade de 0,056μS/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, 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 “Principles of Laboratory Animal Care” (*NHI Publication n° 86-23, revised in 1996*) e em “Princípios de Ética na Experimentação Animal” do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.1.2 Parasitas

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 sacrificados em câmara de CO₂, e o peritônio do animal foi lavado com 5mL de solução salina.

4.1.3 Obtenção de extrato total sonificado de *T. gondii*

Antígenos totais de *T. gondii* foram obtidos a partir de exsudatos peritoneais de camundongos infectados com taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH. 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 isotonzar a suspensão, que foi submetida a centrifugação a 10.000g 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 Bradford (Bradford, 1976) com padrão de γ -globulina humana.

4.1.4 Obtenção de taquizoítos íntegros formolizados de *T. gondii*

Outro tipo de antígeno empregado no ensaio de padronização da preparação antigênica foram taquizoítos de *T. gondii* íntegros formolizados. Os parasitas foram obtidos do exsudato peritoneal de camundongos previamente infectados com taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH. Após centrifugação a 10.000g por 10 minutos, o sedimento foi lavado por duas vezes em PBS com tampão fosfato a 0,01M, pH 7,2 por 10 minutos e, em seguida, tratado com PBS adicionado de formol a 10% durante 24 horas à temperatura ambiente. Após centrifugação a 10.000g por 10 minutos, o sedimento foi lavado com PBS e ressuspensionado em água destilada para uma concentração final de 20 a 30 parasitas por campo em microscópio óptico (aumento de 40x). Essa solução com os parasitas formolizados

foi utilizada como antígeno íntegro em uma das etapas de padronização dos ensaios imunofluorescente de fase sólida.

Figura 3 - Fluxograma de desenvolvimento do imunoensaio fluorescente multiplex (FLISAm)

4.2 Caracterização das amostras de soro utilizadas nos ensaios imunofluorescentes de fase sólida

4.2.1 Amostras de soro para padronização do ensaio imunofluorescente de fase sólida (FLISA isolado)

Para o FLISA isolado, foram utilizadas um total de 140 amostras de soro de estudantes universitários, com idade entre 17 e 28 anos, 87 amostras do sexo feminino e 53 amostras do sexo masculino, coletadas de fevereiro a julho de 2008, em Assis-SP, município da região sudoeste do estado de São Paulo. Essas amostras foram armazenadas em biorrepositório no Laboratório de Protozoologia do IMTSP, utilizadas com consentimento informado para uso em pesquisas sorológicas da toxoplasmose humana. Todas as amostras de soro foram previamente analisadas pelo ensaio imunoenzimático (ELISA *in house*) para detecção de anticorpos IgG e IgM anti- *T. gondii* e mantidas a -20°C até a execução dos ensaios. A Figura 4 mostra a quantidade de amostras de soro utilizadas nas etapas de padronização da preparação de antígeno e concentração de soro e conjugado para o desenvolvimento do ensaio imunofluorescente de fase sólida.

Amostras de soro utilizadas na padronização FLISA isolado

Amostras de soro utilizadas na comparação entre os ensaios ELISA *in house* e FLISA isolado.

Figura 4 - Fluxograma das amostras de soros positivas e negativas para anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii* utilizadas nas etapas de padronização e análise de eficiência do FLISA isolado.

4.2.2 Amostras de soro para padronização do ensaio imunofluorescente multiplex (FLISAm)

Para o FLISAm foram utilizadas um total de 120 amostras de soro de gestantes, com idade gestacional desconhecida e faixa etária entre 14 e 43 anos, atendidas no Laboratório Municipal de Cascavel, município da região oeste do Paraná, provenientes do Sistema Único de Saúde (SUS), coletadas no período de dezembro de 2005 a fevereiro de 2006. Essas amostras de soro foram armazenadas em um biorrepositório no Laboratório de Protozoologia do IMTSP, e utilizadas com consentimento informado para uso em pesquisas para diagnóstico da toxoplasmose humana. As 120 amostras de soro foram previamente analisadas pelo método imunoenzimático (ELISA *in house*) para detecção de anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii* e mantidas a -20°C até a execução dos ensaios. A Figura 5 mostra a quantidade de amostras de soro utilizadas em cada etapa de padronização do FLISAm.

Figura 5 - Fluxograma das amostras de soros positivas e negativas para anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii* utilizadas nas etapas de padronização e análise de eficiência do FLISAm.

4.2.3 Amostras de soro para validação do FLISAm

Para a validação do ensaio fluorescente multiplex FLISAm, foram utilizadas 24 amostras de soros de pacientes do Hospital das Clínicas de São Paulo, com pedido de exame sorológico de rotina para toxoplasmose, com idade entre 17 e 64 anos, coletadas em Setembro de 2013, 21 amostras do sexo feminino e 3 amostras do sexo masculino, avaliadas pelo método comercial Elecsys Toxo IgG/IgM (Roche Diagnostics®, Somerville, NJ, USA), no setor de Imunologia da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas de São Paulo (DLC HCFMUSP). O procedimento padrão nesse laboratório é submeter as amostras IgM positivas no método comercial Elecsys ao teste confirmatório de Imunofluorescência Indireta (IFI). As amostras foram selecionadas de acordo com os valores de referência do método comercial: 6 amostras positivas para anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii*, 2

amostras positivas para IgM e negativas para IgG anti-*T. gondii*, 8 amostras IgG positivas, IgM negativas anti-*T. gondii* e 8 amostras IgG negativas, IgM negativas anti-*T. gondii*. Os valores de referência do ELISA comercial estão descritos no ANEXO A.

4.3 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 (26420/2012 e 335541/2013) como pode ser visto no ANEXO B.

4.4 Padronização do ensaio imunofluorescente de fase sólida (FLISA isolado) e seu desempenho comparado ao ELISA *in house*

4.4.1 Ensaio imunoenzimático (ELISA) IgG e IgM *in house*

A sensibilização de microplacas transparentes de 384 poços Costar (Corning®, Steube, NY, USA) foi realizada com extrato total de *T. gondii* (50µL/poço), diluído em tampão carbonato de sódio (Na₂CO₃-NaHCO₃ 0,1M, pH 9,5). As microplacas foram incubadas por 18 horas em câmara úmida a 4°C e em seguida, lavadas com PBSTL (PBS + Tween-20® 0,05% + leite em pó 0,3%). A seguir, as microplacas foram bloqueadas com PBSTL (120µL/poço), incubadas a 37°C durante 1h e lavadas. As amostras de soro foram diluídas, na concentração de 1:100 em PBSTL e aplicadas 50µL por poço, em duplicadas. As microplacas foram incubadas a 37°C por 1h e lavadas novamente. Foi adicionado o conjugado

peroxidase anti-IgG humano (Sigma®, St Louis, MO, USA), diluídos em PBSTL, na concentração de 1:20.000 (50µL/poço). As microplacas foram incubadas a 37°C por mais 1h e lavadas. A seguir, foram aplicados 50µL/poço de solução cromógena OPD (O-fenilenodiamina 0,05%, Sigma® + ácido cítrico 1% + Na₂HPO₄ 1,45% em H₂O, adicionados de 10µl de H₂O₂ 30% para cada 20mL de solução) ou TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, Sigma®). Após a incubação das microplacas a temperatura ambiente por 30 minutos ao abrigo da luz, a reação foi interrompida com HCl 4N (25µL/poço). A leitura das placas foi realizada no espectrofluorímetro *Multi-mode Microplate Reader* FilterMax F5 (Molecular Devices®, Califórnia, USA) em filtro de absorvância de 492nm quando utilizado o substrato OPD e em filtro de absorvância de 450nm quando utilizado o substrato TMB. Para a detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii* foi usada a mesma metodologia com conjugado peroxidase anti-IgM humano (1:20.000, Sigma®).

4.4.2 Ensaio imunofluorescente (FLISA isolado) IgG e IgM

A sensibilização de microplacas pretas de 96 poços Costar (Corning®) foi realizada com extrato total de *T. gondii* (100µL/poço), diluído em tampão carbonato de sódio (Na₂CO₃-NaHCO₃ 0,1M, pH 9,5) ou taquizoítos íntegros formolizados (20µL/poço). As microplacas foram incubadas por 18 horas em câmara úmida a 4°C e em seguida, lavadas com PBSTL (PBS + Tween-20® 0,05% + leite em pó 0,3%). A seguir, as microplacas foram bloqueadas (300µL/poço), incubadas a 37°C durante 1h e lavadas. As amostras de soro foram diluídas em PBSTL e aplicadas 100µL por poço, em duplicadas. Após novas lavagens, foi adicionado conjugado anti-IgG humano fluoresceína (FITC, Sigma®) diluído em PBSTL. As microplacas foram lavadas e foi adicionado em cada poço 100µL de PBS. A leitura das placas

foi realizada no espectrofluorímetro *Multi-mode Microplate Reader* FilterMax F5 (Molecular Devices®) em filtros de excitação e emissão de 485nm e 535nm, respectivamente. Para a detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii* foi usada a mesma metodologia, com conjugado anti-IgM fluoresceína (FITC, Sigma®). O bloqueio das microplacas, as concentrações de antígeno, soro e conjugados de cada ensaio para padronização estão descritos na Tabela 1. Para o ELISA IgG e o FLISA IgG, o *cutoff* foi obtido pelo cálculo da média das leituras de soros controles negativos adicionado de dois desvios-padrão. Para o ELISA IgM e FLISA IgM, o *cutoff* foi obtido pela análise da frequência de distribuição das amostras, calculado pela media das leituras das amostras de soro com intervalo de confiança de 99% adicionado de dois desvios-padrão.

Tabela 1 - Padronização FLISA isolado: preparação e concentração do antígeno de *T. gondii*, bloqueio das microplacas, diluição dos soros e dos conjugados anti-IgG e anti-IgM humanos FITC.

	Preparação e concentração do antígeno de <i>T. gondii</i>	Diluição dos soros	Diluição dos conjugados
Preparação do antígeno	extrato total sonificado - 2µg/mL e taquizoítos íntegros - 20µL	1/250	anti-IgG FITC 1/500 e 1/1000
Bloqueio: albumina bovina (10mg/mL), leite (0,3%) e gelatina (10mg/mL)	extrato total sonificado - 10µg/mL e 1µg/mL	-	anti-IgG e anti-IgM FITC 1/500 e 1/1000
Concentração de soro e dos conjugados	extrato total sonificado - 2µg/mL, 5µg/mL, 10µg/mL, 25µg/mL	1/50 1/250	anti-IgG FITC 1/500 e 1/2500 e anti-IgM FITC 1/200 e 1/1000
Comparação entre ELISA <i>in house</i> e FLISA isolado	extrato total sonificado - 10µg/mL	1/250 para IgG e IgM	anti-IgG e anti-IgM peroxidase 1/20000; anti-IgG FITC 1/2500 e anti-IgM FITC 1/1000

4.5 Padronização do ensaio imunofluorescente multiplex (FLISAm), eficiência do FLISAm comparado ao ELISA *in house* e validação com o método comercial Elecsys

4.5.1 Controle de reatividade dos conjugados com imunoglobulinas adsorvidas na microplaca

Para controle e quantificação dos conjugados anti-IgG humano fluoresceína e anti-IgM humano rodamina foram utilizadas imunoglobulinas IgG e IgM humanas adsorvidas nas microplacas de cada um dos procedimentos realizados para o desenvolvimento do FLISAm. Em duplicadas, foram adicionadas três concentrações de IgG e IgM humana na etapa de sensibilização do FLISAm (Figura 6). Na etapa da adição de amostras de soro, os poços com os controles permaneceram com solução tampão PBS. Todas as outras etapas de realização do FLISA foram mantidas em todos os poços.

Figura 6 - Representação esquemática do controle de reatividade dos conjugados anti-IgG humano marcado com fluoresceína (verde) e anti-IgM humano marcado com rodamina (rosa), com as diferentes concentrações de imunoglobulinas IgG e IgM humanas adsorvidas na microplaca de 96 poços, utilizada nos imunoensaios fluorescentes multiplex (FLISAm).

4.5.2 Obtenção de IgG e IgM humana purificada

4.5.2.1 Obtenção de IgG humana: Precipitação de imunoglobulinas por sulfato de amônio saturado

Foram utilizadas 5 amostras de 2mL de soro humano controle negativo para anticorpos anti-*T.gondii*, armazenados no Laboratório de Protozoologia do IMTSP. Em 10mL de soro humano foi adicionado 10mL de tampão borato de sódio 0,1M pH 7,5 e em seguida, foi adicionado 20mL de sulfato de amônio saturado no agitador magnético. Após esse procedimento, procedeu-se uma incubação de 20 minutos no gelo. Em seguida, a solução foi submetida à centrifugação a 10.000g por 20 minutos. O sobrenadante foi desprezado e acrescentou-se 10mL de PBS pH 7,5.

4.5.2.2 Purificação de IgG

Após a precipitação, a solução foi filtrada em membrana de policarbonato de 0,2µm (Millipore®) e aplicada em uma resina com proteína A, coluna de 2mL (GE Healthcare®, Wavwatos, WT, USA). A purificação foi realizada em um sistema automatizado LPLC (*Low pressure Liquid Chromatography*), ÄKTAprime (GE Healthcare®) pelo método GST- *tag purification* utilizando como tampão de corrida, uma solução de borato de sódio a 0,1M, pH 7,5 e como tampão de eluição, uma solução de glicina a 0,1M, pH 2,5. As frações foram coletadas em um fluxo de 1mL/minuto com um volume de 1mL por tubo de coleta, e a solução de cada tubo foi dosada no espectrofotômetro em filtro de absorção de 280nm para determinar a concentração proteica, por meio do coeficiente de absorção (E_{280}) da IgG de 1.43. A imunoglobulina IgM humana foi obtida comercialmente (Sigma®).

4.5.3 Produção de anti-IgM humano marcado com NHS-Rhodamine

Para produzir o conjugado fluorescente foi utilizado anti-IgM humano obtido comercialmente (Pierce®, Rockford, IL, USA). O NHS-Rhodamine (Pierce®) apresenta um terminal NHS-éster que reage com aminas primárias de anticorpos, o que possibilita o acoplamento desse fluorocromo com o anti-IgM humano. Foi adicionado em um eppendof, 0,25mg/mL de anti-IgM humano diluído em tampão borato de sódio pH 8,5 e 1,76µL de NHS-Rhodamine (10mg/mL em dimetilformamide - DMF). Após agitação em vórtex, a solução foi incubada em temperatura ambiente por 1 hora. A quantidade de NHS-Rhodamine adicionada depende da quantidade de proteína que será conjugada, conforme protocolo do fabricante:

1- Cálculo de mmoles de NHS-Rhodamine:

$$\frac{\text{mL proteína} \times \text{mg proteína}}{\text{mL proteína} \times \text{mg proteína}} \times \frac{\text{mmol proteína}}{\text{mmol de proteína}} \times \frac{10\text{mmol ROD}}{\text{mmol de proteína}} = \text{mmol ROD}$$

2- Cálculo da quantidade em µL de NHS-Rhodamine para a reação:

$$\frac{\text{mmol de ROD} \times \text{peso molecular de ROD}}{\text{mmol de ROD}} \times \frac{100\mu\text{L}}{1\text{mg}} = \mu\text{L ROD}$$

- ROD= NHS-Rhodamine;
- 10= Razão molar de NHS-Rhodamine para acoplamento em proteínas;
- 100µL= Quantidade de solvente que 1mg de NHS-Rhodamine foi diluída.

Após a etapa de incubação do NHS-Rhodamina com o anti-IgM humano, a solução foi purificada por cromatografia de exclusão molecular em coluna de

10mL de resina Sephadex G-25-40 (GE Healthcare®), para remoção do NHS-Rhodamine excedente (Figura 7). 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, EUA) 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 570nm para o cálculo da taxa molar Fluorocromo/Proteína (F/P). Após esse procedimento, o conjugado purificado foi estocado ao abrigo da luz a 4°C até o momento do uso.

Figura 7 - Purificação do conjugado anti-IgM humano marcado com rodamina (NHS- Rhodamine) em coluna Sephadex G-25-40.

4.5.3.1 Análise da eficiência de acoplamento: Determinação da média molar de fluorocromo por anticorpo (F/P).

A avaliação da eficiência de acoplamento do fluorocromo nas moléculas de anticorpos foi avaliada conforme recomendado pelo fabricante, através dos cálculos descritos a seguir:

- $\epsilon_{\text{proteína}}$ = coeficiente de extinção molar da IgG = $\sim 210.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$;
- ϵ' = coeficiente de extinção molar de NHS-Rhodamine = $\sim 60.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$;
- CF = Fator de correlação = $\frac{A_{280}}{A_{\text{max}}} = \text{CF da NHS-Rhodamine} = 0,340$;
- $A_{\text{max}} = A_{570}$ = Comprimento de onda (λ_{max}) que ocorre o máximo de absorção da molécula do corante de NHS-Rhodamine (conforme protocolo do fabricante, *Thermo Scientific Pierce® Fluorescent Dyes*).

Concentração de proteína (M):

$$\frac{A_{280} - (A_{570} \times \text{CF})}{\epsilon_{\text{proteína}}}$$

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

$$\frac{A_{570} \text{ da proteína conjugada}}{\epsilon' \times \text{concentração de proteína (M)}} \times \text{fator de diluição}$$

4.5.4 Purificação do conjugado anti-IgG humano marcado com fluoresceína

O conjugado anti-IgG humano FITC (Sigma®) foi purificado por afinidade à imunoglobulina IgG humana. Essa purificação foi realizada utilizando-se partículas magnéticas comerciais (MagnaBind™ Amine Derivatized Beads, Sigma®) apresentando sítios de ligações amina para acoplamento de IgG humana purificada, via *crosslinker* BS³ (Bis(Sulfosuccinimidyl) suberate, Sigma®), que contém um NHS-éster (N hydroxysulfosuccinimide) em cada extremidade para a reação com aminas primárias (Figura 8).

Figura 8 - Representação esquemática da ligação do *crosslinker* BS³ com os sítios de aminas primárias das partículas magnéticas via ponte NHS-éster e reação com os grupos aminas de antígenos ou anticorpos específicos.

4.5.4.1 Purificação do conjugado anti-IgG humano marcado com fluoresceína por afinidade a IgG humana acoplada em partículas magnéticas

Para a ativação da superfície das partículas magnéticas, foi adicionado em um eppendorf 10^7 partículas/mL e BS^3 para uma solução final de 200 μL em tampão carbonato bicarbonato $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 0,1M (pH 9,5). Essa solução foi incubada em temperatura ambiente por 15 minutos com agitação no vórtex em 3 períodos (a cada 5 minutos) de 30 segundos. Após a etapa de ativação, as esferas foram lavadas 3 vezes com 200 μL de tampão carbonato bicarbonato em uma estante magnética (Magnex rack Labetest Labtest Diagnóstica®, MG, Brasil). Acrescentou-se nas partículas ativadas com BS^3 , IgG humana purificada e procedeu-se uma incubação em temperatura ambiente como descrito anteriormente. Após o acoplamento com IgG, a solução foi retirada, após a separação magnética, e foi analisada por Bradford (Bradford, 1976) para a avaliação da eficiência do quanto de IgG acoplou nas microesferas magnéticas. As microesferas foram lavadas com tampão carbonato bicarbonato 3 vezes na estante magnética e ressuspendidas em 200 μL . Após o acoplamento de IgG nas microesferas magnéticas foi realizada a etapa de bloqueio com glicina pH 7,5. A seguir, a solução de partículas foi incubada por 5 minutos em temperatura ambiente no vórtex. As microesferas foram novamente lavadas na estante magnética e em seguida foi adicionado o conjugado anti-IgG humano marcado com fluoresceína (100 μL não diluídos) a fim de selecionar os anticorpos marcados com fluoresceína que se ligaram com a IgG humana acoplada nas partículas magnéticas. As partículas foram incubadas 15 minutos em temperatura ambiente sob agitação no vórtex e posteriormente, lavadas 3 vezes com tampão carbonato bicarbonato na estante magnética. Foi adicionado 200 μL de tiocianato de amônio (NH_4SCN) a 2M, e incubados em temperatura ambiente por 15 minutos, para eluição do conjugado por ruptura das ligações não-

covalentes (Pullen et al., 1986). Em seguida, foi retirada a solução após a separação magnética. Nessa solução foi adicionado 20µL de isotiocianato de fluoresceína (NHS-Fluoresceína a 10mg/mL diluído em Dimetilformamida – DMF) e incubado a temperatura ambiente por 30 minutos (Figura 9).

Figura 9 - Representação esquemática do acoplamento das microesferas magnéticas com IgG, lavagem com suporte magnético, ligação do conjugado fluorescente e eluição do conjugado com tiocianato de amônio.

4.5.4.2 Purificação do conjugado anti-IgG humano marcado com fluoresceína por cromatografia de exclusão molecular

Após a dissociação com o tiocianato de amônio e adição de fluoresceína (NHS-Fluoresceína), a solução foi submetida a uma cromatografia de exclusão

molecular para remoção de fluoresceína (NHS-fluoresceína) excedente (Figura 10). Foi utilizada uma coluna de 10mL, com resina Sephadex G-25-40 (GE Healthcare®). A coluna foi previamente equilibrada com tampão Borato de Sódio 0,1M, pH 7,4 a temperatura ambiente, em um fluxo de 1mL/minuto. Após a cromatografia, 300µL da solução de cada um dos tubos de coleta foi aplicada em microplaca de UV transparente de 96 poços (Sample Pack UV-Star® Microplates, Greiner bio-one®) para análise e seleção da fração coletada contendo o conjugado. A análise da microplaca foi realizada pela leitura no espectrofluorímetro Multi-mode Microplate Reader FilterMax F5 (Molecular Devices®) no filtro de absorvância de 280nm para determinar a concentração proteica, por meio do coeficiente de absorção (A_{280}) da IgG de 1.43 e a 496nm para determinar a taxa molar fluorocromo/proteína (F/P). Após esse procedimento, o conjugado purificado foi estocado ao abrigo da luz a 4°C até o momento do uso.

Figura 10 - Purificação do conjugado anti-IgG humano marcado com fluoresceína (NHS-Fluoresceína) em coluna Sephadex G-25-40.

4.5.5 Ensaio imunofluorescente multiplex (FLISAm) IgG e IgM

Microplacas pretas de 96 poços Costar (Corning®) foram sensibilizadas com extrato total de *T. gondii*, diluído em tampão carbonato de sódio ($\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 0,1M, pH 9,5). As microplacas foram incubadas por 18 horas em câmara úmida a 4°C e em seguida, lavadas cinco vezes com PBSTL (PBS + Tween-20® 0,05% + leite desnatado em pó 0,3%). A seguir, as microplacas foram bloqueadas com PBSTL (250µL/poço) e incubadas a 37°C durante 1h e lavadas. As amostras de soro foram diluídas em PBSTL e aplicadas 100µL por poço, em duplicatas. As microplacas foram incubadas a 37°C por 1h e lavadas novamente. A seguir, após padronização, os conjugados foram adicionados em tempos diferentes, cada um com uma etapa de incubação. Para primeira etapa de incubação foi adicionado conjugado anti-IgM humano marcado com NHS-Rhodamine como descrito anteriormente, diluído em PBSTL. Após o procedimento de incubação desse conjugado, na estufa a 37°C por 1h e lavagem com PBST, foi adicionado o conjugado anti-gG humano marcado com fluoresceína e repurificado em partículas magnéticas e coluna de exclusão molecular conforme já descrito, diluído em PBSTL. Após novas lavagens com PBSTL, foram adicionados nas microplacas 100µL de PBS por poço. A leitura das microplacas foi realizada no espectrofluorímetro Multi-mode Microplate Reader FilterMax F5 (Molecular Devices®) nos filtros de excitação e emissão de 485nm e 535nm respectivamente para a fluoresceína e em filtros de excitação e emissão de 535nm e 595nm respectivamente para a rodamina. As concentrações de soro e conjugados e o ensaio de interferência dos conjugados para padronização do FLISAm, incluindo a análise de diluição ótima dos conjugados produzidos e purificados e a análise de eficiência do conjugado purificado (ensaios de FLISA isolado), estão descritos na Tabela 2. A Figura 11 mostra as diferenças nas etapas de realização de um ELISA *in house* e do método imunofluorescente multiplex de fase sólida (FLISAm). Para o ELISA IgG e o FLISA IgG, o *cutoff* foi obtido pelo cálculo da média das leituras de

soros controles negativos adicionado de dois desvios-padrão. Para o ELISA IgM e o FLISA IgM o *cutoff* foi calculado pela média das leituras de soros controles negativos adicionados de três desvios-padrão.

Figura 11 - Representação esquemática das etapas do procedimento de realização do ensaio imunoenzimático ELISA *in house* e do FLISAm.

Tabela 2 - Padronização FLISAm: concentração ótima dos conjugados, comparação do conjugado comercial e purificado, ensaio de interferência comparando o FLISA isolado com o FLISA multiplex, concentração das amostras

de soro no FLISA multiplex e ensaio de comparação entre ELISA *in house* e FLISA multiplex.

	Sensibilização das microplacas	Concentração dos soros	Concentração dos conjugados	Adição dos conjugados anti-IgG fluoresceína e anti-IgM rodamina
Concentração dos conjugados anti-IgG humano fluoresceína e anti-IgM humano rodamina	IgG e IgM humana purificada: diluição seriada (base 2) 1µg/mL – 0,00045µg/mL	-	diluição seriada (base 2) 1:100 – 1:12800	-
Eficiência do conjugado purificado	extrato total sonificado 10µg/mL	1:100	anti-IgG fluoresceína 1:400	-
Interferência dos conjugados no FLISAm	extrato total sonificado 10µg/mL	1:100	anti-IgG fluoresceína 1:400 e anti-IgM rodamina 1:200	Adição simultânea e adição em tempos diferentes
Concentração das amostras de soro	extrato total sonificado 10µg/mL	1:50 1:100 1:200	anti-IgG fluoresceína 1:400 e anti-IgM rodamina 1:200	Adição em tempos diferentes
Comparação entre ELISA <i>in house</i> e FLISA multiplex, reprodutibilidade e validação	extrato total sonificado 10µg/mL	1:200	anti-IgG fluoresceína 1:400 e anti-IgM rodamina 1:200	Adição em tempos diferentes

4.6 Análise estatística

A comparação entre valores quantitativos foi feita pelo teste de ANOVA, verificando-se a homogeneidade de variâncias. Foram consideradas significativas as comparações cuja probabilidade de igualdade foi menor que 5% ($p < 0.05$). As estimativas estatísticas, bem como os índices de sensibilidade e especificidade foram feitos utilizando o pacote estatístico GraphPad Prism 5.0 (GraphPad software, Inc San Diego, Califórnia, USA). O índice de concordância Kappa e o teste de significância estatística Exato de Fischer foi realizado no pacote estatístico BioEstat 5.0 (BioEstat software).

5 RESULTADOS

A apresentação dos resultados será feita em três partes: A primeira refere-se à padronização de um ensaio imunofluorescente de fase sólida (FLISA isolado) e seu desempenho comparado ao ensaio imunoenzimático ELISA *in house*. A segunda etapa mostra a padronização e o desenvolvimento do teste imunofluorescente multiplex (FLISAm) em suas várias etapas, no que se refere à preparação dos reagentes. Na terceira etapa, é descrito o desempenho do teste imunofluorescente multiplex para detecção de anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii* pela comparação com o ELISA *in house*, reprodutibilidade interteste e validação com o ELISA comercial.

5.1 Padronização do ensaio imunofluorescente de fase sólida (FLISA isolado) e seu desempenho comparado ao ELISA *in house*

5.1.1 Padronização da preparação do antígeno de *T. gondii*

No ensaio imunofluorescente de padronização da preparação antigênica, foram obtidos resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) quando consideradas as leituras em unidades arbitrárias de fluorescência (u.a.) dos soros positivos analisados com o antígeno obtido por extrato total sonificado em relação à reatividade das amostras de soro analisadas com o preparado de antígeno obtido a partir de taquizoítos íntegros formolizados. Observa-se também, que houve uma diferença significativa ($p < 0,05$) na reatividade das amostras de soro positivas em relação à reatividade das amostras de soro negativas pelo extrato total do antígeno. Já quando analisadas a reatividade das amostras positivas e negativas com o taquizoíto íntegro, não houve diferença estatística (diluição de 1/500, $p = 0,144$;

diluição de 1/100, $p=1302$). O ensaio com os taquizoítos de *T. gondii* íntegros não discriminou os soros positivos dos soros negativos. Neste ensaio, verificando-se a distribuição dos soros, observa-se uma resposta mais elevada na reatividade das amostras positivas pelo extrato total sonificado do antígeno do que pelos taquizoítos íntegros formolizados (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Reatividade de amostras de soro positivas e negativas para anticorpos IgG anti-*T.gondii* no FLISA isolado. Padronização da preparação antigênica com 2µg/mL de extrato total sonificado do parasita e 20µL por poço de taquizoítos íntegros. Concentração do conjugado 1:500 e antígeno sonificado (●); Concentração do conjugado 1:1000 e antígeno sonificado (○); Concentração do conjugado 1:500 e antígeno íntegro (■); Concentração de conjugado 1:1000 e antígeno íntegro (□).

5.1.2 Padronização do bloqueio das microplacas

No ensaio de padronização do tipo de bloqueio utilizado nas microplacas para o ensaio imunofluorescente, observa-se que não houve diferenças significativas quando comparados os diferentes bloqueios de proteínas entre si (albumina, gelatina e leite), em cada uma das concentrações de antígeno avaliadas (1µg/mL e 10µg/mL). Também não houve diferenças significativas entre cada um dos bloqueios de proteínas utilizados: albumina bovina ($p=0,1872$), leite em pó desnatado ($p=0,4977$) e gelatina ($p=0,1307$), em comparação ao bloqueio com o detergente Tween® 20, quando avaliadas, em conjunto, as concentrações de antígeno e conjugado testados. Apesar disso, nos ensaios imunofluorescentes com 1µg/mL de antígeno em geral, os bloqueios PBS+albumina bovina e PBS+gelatina diminuíram em média a fluorescência de fundo em relação aos outros bloqueios (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Padronização do bloqueio utilizado nos ensaios imunofluorescentes com variação da quantidade de extrato total sonificado de *T. gondii*. **A:** Concentração 1:500 do conjugado anti-IgG humano. **B:** Concentração 1:1000 do conjugado anti-IgG humano. **C:** Concentração 1:500 do conjugado anti-IgM humano. **D:** Concentração 1:1000 do conjugado anti-IgM humano. PBS-Tween (1); PBS+albumina (2); PBS-Tween+leite (3); PBS+gelatina (4).

5.1.3 Padronização da concentração de soro e conjugados anti-IgG e anti-IgM humanos FITC para o FLISA isolado

No ensaio de padronização da concentração de antígeno, amostras de soro e conjugado anti-IgG e anti-IgM humanos para o FLISA isolado, verifica-se que a diluição ótima de antígeno, soro e conjugado anti-IgG humano avaliados pela titulação nos ensaios fluorescentes foram 10µg/mL, 1:250 e 1:2500 respectivamente (Gráfico 3B). Essa determinação foi baseada nas menores concentrações, soro e conjugado que proporcionaram diferenciação entre soros positivos e negativos para anticorpos IgG anti-*T.gondii*. Para a detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii*, utilizando o mesmo critério de padronização, foram consideradas as diluição de 10µg/mL de antígeno de *T. gondii*, 1:250 de amostras sorológicas e 1:1000 de conjugado anti-IgM humano, como concentrações ótimas de uso para os ensaios imunofluorescentes de fase sólida (Gráfico 4B). A utilização de 10µg/mL foi escolhida como concentração ideal, por ser a maior quantidade de antígeno com melhores resultados de diferenciação entre amostras positivas e negativas e por ser uma quantidade mais elevada, necessária para uso nos ensaios de detecção simultânea.

Gráfico 3 - Padronização das concentrações de antígeno de *T. gondii*, amostras de soro positivas e negativas para anticorpos IgG anti-*T. gondii* e conjugado anti-IgG humano para os ensaios imunofluorescentes. **A:** Imunoensaio com 25µg/mL de antígeno de *T. gondii*. **B:** Imunoensaio com 10µg/mL de antígeno. **C:** Imunoensaio com 5µg/mL de antígeno. **D:** Imunoensaio com 2µg/mL de antígeno. Concentração de soro 1:50 e conjugado 1:500 (1); Concentração de soro 1:50 e conjugado 1:2500 (2); Concentração de soro 1:250 e conjugado 1:500 (3); Concentração de soro 1:250 e conjugado 1:2500 (4).

Gráfico 4 - Padronização das concentrações de antígeno de *T. gondii*, amostras de soro positivas e negativas para anticorpos IgM anti-*T. gondii* e conjugado anti-IgM humano para os ensaios imunofluorescentes. **A:** Imunoensaio com 25μg/mL de antígeno de *T.gondii*. **B:** Imunoensaio com 10μg/mL de antígeno. **C:** Imunoensaio com 5μg/mL de antígeno. **D:** Imunoensaio com 2μg/mL de antígeno. Concentração de soro 1:50 e conjugado 1:200 (1); Concentração de soro 1:50 e conjugado 1:1000 (2); Concentração de soro 1:250 e conjugado 1:200 (3); Concentração de soro 1:250 e conjugado 1:1000 (4).

5.1.4 Comparação da reatividade de 140 amostras de soro de estudantes pelo ELISA *in house* e FLISA isolado

Para analisar a eficiência e concordância do ensaio imunofluorescente (FLISA isolado) em microplacas, 140 amostras de soro de estudantes universitários de Assis-SP foram avaliadas pelo ELISA *in house* e FLISA isolado para detecção de anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii*. De acordo com o *cutoff* de cada ensaio, pode-se observar que para o ELISA *in house* IgG, 22 amostras de soro foram positivas, o que corresponde a prevalência de 15,7%. A prevalência para o FLISA isolado IgG foi de 12,8%, 18 amostras de soro positivas (Gráfico 5A). A correlação entre as amostras pelo ensaio de ELISA *in house* IgG e FLISA isolado IgG mostrou uma correlação $r^2=0,6189$, $p<0,0001$ e uma correlação de Perarson, $\rho=0,7867$ (IC95% 0, 7140-0,8426) (Gráfico 5B).

Para a detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii*, o ELISA *in house* mostrou uma prevalência de 5%, 7 amostras de soro positivas e para o FLISA isolado, 9 amostras de soro positivas, com uma prevalência de 6,4% (Gráfico 6A). E a comparação entre as amostras de soro pelo ensaio imunoenzimático ELISA *in house* IgM e imunofluorescente FLISA isolado IgM mostrou uma correlação $r^2=0,2563$, $p<0,0001$ e uma correlação de Pearson $\rho=0,5062$ (IC95% 0,3715-0,6201) (Gráfico 6B).

Gráfico 5 - Reatividade quantitativa dos imunoenaios para anticorpos IgG anti-*T. gondii* em 140 amostras de soro de universitários. **A:** ELISA *in house* IgG e FLISA isolado IgG. As interrupções nos eixos mostram o limiar de positividade dos ensaios. **B:** Correlação entre as amostras de soro avaliadas pelo ELISA *in house* IgG e pelo FLISA isolado IgG.

Gráfico 6 - Reatividade quantitativa dos imunoenaios para anticorpos IgM anti-*T. gondii* em 140 amostras de soro de universitários. **A:** ELISA *in house* IgM e FLISA isolado IgM. As interrupções nos eixos mostram o limiar de positividade dos ensaios. **B:** Correlação entre as amostras de soro avaliadas pelo ELISA *in house* IgG e pelo FLISA isolado IgG.

A concordância entre ELISA *in house* IgG e FLISA isolado IgG mostraram 10 resultados discordantes: 7 amostras de soro ELISA *in house* IgG positivas e FLISA isolado IgG negativas e três amostras de soro FLISA isolado IgG positivas e ELISA *in house* IgG negativas, com uma concordância de 92,8% (n=130). Foi obtida uma concordância substancial avaliada pelo índice Kappa (Kappa=0,7088) entre os resultados do ensaio imunoenzimático ELISA *in house* e imunofluorescente FLISA isolado, com sensibilidade de 83,3% (IC 58,3%-96,4%), especificidade de 94,2% (IC 88,5%-97,6%), valor preditivo positivo 68,1% (IC 45,1%-86,1%) e valor preditivo negativo 97,4% (IC 92,7%-99,4%) (Tabela 3).

Tabela 3 - Valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo do FLISA isolado IgG comparado ao ensaio imunoenzimático ELISA *in house* IgG em 140 amostras de soro de estudantes de Assis-SP.

Testes	Resultado	FLISA IgG		Sensibilidade (IC 95%)	Especificidade (IC 95%)	Valor Preditivo Positivo (IC 95%)	Valor Preditivo Negativo (IC 95%)
		Positivo	Negativo				
ELISA <i>in house</i> IgG K= (0,7088) E.F.:p<0,0001	Positivo	15	7	83,3% (58,5-96,4)	94,2% (88,5-97,6)	68,1% (45,1-86,1)	97,4% (92,7-99,4)
	Negativo	3	115				

A comparação entre os resultados obtidos pelo ELISA *in house* IgM e FLISA isolado IgM mostraram 6 resultados discordantes: 2 amostras de soro positivas para ELISA *in house* e negativas para FLISA isolado e 4 amostras de soro positivas para o FLISA isolado e negativas para ELISA *in house*, com concordância de 95,7% (n=134). A correlação entre a reatividade das amostras de soro pelo FLISA isolado IgM forneceu resultados comparáveis ao ELISA *in house* IgM com uma concordância Kappa substancial (K=0,6026), sensibilidade de 55,5% (IC 21,2%-

86,3%), especificidade de 98,4% (IC 94,5%-99,8%), valor preditivo positivo de 71,4% (IC 94,5%-99,8%) e valor preditivo negativo de 96,9% (IC 92,4%-99,1%) (Tabela 4).

Tabela 4 - Valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo do FLISA isolado IgM comparado ao ensaio imunoenzimático ELISA *in house* IgM em 140 amostras de soro de estudantes de Assis-SP.

Testes	Resultado	FLISA IgM		Sensibilidade (IC 95%)	Especificidade (IC 95%)	Valor Preditivo Positivo (IC 95%)	Valor Preditivo Negativo (IC 95%)
		Positivo	Negativo				
ELISA <i>in house</i> IgM K= (0,6026) E.F.:p<0,0001	Positivo	5	2	55,5% (21,2-86,3)	98,4% (94,5-99,8)	71,4% (29,0-96,3)	96,9% (92,4-99,1)
	Negativo	4	129				

A reatividade dos soros para detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii* no FLISA isolado, apesar da baixa sensibilidade (55,5%), apresentou uma diferença significativa $p < 0,0001$, na discriminação dos soros positivos e negativos (Gráfico 7).

Gráfico 7 - Comparação da reatividade de amostras de soro negativas e positivas para anticorpos IgM anti-*T. gondii* avaliadas pelo ELISA *in house* e pelo FLISA isolado.

5.2 Padronização do ensaio imunofluorescente multiplex (FLISAm) para a detecção de anticorpos IgG e IgM contra *T. gondii*

5.2.1 Controle da reatividade dos conjugados anti-IgG humano fluoresceína e anti-IgM humano rodamina

Na análise do controle dos conjugados no ensaio imunofluorescente multiplex, verifica-se a variação da reatividade do anti-IgG humano marcado com fluoresceína (Gráfico 8A) e do anti-IgM humano marcado com rodamina (Gráfico 8B) às concentrações de imunoglobulinas em 5 imunoensaios diferentes. Observa-se, que na concentração de 0,5µg/mL de imunoglobulina humana adsorvida, houve a máxima variação dos conjugados anti-IgG humano (474 u.a.) e anti-IgM humano (461 u.a.).

Gráfico 8 - Controle dos conjugados com diferentes concentrações de imunoglobulinas adsorvidas na microplaca em 5 imunoenaios diferentes. **A:** Reatividade do conjugado anti-IgG humano à IgG humana adsorvida na microplaca. **B:** Reatividade do conjugado anti-IgM humano à IgM humana adsorvida na microplaca.

5.2.2 Produção do conjugado anti-IgM humano marcado com rodamina (NHS-Rhodamine)

Na cromatografia de exclusão molecular do anti-IgM humano marcado com o fluorocromo rodamina (NHS-Rhodamine), foram coletadas 25 frações de 1mL. Os perfis cromatográficos estão representados no Gráfico 9. O rendimento da conjugação foi 60% e a taxa média molar da quantidade de fluorocromo por anticorpo (F/P) foi de 2,67 mols de NHS-Rhodamine por mol de anticorpo. Entre as frações 10 e 15 observa-se que houve um aumento da absorbância a 570nm, detectando a separação do NHS-Rhodamine excedente. A fração 4 foi utilizada para os ensaios imunofluorescentes multiplex (FLISAm).

Gráfico 9 - Cromatografia de exclusão molecular do conjugado anti-IgM humano marcado com NHS-Rhodamine em coluna Sephadex G-25-40; 10-40 μ M, sob o fluxo de 1mL por minuto e frações de 1mL.

5.2.3 Padronização da concentração do conjugado anti-IgM humano marcado com rodamina para o FLISAm

Nesse ensaio imunofluorescente, observa-se que nas diluições de 1:100 e 1:200, o conjugado produzido foi mais reagente às quantidades de IgM adsorvidas na microplaca comparado às outras diluições (Gráfico 10). Observa-se que até a diluição de 1:200, o conjugado manteve o perfil de reatividade às concentrações de imunoglobulinas adsorvidas na microplaca. Assim, utilizando o critério baseado na menor concentração de conjugado que proporcionou maior reatividade, em unidades arbitrárias de fluorescência, à IgM humana adsorvida na microplaca, a diluição ótima da concentração do conjugado produzido marcado com rodamina foi de 1:200. Essa concentração foi utilizada nos ensaios fluorescentes multiplex para detecção de anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii*.

Gráfico 10 - Reatividade em unidades arbitrárias de fluorescência do conjugado anti-IgM humano marcado com NHS-Rhodamine em relação à diferentes concentrações de IgG humana adsorvida na microplaca.

5.2.4 Purificação do conjugado anti-IgG humano marcado com fluoresceína (NHS-Fluoresceína)

Na purificação do conjugado anti-IgG humano com alta especificidade em partículas magnéticas, o rendimento do acoplamento da IgG humana nas partículas foi de 85% (IgG aplicada=100µg, IgG acoplada=85µg). Na exclusão molecular para separação do NHS-fluoresceína excedente, foram coletadas 25 frações de 1mL e os perfis cromatográficos estão representados no Gráfico 11. O rendimento da purificação por cromatografia foi 89,9% e a taxa média molar de Fluorocromo/Proteína (F/P) foi de 3,24 moles de fluoresceína (NHS-fluoresceína) por mol de anticorpo. Entre as frações 14 e 16 observa-se que houve um aumento na absorbância de 496nm, detectando a separação de fluoresceína não conjugada. A fração 6 foi utilizada para os ensaios imunofluorescentes multiplex (FLISAm).

Gráfico 11 - Cromatografia de exclusão molecular do conjugado anti-IgG humano marcado com FITC em coluna Sephadex G-25-40; 10-40 μ M, sob o fluxo de 1mL por minuto e frações de 1mL.

5.2.5 Padronização da concentração do conjugado anti-IgG humano marcado com fluoresceína para o FLISAm

No ensaio imunofluorescente para padronização do conjugado purificado anti-IgG humano fluoresceína, observa-se que nas diluições 1:100, 1:200 e 1:400, o conjugado foi mais reagente às quantidades de IgG adsorvidas na microplaca comparado às outras diluições (Gráfico 12). Observa-se que até a diluição de 1:400, o conjugado manteve o perfil de reatividade às concentrações de imunoglobulinas adsorvidas na microplaca. Neste ensaio, utilizando o critério baseado na menor concentração de conjugado que proporcionou maior reatividade, em unidades arbitrárias de fluorescência, à IgG humana adsorvida na microplaca, a diluição ótima da concentração do conjugado purificado anti-IgG humano

fluoresceína foi de 1:400. Essa concentração foi utilizada nos ensaios fluorescentes multiplex para detecção de anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii*.

Gráfico 12 - Reatividade em unidades arbitrárias de fluorescência do conjugado anti-IgG humano marcado com fluoresceína em relação à diferentes concentrações de IgG humana adsorvida na microplaca.

5.2.6 Comparação da reatividade de amostras de soro positivas e negativas com o conjugado comercial e o conjugado purificado

No ensaio imunofluorescente para comparação da reatividade em unidades arbitrárias de fluorescência com o conjugado comercial e conjugado purificado, considerando-se a média dos soros positivos e negativos observa-se, que tanto o conjugado comercial quando o conjugado purificado discriminou as amostras de soro positivas e negativas. Neste ensaio, a discriminação entre os soros positivos e negativos utilizando o conjugado purificado por partículas magnéticas e

cromatografia de exclusão molecular tanto na concentração de 1:200 quanto na concentração de 1:400 foi maior em relação à discriminação das amostras de soro positivas e negativas com o conjugado comercial (Gráfico 13A e 13B).

Gráfico 13 - Comparação da reatividade de amostras de soro ao conjugado comercial (soros positivos - pos1 e negativos - neg1) e com o conjugado purificado por partículas magnéticas e cromatografia de exclusão molecular (soros positivos - pos2 e negativos - neg2). **A:** Diluição dos conjugados 1/200. **B:** Diluição dos conjugados 1/400.

5.2.7 Análise da interferência na detecção conjunta dos conjugados fluorescentes: Comparação da reatividade de amostras de soro no FLISA isolado e FLISAm

5.2.7.1 Reação de imunofluorescência com uma única etapa de adição dos conjugados anti-IgM humano rodamina e anti-IgG humano fluoresceína

No ensaio de comparação da reatividade de amostras de soro positivas e negativas para anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii*, no FLISA isolado e no FLISAm com adição dos conjugados fluorescentes simultaneamente no poço de reação, observa-se que houve interferência na leitura dos fluorocromos (Gráfico 14).

Gráfico 14 - Interferência da reatividade de amostras de soro positivas e negativas para anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii* em microplacas com as leituras dos conjugados fluoróforos: anti-IgG humano comercial marcado com fluoresceína (FITC) (verde) e anti-IgM humano marcado com rodamina (NHS-Rhodamine) (rosa) analisados no FLISA isolado (1) e FLISAm (2).

Quando comparadas as leituras em unidades arbitrárias de fluorescência dos soros positivos para anticorpos IgM anti- *T. gondii* no FLISA isolado e no FLISA multiplex (soro 1), considerando a média dessas amostras positivas, observa-se que houve uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) da reatividade dessas amostras de soro positivas para IgM na detecção simultânea (Gráfico 15). No FLISAm, com esse procedimento de adição dos conjugados, não houve discriminação entre as amostras de soro positivas e negativas para anticorpos IgM anti-*T. gondii*. Nesse ensaio, como os conjugados fluorescentes anti-IgG humano marcado com fluoresceína (NHS-fluoresceína) e anti-IgM humano marcado com rodamina (NHS-Rhodamine) foram adicionados simultaneamente, ocorreu uma

interferência do conjugado anti-IgG humano na ligação do conjugado anti-IgM humano. Nesse ensaio, o FLISA multiplex conseguiu discriminar as amostras de soro positivas e negativas apenas para anticorpos IgG anti-*T. gondii*.

Gráfico 15 - Reatividade de amostras de soro positivas e negativas para anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii* em microplacas com as leituras dos conjugados fluoróforos: anti-IgG humano comercial marcado com fluoresceína (FITC) (verde) e anti-IgM humano marcado com rodamina (NHS-Rhodamine) (rosa). FLISA isolado (símbolo fechado); FLISAm (símbolo aberto). Amostras de soro IgG e IgM positivas (soro 1); Amostras de soro IgG positivas e IgM negativas (soro 2); Amostras de soro IgG e IgM negativas (soro 3).

5.2.7.2 Reação de imunofluorescência com duas etapas de adição dos conjugados: Primeira incubação com anti-IgM humano rodamina e segunda incubação com anti-IgG humano fluoresceína

No ensaio de comparação da reatividade de amostras de soro positivas e negativas para anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii*, no FLISA isolado e no FLISA multiplex com adição dos conjugados fluorescentes em tempos diferentes no poço de reação, ou seja, cada conjugado com uma etapa de incubação separada, observa-se que houve uma redução na interferência da detecção simultânea do isotiocianato de fluoresceína (FITC) e do NHS-Rhodamine (Gráfico 16), quando comparada com o ensaio de adição desses conjugados fluorescentes ao mesmo tempo (Gráfico 14).

Gráfico 16 - Interferência da reatividade de amostras de soro positivas e negativas para anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii* em microplacas com as leituras dos conjugados fluoróforos: anti-IgG humano comercial marcado com fluoresceína (FITC) (verde) e anti-IgM humano marcado com rodamina (NHS-Rhodamine) (rosa) analisados pelo FLISA isolado (1) e FLISAm (2).

Em relação à média da reatividade das amostras de soro em unidades arbitrárias de fluorescência no FLISA isolado e no FLISA multiplex, observa-se que houve uma variação, com um aumento na reatividade das amostras positivas para anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii* (soro 1) e redução da reatividade das amostras positivas para IgG e negativas para IgM (soro 2) e das amostras negativas para IgG e IgM anti-*T. gondii* (soro 3) (Gráfico 17). Nesse ensaio, mesmo com essa variação na reatividade de algumas amostras, a adição dos conjugados em tempos diferentes no mesmo poço resultou na identificação das amostras positivas e negativas tanto para anticorpos IgG quanto para anticorpos IgM anti-*T. gondii* semelhante a análise dessas amostras no FLISA isolado. A partir desse ensaio

imunofluorescente, consideramos esse procedimento de adição dos conjugados anti-IgG e anti-IgM humano, inicialmente, o método para a realização do imunoenensaio multiplex fluorescente para detecção de anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii*.

Gráfico 17 - Reatividade de amostras de soro positivas e negativas para anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii* em microplacas com as leituras dos conjugados fluoróforos: anti-IgG humano comercial marcado com fluoresceína (FITC) (verde) e anti-IgM humano marcado com rodamina (NHS-Rhodamine) (rosa). FLISA isolado (símbolo fechado); FLISAm (símbolo aberto). Amostras de soro IgG e IgM positivas (soro 1); Amostras de soro IgG positivas e IgM negativas (soro 2); Amostras de soro IgG e IgM negativas (soro 3).

5.2.8 Padronização da concentração de soro no FLISAm

No ensaio de padronização da concentração de soro no FLISA multiplex para anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii* observa-se, pela média da reatividade em unidades arbitrárias de fluorescência das amostras de soro, que quanto menos diluído o soro, maior a reatividade em unidades arbitrárias de fluorescência (Gráfico 18A), porém a discriminação das amostras de soro positivas e negativas para detecção de anticorpos IgM é menor em relação as outras diluições de soro, não detectando uma amostra de soro IgM positiva (Gráfico 18B). As diluições do soro em 1:50, 1:100 e 1:200 não influenciou na detecção de amostras positivas e negativas para anticorpos IgG anti-*T. gondii*. Ao contrário, a diluição de soro 1:200, além de discriminar de maneira eficiente as amostras de soro positivas e negativas para anticorpos IgG anti-*T. gondii*, proporcionou uma maior discriminação entre as amostras positivas e negativas para anticorpos IgM anti-*T. gondii* quando comparadas com as outras diluições. A diluição ótima de soro utilizada no imunoensaio fluorescente para detecção de anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii* foi de 1:200.

Gráfico 18 - Reatividade de amostras de soro positivas e negativas para anticorpos IgG (A, C e E) e IgM (B, D e F) anti-*T. gondii* no FLISAm. A e B: Concentração das amostras de soro na diluição 1:50. C e D: Concentração das amostras de soro na diluição 1:100. E e F: Concentração das amostras de soro na diluição 1:200.

5.3 Desempenho do FLISAm: Comparação com ELISA *in house*, análise de reprodutibilidade e validação pelo ELISA comercial

5.3.1 Comparação da reatividade de 120 amostras de soro de gestantes avaliadas pelo ELISA *in house* e FLISAm

Para analisar a eficiência e concordância das técnicas de imunoenaios, amostras de soro de 120 gestantes foram submetidas a triagem prévia pelo ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA IgG/IgM *in house*) e posterior análise pelo ensaio imunofluorescente multiplex (FLISAmIgG/IgM).

O Gráfico 19A e Gráfico 20A mostram a distribuição da reatividade das amostras de soro positivas e negativas para anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii*, pelo método imunoenzimático ELISA *in house* e FLISAm. De acordo com o limiar de positividade de cada ensaio, pode-se observar que para o ELISA *in house*, 57 amostras de soros foram positivas, o que corresponde a prevalência de 47,5%. A prevalência para o FLISAm IgG foi de 53,3%, 64 amostras de soros positivas e 56 amostras de soros negativas (Gráfico 19A). Para a detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii*, o ELISA *in house* mostrou uma prevalência de 5%, 6 amostras sorológicas positivas e 114 amostras negativas e para o FLISAm, 7 amostras sorológicas positivas, com uma prevalência de 5,8% (Gráfico 20A).

A correlação entre as amostras pelo ensaio de ELISA *in house* e FLISAm para detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* mostrou uma correlação $r^2=0,8075$, $p<0,0001$ e uma forte correlação de Perarson, $\rho=0,8986$ (IC95% 0, 8575-0,9283) (Gráfico 19B). A comparação entre as amostras de soro pelo ensaio de ELISA *in house* e FLISAm para detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii* mostra uma correlação $r^2=0,520$, $p<0,0001$ e também forte correlação de Pearson $\rho=0,7211$ (IC95% 0,6223-0,7973) (Gráfico 20B).

Gráfico 19 - Reatividade quantitativa dos imunoenaios para anticorpos IgG anti-*T. gondii* em 120 amostras de soro de gestantes. **A:** ELISA *in house* IgG e FLISAm IgG. As interrupções nos eixos mostram o limiar de positividade dos ensaios. **B:** Correlação entre as amostras de soro avaliadas pelo ELISA *in house* IgG e pelo FLISAm IgG.

Gráfico 20 - Reatividade quantitativa dos imunoenaios para anticorpos IgM anti-*T. gondii* em 120 amostras de soro de gestantes. **A:** ELISA IgM e FLISAm IgM. As interrupções nos eixos mostram o limiar de positividade dos ensaios. **B:** Correlação entre as amostras de soro avaliadas pelo ELISA *in house* IgM e pelo FLISAm IgM.

A concordância entre o ELISA *in house* IgG e FLISAm IgG mostraram 7 resultados discordantes: 7 amostras de soro positivas para ELISA *in house* IgG e negativas para o FLISAm, com uma concordância de 94,1% (n=113), excelente concordância do índice Kappa (K=0,8837), sensibilidade de 100% (IC 93,7%-100%), especificidade de 87,5% (IC 76,8%-94,4%), valor preditivo positivo 87,6% (IC 77,1%-94,5%) e valor preditivo negativo 100% (IC 96,7%-100%). A correlação entre os resultados obtidos pelo ELISA *in house* IgM e FLISAm IgM mostrou 1 resultado discordante: positivo para o ELISA *in house* IgM e negativo para FLISAm IgM, com correlação de 99,1% (n=119), e uma excelente concordância avaliada pelo índice Kappa (K=0,9917). Os índices de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo, foram de 100% (IC 54,7%-100%), 99,1% (IC 95,2%-99,6%), 85,7% (IC 42,1%-99,6%) e 100% (IC 96,7%-100%), respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5 - Valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo do FLISAm IgG/IgM comparado aos ensaios ELISA *in house* IgG e ELISA *in house* IgM em 120 amostras de soro de gestantes de Cascavel-PR.

Testes	Resultado	FLISA Multiplex IgG/IgM		Sensibilidade (IC 95%)	Especificidade (IC 95%)	Valor Preditivo Positivo (IC 95%)	Valor Preditivo Negativo (IC 95%)
		Positivo	Negativo				
ELISA <i>in house</i> IgG K= (0,8837) E.F.:p<0,0001	Positivo	57	8	100% (93,7-100)	87,5% (76,8-94,4)	87,6% (77,1-94,5)	100% (93,6-100)
	Negativo	0	56				
ELISA <i>In house</i> IgM K= (0,9187) E.F.:p<0,0001	Positivo	6	1	100% (54,7-100)	99,1% (95,2-99,9)	85,7% (42,1-99,6)	100% (96,7-100)
	Negativo	0	113				

5.3.2 Reprodutibilidade do FLISAm para detecção de anticorpos IgG e IgM anti-*T.gondii*

Na análise de reprodutibilidade interteste do ensaio imunofluorescente multiplex (FLISAm), a comparação entre a média da reatividade de amostras de soro, em unidades arbitrárias de fluorescência (UA), avaliadas para a detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, resultou em uma correlação $r^2=0,8489$ (IC 70,9%-94,1%) (Gráfico 21A) e para a detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii*, uma correlação $r^2=0,8053$ (IC 74,7%-100%) (Gráfico 21B).

Gráfico 21 - Comparação entre a média das leituras em unidades arbitrárias de fluorescência (UA) da reatividade de amostras de soro avaliadas pelo FLISAm em tempos diferentes (UA1 e UA2) para a análise de reprodutibilidade do teste. **A:** FLISAm para detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii*. **B:** FLISAm para detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii*.

5.2.3 Validação do FLISAm pelo método comercial

Para validar o ensaio imunofluorescente multiplex em microplacas, 24 amostras previamente analisadas por um ensaio automatizado comercial Elecsys Toxo IgG/IgM (Roche Diagnostics®) foram submetidas ao FLISAm. O Gráfico 22 mostra a distribuição da reatividade das amostras de soro positivas e negativas para anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii* pelo método imunoenzimático ELISA comercial e imunofluorescente FLISAm.

Gráfico 22 - Comparação da reatividade de amostras de soro negativas e positivas avaliadas pelo comercial kit e pelo FLISA multiplex. **A:** Detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii*. **B:** Detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii*.

A comparação da reatividade das amostras de soro positivas e negativas para anticorpos IgG anti-*T. gondii* pelo método comercial e FLISAm mostrou que não houve soros discordantes. Já a análise da reatividade de amostras positivas e negativas para anticorpos IgM anti-*T. gondii*, o FLISAm revelou 4 resultados discordantes: 4 amostras de soro positivas para o método comercial e negativas para o FLISAm. Na análise qualitativa de correlação entre as amostras positivas e negativas para anticorpos IgG anti-*T. gondii*, o índice Kappa foi de 100% e indica elevada concordância entre os métodos. Na detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii*, o índice Kappa foi de 51%, indicando uma concordância moderada entre os métodos avaliados. A reatividade de amostras de soro para anticorpos IgG anti-*T. gondii* pelo método comercial e FLISAm, revelaram uma sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo de 100%. Para a detecção de anticorpos IgM, o FLISAm obteve sensibilidade de 100% (IC 54,0%-100%), especificidade de 80,0% (IC 56,3%-94,2%), valor preditivo positivo de 42,8% (IC 9,8%-81,5%) e valor preditivo negativo de 100% (IC 79,4%-100%) (Tabela 6).

Tabela 6 - Valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo do FLISAm IgG/IgM comparado aos métodos comerciais IgG e IgM em 24 amostras de soro de pacientes com pedido de exame para toxoplasmose, atendidos no Hospital das Clínicas de São Paulo.

Testes	FLISAm IgG/IgM		Sensibilidade (IC 95%)	Especificidade (IC 95%)	Valor Preditivo Positivo (IC 95%)	Valor Preditivo Negativo (IC 95%)
	Resultado	Positivo	Negativo			
método comercial IgG K= (1,0000) E.F.:p<0,0001	Positivo	14	0	100% (76,8-100)	100% (69,1-100)	100% (76,8-100)
	Negativo	0	10			
método comercial IgM K= (0,5106) E.F.:p<0,0001	Positivo	3	4	100% (54,0-100)	80,0% (56,3-94,2)	42,8% (9,8-81,5)
	Negativo	0	16			

No método confirmatório de Imunofluorescência Indireta (IFI), utilizado pelo Laboratório de Imunologia do Hospital das Clínicas, apenas um dos soros IgM positivos (ELISA comercial=5,47UI/mL e FLISAm=2522u.a.) foi confirmado como reagente ao *T. gondii*. A comparação entre os métodos IFI e o ensaio imunoenzimático ELISA comercial resultou em uma sensibilidade de 100% (IC 2,5-100), especificidade de 69,5% (IC 47,0-86,1), valor preditivo positivo de 12,5% (0,3-5,2) e valor preditivo negativo de 100% (79,4-100). A correlação entre os métodos IFI e FLISAm mostrou uma sensibilidade de 100% (25,0-100), especificidade de 82,6% (61,2-95,0), valor preditivo positivo de 20% (0,5-7,0) e valor preditivo negativo de 100% (82,3-100) (Tabela 7).

Tabela 7 - Valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo do FLISAm IgM e método comercial IgM comparados ao IFI IgM em amostras de soro de pacientes com pedido de exame para toxoplasmose, atendidos no Hospital das Clínicas de São Paulo.

Testes	Resultado	IFI IgM		Sensibilidade (IC 95%)	Especificidade (IC 95%)	Valor Preditivo Positivo (IC 95%)	Valor Preditivo Negativo (IC 95%)
		Positivo	Negativo				
método comercial IgM K= (0,1600) E.F.:p<0,0001	Positivo	1	7	100% (2,5-100)	69,5% (47,0-86,1)	12,5% (3,0-52,0)	100% (79,4-100)
	Negativo	0	16				
FLISAm IgM K= (0,2836) E.F.:p<0,0001	Positivo	1	4	100% (25,0-100)	82,6% (61,2-95,0)	20,0% (5,0-70,0)	100% (82,3-100)
	Negativo	0	19				

6 DISCUSSÃO

Os nossos dados demonstraram que foi possível desenvolver um diagnóstico sorológico de fase sólida para detecção simultânea de anticorpos IgG e IgM contra *T. gondii*. Ao longo dos anos tem se observado o aperfeiçoamento das técnicas de diagnóstico sorológico de patógenos, cujas tendências atuais apontam para o desenvolvimento de ensaios rápidos e que detectam uma grande diversidade de analitos (Christopher-Hennings et al., 2013, Karoonuthaisiri et al., 2008, Ravidran et al., 2010). Os imunoenaios fluorescentes (FLISA – *Fluorescence or Fluorochrome Linked Immunosorbent Assay*) têm sido descritos, utilizando fluorocromos conjugados de alto desempenho com quantificação direta e linear (Velappan et al., 2008, Walsh et al., 2007). Essa técnica permite o desenvolvimento de protocolos de alto rendimento, com detecção múltipla de diferentes tipos de anticorpos, como IgG e IgM, úteis em triagens sorológicas de grande importância para saúde pública, como é o caso do diagnóstico pré-natal da toxoplasmose.

Na etapa de padronização da preparação e concentração do antígeno de *T. gondii* para desenvolvimento do ensaio sorológico fluorescente em microplacas, o imunoenasão com extrato total sonificado do antígeno resultou em uma reatividade mais elevada das amostras de soro do que o imunoenasão com taquizoítos íntegros formolizados. Proteínas de superfície dos taquizoítos, denominadas SAGs (*Surface Antigens*), juntamente com as SRSs (*SAG-Related Sequences*) compõem uma família de antígenos, dentre os quais SAG1, SAG2 e SAG3 se destacam como os mais imunogênicos e abundantemente expressos na superfície do parasita (Bhopale, 2003). Além das proteínas imunogênicas de superfície, organelas especializadas, como os micronemas, róptrias e grânulos densos secretam proteínas que nos últimos anos vem sendo extensivamente investigadas como

potenciais antígenos imunogênicos candidatos a vacinas. Essas proteínas, tais como GRA1 (Gatkowska et al., 2008), GRA2, GRA6 (Golkar et al., 2007), GRA4 (Martin et al., 2004), GRA5, GRA7 (Igarashi et al., 2008), MIC1, MIC2, MIC3, MIC4 (Jongert et al., 2008) e ROP2 (Xue et al., 2008) são também expostas quando ocorre o rompimento dos taquizoítos pelo método de sonicação, aumentando assim, o número de epítomos nos sítios de ligação para a reação antígeno-anticorpo, resultando em uma maior reatividade das amostras de soro positivas. Outros métodos mais eficientes, como o uso de detergentes para lise dos taquizoítos com posterior purificação em cromatografia de exclusão molecular pode aumentar os epítomos imunogênicos do antígeno de *T. gondii*, devido a grande exposição de proteínas antigênicas importantes de superfície de membrana dos taquizoítos (Ma et al., 2009) e eliminação de proteínas de baixo peso molecular e peptídeos que podem interferir na resposta imune (Geysen et al., 1985), resultando em um antígeno solúvel puro mais adequado para os ensaios sorológicos fluorescentes de fase sólida, como vem sendo relatado em outros estudos pelo nosso grupo. Nossos dados mostraram que a exposição dos antígenos por sonicação e solubilização foi mais eficiente que a manutenção da estrutura do agente em taquizoítos formolizados, como antígeno para uso em fase sólida.

Na padronização do bloqueio para o ensaio imunofluorescente, o reagente bloqueador Tween® 20 foi suficiente para minimizar de maneira eficiente as ligações inespecíficas nas microplacas. A capacidade da superfície de microplacas de poliestireno em reagir, por meio de ligações hidrofóbicas, com as proteínas e outras biomoléculas é uma característica essencial, no entanto, a ligação não específica de outras proteínas ou biomoléculas nos sítios reativos remanescentes da superfície, durante os passos subsequentes do imunoensaio pode ser prejudicial à especificidade e sensibilidade dos resultados (Engvall e Perlmann, 1972). Essas ligações inespecíficas podem ser minimizadas com um bloqueio reagente, pelo uso

de detergentes ou outras proteínas (Venkatesan e Wakelin, 1993). Os detergentes, como o Tween® 20, são considerados bloqueadores temporários, pois não fornecem uma barreira permanente para a ligação de biomoléculas à superfície, porque sua capacidade de bloqueio pode ser removida por lavagem (Engvall e Perlmann, 1972). Apesar disso, um trabalho recente relata que o uso do detergente Tween® 20 inibiu de maneira eficiente a ligação não específica de proteínas em um imunoensaio de fase sólida, não diminuindo a sensibilidade da análise (Bochkova et al., 2013). Nesse ensaio, o reagente Tween® 20 foi útil como o único reagente de bloqueio, provavelmente por ter sido adicionado em todos os diluentes e tampões utilizados em cada etapa do imunoensaio, revestindo continuamente a superfície das microplacas, o que impediu a ligação de outras biomoléculas.

Ainda no ensaio de padronização do bloqueio, 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, mesmo com as diferentes concentrações de antígeno. Apesar disso, nos ensaios imunofluorescentes com 1µg/mL de antígeno, em geral, os bloqueios PBS+albumina bovina e PBS+gelatina diminuíram a fluorescência de fundo em relação aos outros bloqueios. Alguns estudos relatam que apenas o reagente bloqueador Tween® 20 não é suficiente para saturar todos os sítios de ligação das microplacas e com isso, os bloqueadores mais eficazes para suportes sólidos permanece a utilização de proteínas, como a BSA e a gelatina (Huber et al., 2009, Steinitz, 2000). Outros autores demonstraram que o bloqueio com leite pode apresentar resultados mais eficientes que o bloqueio com BSA (Mohammad e Esen, 1989). Uma vez que nenhum reagente de bloqueio ou método é ideal para todos os ensaios, deve-se considerar vantagens e desvantagens de cada tipo e avaliar como esses recursos irão afetar a reação. A seleção do sistema de bloqueio apropriado é essencial para o desenvolvimento de um ensaio específico e sensível.

Nossos resultados demonstraram que o bloqueador detergente não iônico Tween® 20 e os bloqueadores de proteínas (albumina bovina, leite em pó desnatado e gelatina) testados foram eficientes para minimizar a ligação inespecífica de biomoléculas nos ensaios imunofluorescentes em fase sólida.

A partir do protocolo obtido com a padronização das concentrações de soro e dos conjugados anti-IgG e anti-IgM humanos FITC, com condições ótimas de uso para reatividade em unidades arbitrárias de fluorescência, foi possível obter uma boa eficiência da técnica imunofluorimétrica e com isso, avaliar o desempenho destes ensaios imunofluorescentes em microplacas (FLISA isolado) pela comparação com o diagnóstico sorológico imunoenzimático (ELISA *in house*).

Na análise de comparação entre a reatividade dos soros no ELISA *in house* e FLISA isolado para a detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, o FLISA isolado mostrou alta sensibilidade e especificidade. Já para a detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii*, o FLISA isolado mostrou alta especificidade, porém baixa sensibilidade. Apesar disso, a correlação entre o método imunoenzimático e imunofluorescente tanto na detecção de anticorpos IgG quanto IgM anti-*T. gondii* mostrou concordância. Estudos relatam que o FLISA pode ser um método sensível e eficiente comparado com o ELISA convencional (Sakamoto et al., 2011a, Sakamoto et al., 2011b, Zhu et al., 2011b). Matsukuma e colaboradores em 2006 desenvolveram um FLISA de alto rendimento e com menor coeficiente de variação do que o método de ELISA para detecção de Interferon- γ em microplacas. Outro estudo demonstrou que o FLISA foi mais rápido e econômico, além de apresentar sensibilidade e especificidade semelhante ao ELISA convencional para triagem do HIV-1 (Liu et al., 2003). Nossos resultados de reatividade das amostras de soro no FLISA isolado sugerem que a imunofluorescência de fase sólida é uma técnica eficiente e promissora como um método de triagem na sorologia da toxoplasmose humana.

A baixa sensibilidade inicial para detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii* no FLISA isolado pode ter ocorrido devido ao uso de conjugados anti-IgG e anti-IgM humanos FITC estocados no laboratório, utilizados para a imunofluorescência indireta (IFI), que não foram purificados com alta especificidade a imunoglobulina humana. Os métodos de purificação de anticorpos podem variar de pouco para altamente específicos, classificados como: fracionamento físico-químico, afinidade classe-específica e métodos de afinidade específica ao antígeno (Gagnon, 2012).

O método de fracionamento físico-químico separa as proteínas do soro com base no tamanho, carga ou outras características químicas compartilhadas de anticorpos em amostras típicas. Essa técnica isola um subconjunto de proteínas da amostra que inclui as imunoglobulinas (Wakankar et al., 2011). Os métodos por afinidade classe-específica separam as proteínas do soro pela ligação de determinadas classes de anticorpos (por exemplo, IgG) por ligantes biológicos imobilizados (proteínas, lectinas), que têm afinidade específica para as imunoglobulinas de fase sólida. Isso purifica todos os anticorpos da classe alvo sem levar em conta a especificidade ao antígeno (Zou et al., 2001). Já os métodos de afinidade específica ao antígeno, utilizam uma separação por afinidade de apenas aqueles anticorpos que se ligam a uma molécula de antígeno particular, promovendo assim, uma purificação altamente específica (Ayyar et al., 2012, Stoevesandt et al., 2012). Nossos conjugados anti-IgG e anti-IgM humanos FITC comerciais foram purificados pelo método de fracionamento físico-químico utilizando uma cromatografia de troca iônica, para obtenção da fração IgG ou IgM do anti-soro, conforme o protocolo do fabricante.

A cromatografia de troca iônica, apesar de ser um método de fracionamento físico-químico, pouco específico, foi adaptada para a purificação de anticorpos (Andrew e Titus, 2001, Kent, 1999). Essa cromatografia utiliza positivamente ou negativamente resinas carregadas para ligar proteínas com base nas suas cargas

líquidas, o ponto isoelétrico, num dado sistema de tampão (pH) (Boschetti et al., 2002). Especialmente em operações comerciais que envolvem a purificação de proteínas para uso farmacêutico (Burnouf et al., 2001), ou produção de conjugados, as condições para ligar e dissociar o anticorpo alvo da resina é estabelecida com um certo grau de especificidade, por separar um tipo específico de imunoglobulina (Sheng et al., 2012). Uma vez otimizado, é um método eficaz, porém não tão específico como os métodos que utilizam a afinidade ao antígeno. Assim, como nossos conjugados comerciais anti-IgG e anti-IgM humanos foram purificados por uma cromatografia de troca iônica, procedemos à produção de um conjugado purificado por afinidade anti-IgM humano marcado com NHS-Rhodamine, e à purificação do nosso conjugado anti-IgG FITC por um método de afinidade à imunoglobulina IgG humana para uso nos ensaios imunofluorescentes multiplex de fase sólida.

A padronização do imunoensaio fluorescente em microplacas (FLISA isolado) e análise de sua eficiência pela comparação com o ELISA *in house* nos forneceu resultados importantes em relação aos procedimentos adotados para o desenvolvimento do ensaio, essenciais para a padronização do imunoensaio fluorescente multiplex para detecção de anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii*.

No ensaio imunofluorescente multiplex de fase sólida, utilizamos imunoglobulinas específicas adsorvidas nas microplacas em diferentes concentrações como controle e quantificação do conjugado. Nos testes imunoenzimáticos comerciais e *in house* são utilizados como controle da reação do conjugado, amostras de soro positivas e negativas para o anticorpo específico. Esse tipo de controle tende a ser cada vez mais raro dada a melhoria das condições de saúde, o que implica na necessidade de uso de diluições como soro limiar ou outros artifícios comerciais. Acreditamos que a nossa abordagem é a mais

simples por ser imunoquímica e podermos atestar a pureza e a concentração da proteína adsorvida na placa.

Na produção do conjugado anti-IgM humano, obteve-se um baixo rendimento de conjugação (60%) do fluorocromo NHS-Rhodamine nas moléculas de anticorpo. Apesar disso, o conjugado apresentou reatividade à IgM humana até a diluição de 1:200, que foi utilizada nos ensaios imunofluorescentes. Os fluorocromos N-Hidroxi-succinimidil éster (NHS-éster), como o NHS-Rhodamine, são os mais comumente utilizados para a conjugação de proteínas, por formar ligações amida covalentemente estáveis (Gautam e Loh, 2012, Qian et al., 2011, Webb et al., 2013). Os compostos NHS-éster reagem com aminas primárias ($-NH_2$) 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 polipeptídeo (Hermanson, 1996). Em menores proporções, esses compostos também podem reagir com tirosinas, serinas e threoninas, localizadas em epítomos de regiões de imunoglobulinas (Kalkhof e Sinzs, 2008).

A frequência da formação dessas ligações amida estáveis na reação de conjugação com compostos NHS-éster depende da reatividade do fluorocromo, do peso molecular e concentração da proteína que será conjugada, do número de aminas reativas e principalmente do pH do meio (Brinkley et al., 1992). As reações com grupos ϵ -aminas de lisinas são favorecidas em pHs mais alcalinos (pH 8-10), ao contrário das reações com grupos α -amina, mais reativas em pH neutro (pH 7,0) (Guo et al., 2008, Mädler et al., 2008,). Alguns autores relatam que o acoplamento de proteínas, como a BSA, via NHS-éster com o pH mais alcalino (pH10), mantém a conformação nativa e atividade da proteína, além de se obter a máxima eficiência da reação de conjugação, com maior intensidade de fluorescência (Shan et al., 2008). Outros autores demonstraram que em condições um pouco ácidas (pH 6,0)

os NHS-ésteres reagem preferencialmente com o grupo hidroxila de tirosinas, podendo também resultar em um acoplamento altamente eficiente (Kalkhof e Sinzs, 2008). Assim, para um melhor rendimento do nosso ensaio de conjugação do anti-IgM humano com o fluorocromo NHS-Rhodamine, as condições da reação, como tempo, pH e concentração de imunoglobulina, devem ser padronizadas e otimizadas.

Optamos por produzir um conjugado específico para uso no ensaio imunofluorescente multiplex, pela versatilidade de poder conjugar o anti-IgM humano a vários fluoróforos diferentes, como FITC ou Alexa488, PECy5, PerCP, PE, que são mais utilizados em citofluorimetria, e Cy3 ou Alexa546, que são mais propícios para microscopia de fluorescência, métodos fluorescentes utilizados no nosso laboratório. Isso não só diminui muito o preço dos reagentes como também permite novas combinações de anticorpos que as vezes não seriam possíveis só com reagentes comerciais. Além disso, a produção de conjugados pode aumentar a especificidade da reação, devido à utilização de metodologias de purificação mais específicas. E ainda, possibilitar a marcação de anticorpos policlonais ou monoclonais produzidos no próprio laboratório utilizados para diagnóstico sorológico de patógenos.

Na etapa de comparação da reatividade de amostras de soro no FLISA isolado, pelo conjugado purificado e comercial, o conjugado anti-IgG humano fluoresceína foi mais eficiente após ser submetido ao método de purificação por afinidade específica ao antígeno. Os anticorpos purificados por afinidade ao antígeno são especialmente valiosos nos imunoensaios em que as proteínas do soro e anticorpos desconhecidos podem interferir com os resultados do teste (Lew, 1984). Os anticorpos purificados com menor especificidade podem reconhecer regiões semelhantes da cadeia leve ou pesada de imunoglobulinas de mesma classe, específicas para outro antígeno e com isso diminuir a sensibilidade da

reação (McHeyzer-Williams e McHeyzer-Williams, 2005). Nesse ensaio, a purificação por afinidade do conjugado anti-IgG humano fluoresceína removeu potenciais reações não específicas, reduzindo interferências de fundo no imunoensaio fluorescente e possibilitando assim, uma maior sensibilidade na discriminação dos soros positivos e negativos para anticorpos IgG anti-*T. gondii*.

Na análise de interferência da reatividade dos conjugados anti-IgG humano fluoresceína e anti-IgM humano rodamina, pela comparação no FLISA isolado e FLISA multiplex, o procedimento de adição dos conjugados em tempos diferentes no mesmo poço foi mais eficiente do que o procedimento de adição conjunta. A adição dos conjugados simultaneamente resultou em um excesso de anticorpos, e com isso competição pelos sítios específicos de ligação. A quantidade utilizada de antígeno nas microplacas (10µg/mL) não foi suficiente para o acoplamento simultâneo dos conjugados anti-IgG e anti-IgM humanos. Assim, seria necessária a utilização de quantidades mais elevadas do extrato total de *T. gondii*, em suportes sólidos de ligação que apresentam maior área de acoplamento, como micropartículas (Aslan e Geddes, 2005), ou ainda o uso de antígenos de *T. gondii* mais específicos, que expõe grande quantidade de epítomos imunogênicos, como peptídeos sintéticos e proteínas recombinantes (Araújo e Ferreira, 2010). Nesse ensaio de padronização, a lavagem das microplacas realizada no intervalo de adição dos conjugados retirou o excesso de anticorpos, possibilitando a ligação específica de cada um dos conjugados, resultando na identificação de amostras de soro positivas e negativas tanto para anticorpos IgG quanto para anticorpos IgM anti-*T. gondii* com reatividade semelhante a análise dessas amostras no FLISA isolado.

Após a padronização da concentração ideal de soro no ensaio imunofluorescente multiplex, a eficiência do FLISAm foi avaliada pela comparação com o ensaio imunoenzimático ELISA *in house*. Nesse ensaio, o FLISAm mostrou

alta sensibilidade e especificidade na detecção de anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii*. Além disso, houve concordância entre o ensaio imunoenzimático e imunofluorescente multiplex de fase sólida. Recentemente, alguns trabalhos tem investigado o desempenho de ensaios com detecção simultânea comparados com o ELISA convencional (Kunita et al., 2011, Powell et al., 2013, Zhang et al., 2011). Um estudo recente avaliando a detecção de resíduos de baixo peso molecular no leite, relata que o uso de uma metodologia multiplex em microplaca com sondas fluorescentes foi mais eficiente que o método imunoenzimático ELISA (Zhu et al., 2011a). Outro estudo mostra o desenvolvimento de um ensaio fluorerescente de fase sólida simples e sensível para detecção simultânea de duas drogas antibacterianas, com correlação de 95% com o ELISA convencional (Le et al., 2013). Nesse ensaio, verificamos que foi possível identificar os anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii* pelo método imunofluorescente multiplex de fase sólida, com eficiência e reprodutibilidade semelhante aos ensaios isolados.

A validação do FLISAm mostrou 4 resultados discordantes na detecção de anticorpos IgM, positivos para o método comercial e negativos para o FLISAm. Esses soros positivos no método comercial não foram reagentes pelo método confirmatório de imunofluorescência indireta (IFI). Métodos comerciais para detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii* geralmente tem um ponto de corte baixo, como o utilizado na nossa análise (positivo a partir de 1,0), assim como o ensaio fluorimétrico ELFA (método VIDAS, BioMérieux AS, Lyon, França, positivo acima de 0,65) (Pujol-Riqué et al., 2000). Desta forma, o exame pode detectar pacientes com sorologia falsamente positiva (Flori et al., 2009). Nossos resultados para detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii* pelo FLISAm foram mais específicos do que os resultados obtidos pelo método comercial Elecsys, quando comparados com o método confirmatório de imunofluorescência indireta (IFI).

Estudos anteriores de prevalência da toxoplasmose relatam índices elevados, de até 70% de indivíduos adultos acometidos (Parasitic infections, 2004). No Brasil, como em São Paulo, a toxoplasmose atingiu até 68% da população, no Rio de Janeiro, 79% (Amendoeira et al, 1999) e em Recife, variou de 64 a 79% (Coelho et al, 2003). Diante desses resultados, nota-se que os dados obtidos na análise da prevalência sorológica nos universitários de Assis-SP (cerca de 15% de positividade) e em outro estudo recente realizado pelo nosso grupo de prevalência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em amostras de saliva de estudantes (19% de positividade) (Sampaio et al., 2013), demonstram menor frequência quando comparados à média dos resultados em várias regiões do Brasil, e corrobora com outros estudos recentes de prevalência da toxoplasmose em universitários, como um estudo em São Paulo, com soropositividade de 12,5% (Yamamoto et al., 2009) e em Campo Grande-MS, com 30% de prevalência (Figueiredo et al., 2010).

Varios fatores podem influenciar na baixa frequência de positividade da toxoplasmose em jovens universitários, como por exemplo, o conhecimento sobre a prevenção da doença (Figueiredo et al., 2010), o status socioeconômico e condições de saneamento básico (Yamamoto et al., 2009). A partir desses resultados, que relatam a redução da prevalência da toxoplasmose nos jovens em diferentes estudos, permite-se afirmar que cerca de 80% desses jovens são susceptíveis ao contato com o *T.gondii*, o que aumenta consideravelmente o risco de mulheres em idade fértil adquirirem a infecção durante a gestação. Além disso, a avaliação soropidemiológica das gestantes de Cascavel-PR, em um estudo anterior realizado pelo nosso grupo, vem confirmar a importância da utilização de métodos rápidos, simples e eficientes para o diagnóstico pré-natal. Nessas gestantes, o risco de toxoplasmose aguda durante a gestação foi de 2,5% ao ano (Mioranza et al., 2008), o que corrobora com outro trabalho recente, em São José do Rio Preto, em que 2% das gestantes estavam sob risco de transmissão da

toxoplasmose no período gestacional (Mattos et al., 2011). Outro trabalho, realizado no Mato Grosso do Sul, relata ainda um risco maior, de 4% de infecção congênita (Souza-Júnior et al., 2010).

O diagnóstico de fase aguda da toxoplasmose em gestantes é muito importante para identificar o risco de acometimento fetal (Hoekstra et al., 2011, Varella et al., 2009). A detecção do anticorpo específico para toxoplasmose da classe IgM é inicialmente utilizado para o diagnóstico de infecção aguda nos laboratórios de rotina. Diversos autores relatam que apenas um resultado de IgM positivo não define um diagnóstico de infecção adquirida durante a gestação, pois em alguns casos, a quantidade de anticorpos IgM produzidos no início da infecção permanece com níveis detectáveis por um longo período (Bertozzi et al., 1999, Liesenfeld et al., 1996, Suzuki et al., 2001). Além disso, como demonstram nossos resultados de validação, métodos automáticos comerciais para triagem, muitas vezes, apresentam um ponto de corte baixo, possibilitando resultados falso-positivos. Por isso, existe a necessidade de se utilizarem outros métodos para o diagnóstico sorológico da infecção aguda, como o pareamento de sorologias de IgM e IgG e o teste de avididade de IgG no início da gestação, que são os métodos mais utilizados em laboratórios clínicos, para confirmação de infecção aguda em gestantes (Canales et al., 2010, Deshpande et al., 2013, Elyasi et al., 2010, Kasper et al., 2009, Pour et al., 2011).

Além desses métodos, estudos recentes têm avaliado a detecção de IgA e IgE anti-*T. gondii*, utilizando antígenos recombinantes em ELISA reverso, Kits comerciais de ELISA ou pelo método fluorimétrico FEIA, demonstrando abordagens adicionais eficientes para reforçar a sorologia convencional na identificação da fase aguda da toxoplasmose (Carvalho et al., 2008, Kodym et al., 2007, Sorensen et al., 2002). Diante disso, o teste imunofluorescente multiplex de fase sólida (FLISAm) pode ser utilizado para esta finalidade, com detecção simultânea de

imunoglobulinas IgG, IgM, IgE e IgA anti-*T. gondii*, como um diagnóstico mais rápido e com melhor custo-benefício, favorecendo uma avaliação mais precisa da toxoplasmose na triagem de gestantes. Esse método de detecção simultânea em fase sólida também pode ser aprimorado para detectar outras doenças importantes no diagnóstico de gestantes, como algumas das doenças do complexo TORCH (toxoplasmose, HIV, HBV, sífilis, rubéola, citomegalovírus e herpes simples), permitindo a detecção de várias classes de anticorpos simultaneamente, facilitando o monitoramento dessas doenças, que necessitam de resultados imediatos, melhorando assim a qualidade do atendimento ao paciente.

No setor de imunologia da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, são realizados mais de 100 diagnósticos para toxoplasmose por mês, e dentre esses, a maior proporção são para acompanhamento de gestantes. Em casos de confirmação do diagnóstico de infecção aguda, os resultados podem demorar até uma semana para serem realizados. Além disso, no acompanhamento dos exames laboratoriais convencionais pode ocorrer retardo da informação obtida no período entre a soroconversão laboratorial e a próxima consulta clínica de até dois meses de intervalo entre o diagnóstico de fato, na época da coleta e a intervenção na época da consulta (Natália Zaidan Maluf, DLC HCFMUSP, comunicação pessoal). Assim, um diagnóstico multiplex em microplacas de 384 ou 1.536 poços, poderia em um único procedimento de análise, realizar a identificação de até 150 amostras com 10 antígenos diferentes, detectando várias classes de anticorpos no mesmo poço, o que diminui o custo das análises em relação a reagentes e microplacas, que são usados nos métodos convencionais e ainda utilizando menores quantidades de amostras.

Métodos multiplex comerciais utilizando detecções fluorescentes em arranjos líquidos tem sido muito utilizados, como o CBA (*Citometric Bead Array*) ou

o Bio-Plex®, xMAP Luminex (Bongoni et al., 2013, Griffin et al., 2010, Linares et al., 2013, Navidad et al., 2013, Wyns et al., 2013). Essas técnicas envolvem conjuntos de micropartículas conjugadas com diferentes fluorocromos, permitindo alto rendimento de análises simultâneas de antígenos ou anticorpos (Anderson et al., 2011, Elshal et al., 2006, Hansenová et al., 2013). Porém, são métodos de custo elevado, que necessitam de tecnologias mais sofisticadas, como citômetro de fluxo. Já o ensaio imunofluorescente multiplex de fase sólida desenvolvido nesse trabalho, além de ser eficiente e apresentar um alto rendimento é um método econômico e simples para uso em laboratórios de análise.

A fluorimetria de fase sólida é uma tecnologia promissora no diagnóstico sorológico de patógenos, pela versatilidade de reagentes fluorescentes, que permitem identificar múltiplos analitos. Nesse trabalho, com o desenvolvimento do ensaio imunofluorescente multiplex de fase sólida para detecção conjunta de IgG e IgM anti-*T. gondii*, mostramos que é possível a realização de uma metodologia multiplex simples, econômica e eficiente para o diagnóstico da toxoplasmose humana. A sorologia com detecção simultânea em microplacas é uma abordagem inicial, que pode ser aprimorada para a detecção além de variedades de anticorpos, também de múltiplos antígenos. E com isso, em um futuro próximo, poderá ser uma ferramenta essencial para o desenvolvimento de ensaios rápidos e de alto rendimento, permitindo o manejo imediato e seguro dos pacientes.

7 CONCLUSÕES

7.1 Geral

Foi desenvolvido um ensaio imunofluorescente multiplex (FLISAm) de alta equivalência, capacidade de alto rendimento e baixo custo que pode ser utilizado como método de detecção sorológica de IgG e IgM para diagnóstico da toxoplasmose humana.

7.2 Específicas

- ✓ Foi possível padronizar condições ótimas de uso de reagentes para a detecção sorológica por imunofluorescência de fase sólida para IgG e IgM específica contra *T.gondii*;
- ✓ Foi possível construir conjugado fluoresceína anti-IgG humano e rodamina anti-IgM humano de alta eficiência para a detecção por imunofluorescência de fase sólida;
- ✓ Houve concordância entre o ensaio imunoenzimático específico para IgG e IgM anti-*T.gondii* e o ensaio de imunofluorescência de fase sólida (FLISA isolado) para IgG e IgM;
- ✓ Foi possível construir um ensaio multiplex de fluorescência de fase sólida para detecção conjunta de IgG e IgM anti-*T.gondii*, com eficiência e reprodutibilidade semelhante aos ensaios isolados;
- ✓ Utilizando amostras validadas, o ensaio multiplex foi equivalente aos ensaios comerciais de uso em laboratórios de referência.

REFERÊNCIAS

Ajzenberg D, Cogne N, Paris L, Bessieres MH, Thulliez P, Filisetti D, et al. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis and correlation with clinical findings. J Infect Dis. 2002;186:684-9.

Ambroise-Thomas P, Schweitzer M, Pinon JM, Thiebaugeorges O. La Prevention de la toxoplasmose congénitale en France: valuation des risques. Résultats et perspectives du dépistage antenatal et suivi du nouveau-né. Bull Acad Nat Med. 2001;185:665-688.

Amendoeira MRR, Costa T, Spalding SM. *Toxoplasma gondii* Nicolle & Manceaux, 1909 (Apicomplexa: Sarcocystidae) e a Toxoplasmose. Rev Souza Marques. 1999;1:15-29.

Amorim Garcia CA, Oréface F, de Oliveira Lyra C, Gomes AB, França M, de Amorim Garcia Filho CA. Socioeconomic conditions as determining factors in the prevalence of systemic and ocular toxoplasmosis in Northeastern Brazil. Ophthalmic Epidemiol. 2004;11:301-17.

Anderson S, Wakeley P, Wibberley G, Webster K, Sawyer J. Development and evaluation of a Luminex multiplex serology assay to detect antibodies to bovine herpes virus 1, parainfluenza 3 virus, bovine viral diarrhoea virus, and bovine respiratory syncytial virus, with comparison to existing ELISA detection methods. J Immunol Methods. 2011;366:79-88.

Andrew SM, Titus JA. Purification of immunoglobulin G. Curr Protoc Immunol. 2001;2:2-7.

Aramini JJ, Stephen C, Dubey JP, Engelstoft C, Schwantje H, Ribble CS. Potential contamination of drinking water with *Toxoplasma gondii* oocysts. Epidemiol Infect. 1999;122:305-15.

Araújo PR, Ferreira AW. High diagnostic efficiency of IgM-ELISA with the use of multiple antigen peptides (MAP1) from *T. gondii* ESA (SAG-1, GRA-1 and GRA-7), in acute toxoplasmosis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2010;52:63-8.

Aslan K, Geddes CD. Microwave-accelerated metal-enhanced fluorescence (MAMEF): application to ultra fast and sensitive clinical assays. J Fluoresc. 2006;16:3-8.

Ayyar BV, Arora S, Murphy C, O'Kennedy R. Affinity chromatography as a tool for antibody purification. *Methods*. 2012;56:116-29.

Bachmann S, Schröder J, Bottmer C, Torrey EF, Yolken RH. Psychopathology in first-episode schizophrenia and antibodies to *Toxoplasma gondii*. *Psychopathology*. 2005;38:87-90.

Bahia-Oliveira LMG, Jones JL, Azevedo-Silva J, Alves CCF, Orefice F, Addiss DG. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state. *Brazil Emerg Infect Dis*. 2003;9:55–62.

Bertozi L.C., Suzuki, L.A., Rossi C.L. Serological diagnosis of toxoplasmosis: usefulness of IgA detection and IgG avidity determination in a patient with a persistent IgM antibody response to *Toxoplasma gondii* *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1999;41:175.

Bichara CN, Canto GA, Tostes Cde L, Freitas JJ, Carmo EL, Póvoa MM, Silveira Eda C. Incidence of congenital toxoplasmosis in the City of Belém, State of Pará, Northern Brazil, determined by a neonatal screening program: preliminary results. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012;45:122-4.

Black MW, Boothroyd, JC. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000;64:607-23.

Boothroyd JC, Dubremetz JF. Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma gondii*. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6:79-88.

Bochkova MS, Timganova VP, Raev MB. Solution of the problem of nonspecific binding in solid-phase noninstrumental dot immunoassay. *Dokl Biochem Biophys*. 2013;449:63-5.

Bóia MN, Carvalho-Costa FA, Sodré FC, Pinto GM, Amendoeira MR. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among indian people living in Iauareté, São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2008;50:17-20.

Bongoni AK, Lanz J, Rieben R, Banz Y. Development of a bead-based multiplex assay for the simultaneous detection of porcine inflammation markers using xMAP technology. *Cytometry A*. 2013;83:636-47.

Bhopale GM. Development of a vaccine for toxoplasmosis: current status. *Microbes Infect*. 2003;5:457-462.

Bortoletti Filho J, Araujo Júnior E, Carvalho ND, Helfer TM, Nogueira Serni PD, Nardozza LM, Moron AF. The Importance of IgG Avidity and the Polymerase Chain Reaction in Treating Toxoplasmosis during Pregnancy: Current Knowledge. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2013;20:370-769.

Boschetti E. Antibody separation by hydrophobic charge induction chromatography. *Trends Biotechnol*. 2002;20:333-7.

Bozdech V, Jira J. Latex agglutination test with *Toxoplasma* antigen. Preliminary report. *Dtsch Gesundheitsw*. 1961;21:2398-400.

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;7:248-254.

Brinkley M. A brief survey of methods for preparing protein conjugates with dyes, haptens, and cross-linking reagents. *Bioconjug Chem*. 1992;3:2-13.

Burnouf T, Radosevich M. Affinity chromatography in the industrial purification of plasma proteins for therapeutic use. *J Biochem Biophys Methods*. 2001;49:575-86.

Camargo ME, Ferreira AW, Mineo JR, Takiguti CK, Nakahara OS. Immunoglobulin G and immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays and defined toxoplasmosis serological patterns. *Infect Immun*. 1978;21:55-58.

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;18:227-38.

Camargo ME, Silva SM, Leser PG, Granato CH. Avidéz de anticorpos IgG específicos como maçadores de infecção primária recente pelo *T. gondii*. *Rev Int Med Trop Sao Paulo*. 1991;33:213-8.

Canales RM, Navia GF, Torres HM, Concha CM, Guzmán DAM, Pérez CC, et al. Evaluation of an IgG avidity commercial test: contribution to diagnosis of primary infection caused by *Toxoplasma gondii*. *Rev Chilena Infectol*. 2010;27:499-504.

Carellos EV, Andrade GM, Aguiar RA. Evaluation of prenatal screening for toxoplasmosis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil: a cross-sectional study

of postpartum women in two maternity hospitals. *Cad Saude Publica*. 2008;24:391-401.

Carruthers VB, Giddings OK, Sibley LD. Secretion of 31 micronemal proteins is associated with *Toxoplasma* invasion of host cells. *Cell Microbiol*. 1999;1:225-35.

Carvalho FR, Silva DA, Cunha-Júnior JP, Souza MA, Oliveira TC, Béla SR, et al. Reverse enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies against SAG1-related sequence, SAG2A, and p97 antigens from *Toxoplasma gondii* to detect specific immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgA antibodies in human sera. *Clin Vaccine Immunol*. 2008;15:1265-71.

Chang GN, Nemzek JA, Tjostem JL, Gabrielson DA. Simple hemagglutination inhibition test for the diagnosis of toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*. 1985;21:180-3.

Chattopadhyay PK, Gaylord B, Palmer A, Jiang N, Raven MA, Lewis G, et al. Brilliant violet fluorophores: a new class of ultrabright fluorescent compounds for immunofluorescence experiments. *Cytometry A*. 2012;81:456-66.

Christopher-Hennings J, Araujo KP, Souza CJ, Fang Y, Lawson S, Nelson EA, et al. Opportunities for bead-based multiplex assays in veterinary diagnostic laboratories. *J Vet Diagn Invest*. 2013;25:671-91.

Coelho R AI, Kobayashi M, Carvalho LB. Prevalence of IgG antibodies specific to *Toxoplasma gondii* among blood donors in Recife. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2003;45:229-31.

Commodaro AG, Belfort RN, Rizzo LV, Muccioli C, Silveira C, Burnier Jr MN, Belfort Jr R. Ocular toxoplasmosis: an update and review of the literature. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104:345-50.

Correia CC, Melo HR, Costa VM. Influence of neurotoxoplasmosis characteristics on real-time PCR sensitivity among AIDS patients in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2010;104:24-8.

Cox FEG. History of human parasitology. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15:595-612.

Dattoli VC, Veiga RV, Cunha SS, Pontes-de-Carvalho L, Barreto ML, Alcantara-Neves NM. Oocyst ingestion as an important transmission route of *Toxoplasma gondii* in Brazilian urban children. *J Parasitol*. 2011;97:1080-4.

Derouin F. Parasitic infection in immunocompromised patients. *Rev Prat.* 2007;57:167-73.

Derouin F, Pelloux H. ESCMID Study Group on Clinical Parasitology. Prevention of toxoplasmosis in transplant patients. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14:1089-101.

Deshpande PS, Kotresha D, Noordin R, Yunus MH, Saadatnia G, Golkar M, et al. IgG avidity Western blot using *Toxoplasma gondii* rGRA-7 cloned from nucleotides 39-711 for serodiagnosis of acute toxoplasmosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2013;55:79-83.

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

Diza, E, Frantzidou, F, Souliou, E, Arvanitidou, M, Gioula, G, Antoniadis, A. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in northern Greece during the last 20 years. *Clin Microbiol Infect.* 2005;11:719-723.

Doğan K, Kafkaslı A, Karaman U, Atambay M, Karaoğlu L, Colak C. The rates of seropositivity and seroconversion of toxoplasma infection in pregnant women. *Mikrobiyol Bul.* 2012;46:290-4.

Doudou Y, Renaud P, Coralie L, Jacqueline F, Hypolite S, Hypolite M, et al. Toxoplasmosis among pregnant women: High seroprevalence and risk factors in Kinshasa, Democratic Republic of Congo. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2014;4:69-74.

Dubey JP. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* 1998;28:1019-24.

Dubey, JP. Toxoplasmosis: an overview. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1991;22:588-92.

Dubey JP. Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. *Vet Parasitol.* 2004;126:57-72.

Dubey JP. The history of *Toxoplasma gondii*--the first 100 years. *J Eukaryot Microbiol.* 2008;55:467-75.

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;139:1375-424.

Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clin Microbiol Rev. 1998;11:267-99.

Dzitko K, Staczek P, Gatkowska J, Długońska H. *Toxoplasma gondii*: serological recognition of reinfection. Exp Parasitol. 2006;112:134.

Ekman CC, Chiossi MF, Meireles LR, Andrade Júnior HF, Figueiredo WM, Marciano MA, et al. Case-control study of an outbreak of acute toxoplasmosis in a industrial plant in the state of São Paulo, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2012;54:239-44.

Elmore SA, Jenkins EJ, Huyvaert KP, Polley L, Root JJ, Moore CG. *Toxoplasma gondii* in circumpolar people and wildlife. Vector Borne Zoonotic Dis. 2012;12:1-9.

Elyasi H, Babaie J, Fricker-Hidalgo H, Brenier-Pinchart MP, Zare M, Sadeghiani G, et al. Use of dense granule antigen GRA6 in an immunoglobulin G avidity test to exclude acute *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. Clin Vaccine Immunol. 2010;17:1349-55.

Elshal MF, McCoy JP. Multiplex bead array assays: performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA. Methods. 2006;38:317-23.

Emelia O, Amal RN, Ruzanna ZZ, Shahida H, Azzubair Z, Tan KS, et al. Seroprevalence of anti-*Toxoplasma gondii* IgG antibody in patients with schizophrenia. Trop Biomed. 2012;29:151-9.

Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa. 3. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti immunoglobulin in antigen-coated tubes. J Immunol. 1972;109:129-35.

Ermak TN, Peregodova AB, Shakhgil'dian VI, Goncharov DB. Cerebral toxoplasmosis in the pattern of secondary CNS involvements in HIV-infected patients in the Russian federation: clinical and diagnostic features. Med Parazitol (Mosk). 2013;1:3-7.

Flatt A, Shetty N. Seroprevalence and risk factors for toxoplasmosis among antenatal women in London: a re-examination of risk in an ethnically diverse population. Eur J Public Health. 2013;23:648-52.

Flegr J, Kodym P, Tolarová V. Correlation of duration of latent *Toxoplasma gondii* infection with personality changes in women. Biol Psychol. 2000;53:57-68.

Figueiredo, H.R.; Favero, S.; Amendoeira, R.M.M.; Cardozo, C. Seroepidemiological survey of toxoplasmosis and evaluation of the conditioning factors for its transmission in undergraduate students from Campo Grande, Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Scientia Medica*. 2010;20:71-75.

Flori P, Chene G, Varlet MN, Sung RT. *Toxoplasma gondii* serology in pregnant woman: characteristics and pitfalls. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2009;67:125-33.

Frenkel JK. Toxoplasmose: Doenças infecciosas e parasitárias. 8^a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1991;734-749.

Fu N, Xiong Y, Squier TC. Synthesis of a targeted biarsenical Cy3-Cy5 affinity probe for super-resolution fluorescence imaging. *J Am Chem Soc*. 2012;134:18530-3.

Gagnon P. Technology trends in antibody purification. *J Chromatogr A*. 2012;1221:57-70.

Gao XJ, Zhao ZJ, He ZH, Wang T, Yang TB, Chen XG, et al. *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women in China. *Parasitology*. 2012;139:139-47.

Garcia JL, Navarro IT, Ogawa L, de Oliveira RC, de Faria Garcia SM, Leite J. Seroepidemiology of toxoplasmosis and ocular evaluation by Amsler grid in patients from the rural area treated at the Jaguapitã county health center, Paraná State, Brazil]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1999;32:671-6.

Gatkowska J, Gasior A, Kur J, Dlugonska H. *Toxoplasma gondii*: Chimeric Dr fimbriae as a recombinant vaccine against toxoplasmosis. *Exp Parasitol*. 2008;118: 266–270.

Gautam S, Loh KC. Immobilization of hydrophobic peptidic ligands to hydrophilic chromatographic matrix: a preconcentration approach. *Anal Biochem*. 2012;423:202-9.

Geysen HM, Barteling SJ, Meloen RH. Small peptides induce antibodies with a sequence and structural requirement for binding antigen comparable to antibodies raised against the native protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82:178-82.

Golkar, M.A. Shokrgozar, S. Rafati, K. Musset, M. Assmar, R. Sadaie, et al. Evaluation of protective effect of recombinant dense granule antigens GRA2 and GRA6 formulated in monophosphoryl lipid A (MPL) adjuvant against *Toxoplasma* chronic infection in mice. *Vaccine*. 2007;25:4301–4311.

Gross U, Holpert M, Goebel S. Impact of stage differentiation on diagnosis of toxoplasmosis. *Ann Ist Super Sanita*. 2004;40:65-70.

Groot-Mijnes JD, van der Most RG, van Dun JM, te Lintelo EG, Schuurman NM, Egberink HF, de Groot RJ. Three-color flow cytometry detection of virus-specific CD4+ and CD8+ T cells in the cat. *J Immunol Methods*. 2004;285:41-54.

Guo, X., Bandyopadhyay, P., Schilling, B., Young, M.M., Fujii, N., Aynechi, T., Guy, R.K., Kuntz, I.D., Gibson, B.W.. Partial acetylation of lysine residues improves intraprotein cross-linking. *Analy Chem*. 2008;80:951-60.

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;364:83-93.

Hamdani N, Daban-Huard C, Lajnef M, Richard JR, Delavest M, Godin O, et al. Relationship between *Toxoplasma gondii* infection and bipolar disorder in a French sample. *J Affect Disord*. 2013;148:444-8.

Hansenová Maňásková S, Bikker FJ, Veerman EC, van Belkum A, van Wamel WJ. Rapid detection and semi-quantification of IgG-accessible *Staphylococcus aureus* surface-associated antigens using a multiplex competitive Luminex assay. *J Immunol Methods*. 2013;397:18-27.

Havlíček J, Gasová ZG, Smith AP, Zvára K, Flegr J. Decrease of psychomotor performance in subjects with latent 'asymptomatic' toxoplasmosis. *Parasitol*. 2001;122:515-20.

Hemmilä I. Fluoroimmunoassays and immunofluorometric assays. *Clin Chem*. 1985;31:359-70.

Heukelbach, J, Meyer-Cirkel, V, Moura, RCS, Gomide, M, Queiroz, JAN, Saweljew, P, et al. Waterborne toxoplasmosis, Northeastern Brazil. *Emerg. Infect. Dis*. 2007;13:287-289.

Hermanson GT. Bioconjugate techniques. San Diego: Academic Press:1996.

Hill DE, Chirukandoth S, Dubey JP. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Anim Health Res Rev*. 2005;6:41-61.

Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect*. 2002;8:634-40.

Holec-Gasior L, Kur J. *Toxoplasma gondii*: Recombinant GRA5 antigen for detection of immunoglobulin G antibodies using enzyme-linked immunosorbent assay. *Exp Parasitol*. 2010;124:272-8.

Hoekstra F, Buzing C, Sporken JM, Erasmus CE, van der Flier M, Semmekrot BA. Congenital toxoplasmosis: severe ocular and neurological complications. *Ned Tijdschr Geneesk*. 2011;155:2853.

Holland GN. Ocular toxoplasmosis: the influence of patient age. *Mem Int Oswaldo Cruz*. 2009;104:351-7.

Huber D, Rudolf J, Ansari P, Galler B, Führer M, Hasenhindl C, Baumgartner S. Effectiveness of natural and synthetic blocking reagents and their application for detecting food allergens in enzyme-linked immunosorbent assays. *Anal Bioanal Chem*. 2009;394:539-48.

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;32:9011-20.

Igarashi M, Kano F, Tamekuni K, Machado RZ, Nawarro IT, Vidotto O, et al. *Toxoplasma gondii*: evaluation of an intranasal vaccine using recombinant proteins against brain cyst formation in BALB/c mice. *Exp Parasitol*. 2008;118:386-92.

Jacobs L, Lunde MN. Hemagglutination test for toxoplasmosis. *Science*. 1957;125:1035.

Jafari R, Sadaghian M, Safari M. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* Infection and Related Risk Factors in Tabriz City, Iran, 2008. *J Res Health Sci*. 2012;12:119-21.

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;49:878-884.

Jones JL, Dubey JP. Waterborne toxoplasmosis--recent developments. *Exp Parasitol*. 2010;124:10-25.

Jones JL, Dubey JP. Foodborne toxoplasmosis. *Clin Infect Dis*. 2012;55:845-51.

Jones, JL, Kruszon-Moran, D, Sanders-Lewis, K, Wilson, M, *Toxoplasma gondii* infection in the United States, 1999–2004, decline from the prior decade. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;77:405–410.

Jongert E, Verhelst D, Abady M, Petersen E, Gargano N. Protective Th1 immune responses against chronic toxoplasmosis induced by a protein–protein vaccine combination but not by its DNA–protein counterpart. *Vaccine.* 2008;26:5289–5295.

Kalkhof S, Sinz A. Chances and pitfalls of chemical cross-linking with amine-reactive N-hydroxysuccinimide esters. *Anal and Bioanal Chem.* 2008;392:305-12.

Kamath YS, Rathinam SR, Kawali A. Ocular toxoplasmosis associated with scleritis. *Ind J Ophthal.* 2013;61:295-7.

Karoonuthaisiri N, Charlermroj R, Uawisetwathana U, Luxananil P, Kirtikara K, Gajanandana O. Development of antibody array for simultaneous detection of foodborne pathogens. *Biosens Bioelectron.* 2009;24:1641-8.

Kasper DC, Prusa AR, Hayde M, Gerstl N, Pollak A, Herkner KR, et al. Evaluation of the Vitros ECiQ immunodiagnostic system for detection of anti-*Toxoplasma* immunoglobulin G and immunoglobulin M antibodies for confirmatory testing for acute *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women. *J Clin Microbiol.* 2009;47:164-7.

Kellen AE, Allyon-Leindle L, Labzoffsky MA. Indirect fluorescent antibody method in serodiagnosis of toxoplasmosis. *Can J Microbiol.* 1962;8:545-54.

Kent UM. Purification of antibodies using ion-exchange chromatography. *Methods Biol.* 1999;115:19-22.

Khan SS, Smith MS, Reda D, Suffredini AF, McCoy JP Jr. Multiplex bead array assays for detection of soluble cytokines: comparisons of sensitivity and quantitative values among kits from multiple manufacturers. *Cytometry B Clin Cytom.* 2005;64:53.

Kijlstra A, Jongert E. Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat. *Int J Parasitol.* 2008;38:1359-70.

Kistiah K, Frean J, Winiecka-Krusnell J, Barragan A. Unexpectedly low seroprevalence of toxoplasmosis in South Africa. *Onderstepoort J Vet Res.* 2012;79:E1.

Kniel KE, Lindsay DS, Sumner SS, Hackney CR, Pierson MD, Dubey JP. Examination of attachment and survival of *Toxoplasma gondii* oocysts on raspberries and blueberries. J Parasitol. 2002;88:790-3.

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

Kong JT, Grigg ME, Uyetake L, Parmley S, Boothroyd JC. Serotyping of *Toxoplasma gondii* infections in humans using synthetic peptides. J Infect Dis. 2003;187:1484-95.

Kunita S, Kato K, Ishida M, Hagiwara K, Kameda S, Ishida T, et al. Simultaneous detection of antibodies to mouse hepatitis virus recombinant structural proteins by a microsphere-based multiplex fluorescence immunoassay. Clin Vaccine Immunol. 2011;18:758-66.

Lamichhane G, Shah DN, Sharma S, Chaudhary M. Ocular manifestations in HIV/AIDS cases in Nepal. Nepal J Ophthalmol. 2010;2:45-50.

Lappin MR, Powell CC. Comparison of latex agglutination, indirect hemagglutination, and ELISA techniques for the detection of *Toxoplasma gondii*-specific antibodies in the serum of cats. J Vet Intern Med. 1991;5:299-301.

Le T, Yan P, Liu J, Wei S. Simultaneous detection of sulfamethazine and sulfaquinoxaline using a dual-label time-resolved fluorescence immunoassay. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 2013;30:1264-9.

Lew AM. The effect of epitope density and antibody affinity on the ELISA as analysed by monoclonal antibodies. J Immunol Methods. 1984;72:171-6.

Liesenfeld O, Press C, Flanders R, Ramirez R, Remington JS. Study of Abbott Toxo IMx system for detection of immunoglobulin G and immunoglobulin M *Toxoplasma* antibodies: value of confirmatory testing for diagnosis of acute toxoplasmosis. J Clin Microbiol. 1996;34:2526-30.

Lin YL, Liao YS, Liao LR, Chen FN, Kuo HM, He S. Seroprevalence and sources of *Toxoplasma* infection among indigenous and immigrant pregnant women in Taiwan. Parasitol Res. 2008;8:4-8.

Linares EM, Pannuti CS, Kubota LT, Thalhammer S. Immunospot assay based on fluorescent nanoparticles for Dengue fever detection. *Biosens Bioelectron.* 2013;41:180-5.

Liu S, Boyer-Chatenet L, Lu H, Jiang S. Rapid and automated fluorescence-linked immunosorbent assay for high-throughput screening of HIV-1 fusion inhibitors targeting gp41. *J Biomol Screen.* 2003;8:685-93.

Lovett JL, Marchesini N, Moreno SN, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* microneme secretion involves intracellular Ca(2+) release from inositol 1,4,5-triphosphate (IP(3))/ryanodine-sensitive stores. *J Biol Chem.* 2002;277:25870-6.

Ma GY, Zhang JZ, Yin GR, Zhang JH, Meng XL, Zhao F. *Toxoplasma gondii*: proteomic analysis of antigenicity of soluble tachyzoite antigen. *Exp Parasitol.* 2009;122:41-6.

Mädler S, Bich C, Touboul D, Zenobi R. Chemical cross-linking with NHS esters: a systematic study on amino acid reactivities. *J Mass Spectrom.* 2009;44:694-706.

Martin V, Supanitsky A, Echeverria PC, Litwin S, Tanos T, Roodt AR, et al. Recombinant GRA4 or ROP2 protein combined with alum or the gra4 gene provides partial protection in chronic murine models of toxoplasmosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2004;11: 704–710.

Mattos Cde C, Spegiorin LC, Meira Cda S, Silva Tda C, Ferreira AI, Nakashima F, et al. Anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in pregnant women and their newborn infants in the region of São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil. *Sao Paulo Med J.* 2011;129:261-6.

Matsukuma E, Kato Z, Omoya K, Hashimoto K, Li A, Yamamoto Y, et al. Development of fluorescence-linked immunosorbent assay for high throughput screening of interferon-gamma. *Allergol Int.* 2006;55:49-54.

McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG. Antigen-specific memory B cell development. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:487-513.

Meira CS, Vidal JE, Costa-Silva TA, Frazatti-Gallina N, Pereira-Chioccia VL. Immunodiagnosis in cerebrospinal fluid of cerebral toxoplasmosis and HIV-infected patients using *Toxoplasma gondii* excreted/secreted antigens. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;71:279-85.

Melamed J, Eckert GU, Spadoni VS, Lago EG, Uberti F. Ocular manifestations of congenital toxoplasmosis. *Eye (Lond).* 2010;24:528-34.

Menotti J, Vilela G, Romand S, Garin YJ, Ades L, Gluckman E, et al. Comparison of PCR-enzyme-linked immunosorbent assay and real-time PCR assay for diagnosis of an unusual case of cerebral toxoplasmosis in a stem cell transplant recipient. *J Clin Microbiol*. 2003;41:5313-6.

Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet*. 2004;363:1965-76.

Mikhail MA, Varikkara M. The absence of vitreous inflammation: one more challenge in diagnosing toxoplasma papillitis. *BMJ Case Rep*. 2013.

Mioranza Sde L, Meireles LR, Mioranza EL, Andrade Júnior HF. Serological evidence of acute *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women in Cascavel, Paraná]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008;41:628-34.

Mohammad K, Esen A. A blocking agent and a blocking step are not needed in ELISA, immunostaining dot-blot and western blots. *J Immunol Methods*. 1989;117:141-5.

Moirachi Ruggenini A, Sacco TF, Nani E. Serological diagnosis of toxoplasmosis: comparative evaluation of the Sabin-Feldman, indirect immunofluorescence and complement fixation tests. *G Bacteriol Virol Immunol*. 1976;69:280-8.

Navidad JF, Griswold DJ, Gradus MS, Bhattacharyya S. Evaluation of Luminex xTAG gastrointestinal pathogen analyte-specific reagents for high-throughput, simultaneous detection of bacteria, viruses, and parasites of clinical and public health importance. *J Clin Microbiol*. 2013;51:3018-24.

Nicolle C, Manceaux L. Sur une infection a corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *C R Hebd Séances Acad Sci*. 1908;147:763-6.

Oliveira-Bahia LMG, Abreu AMW, Azevedo-Silva JOR, Fice F. Toxoplasmosis in southeastern Brazil: an alarming situation of highly endemic acquired and congenital infection. In *J Parasitol*. 2001;31:115-144.

Onakoya AO, Odeyemi MG, Aribaba OT, Akinsola FB. Ocular findings in acquired immunodeficiency syndrome patients in Lagos, Nigeria. *Nig Q J Hosp Med*. 2012;22:52-7.

Parasitic infections. *Am J Transplant*. 2004; 4 Suppl 10:142-55.

Parmley SF, Weiss LM, Yang S. Cloning of a bradyzoite-specific gene of *Toxoplasma gondii* encoding a cytoplasmic antigen. *Mol Biochem Parasitol*. 1995;73:253–57.

Passos LN, Araújo Filho OF, Andrade Junior HF. Toxoplasma encephalitis in AIDS patients in São Paulo during 1988 and 1991. A comparative retrospective analysis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2000;42:141-5.

Petersen E. Toxoplasmosis. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2007;12:214-23

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

Porter SB, Sande MA. Toxoplasmosis of the Central Nervous System in the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *N Engl J Med*. 1992;327:1643-8.

Pour AS, 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;8:251-5.

Powell RL, Ouellette I, Lindsay RW, Parks CL, King CR, McDermott AB. Multiplex Microsphere-Based Immunoassay Increases the Sensitivity of SIV-Specific Antibody Detection in Serum Samples and Mucosal Specimens Collected from Rhesus Macaques Infected with SIVmac239. *Biores Open Access*. 2013;2:171-8.

Pujol-Riqué M, Quintó L, Danés C, Valls ME, Coll O, Moreno A, et al. Dating anti-*Toxoplasma* IgM in pregnancy using VIDAS-ELFA methods. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2000;18:274-8.

Pullen GR, Fitzgerald MG, Hosking CS. Antibody avidity determination by ELISA using thiocyanate elution. *J Immunol Methods*. 1986;86:83-7.

Qian J, Cole RB, Cai Y. Synthesis and characterization of a 'fluorous' (fluorinated alkyl) affinity reagent that labels primary amine groups in proteins/peptides. *J Mass Spectrom*. 2011;46:1-11.

Rajaii M, Pourhassan A, Asle-Rahnamaie-Akbari N, Aghebati L, Xie JL, Goldust M, et al. Seroepidemiology of toxoplasmosis in childbearing women of Northwest Iran. *Infez Med*. 2013;21:194-200.

Ravindran R, Khan IH, Krishnan VV, Ziman M, Kendall LV, Frasier JM, et al. Validation of multiplex microbead immunoassay for simultaneous serodetection of multiple infectious agents in laboratory mouse. *J Immunol Methods*. 2010;363:51-9.

Remington JS, McLeod R. Toxoplasmosis. In Remington JS, Klein JO, editors *Infant*. Philadelphia: Saunders, 2001;205-475.

Remington JS, McLeod R, Thulliez P, Desmonts G. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein JO, editors. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. 5th. ed. Philadelphia: Saunders. 2001:205-346.

Remington JS, Thulliez P, Montoya JG. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*. 2004;42:941-5.

Robert-Gangneux F, Dardé ML. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev*. 2012;25:264-96.

Robben J, Hertveldt K, Bosmans E, Volckaert G. Selection and identification of dense granule antigen GRA3 by *Toxoplasma gondii* whole genome phage display. *J Biol Chem*. 2002;277:17544-7.

Roizen N, Kaska K, Karrison T, Mets M, Noble AG, Boyer K, et al. Impact of visual impairment on measures of cognitive function for children with congenital toxoplasmosis: implications for compensatory intervention strategies. *Pediatrics*. 2006;118:379-90.

Sabin AB, Feldman HA. Dyes as a microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (*Toxoplasma*). *Science*. 1948;108:660-3.

Sáfadi MA, Berezin EN, Farhat CK, Carvalho ES. Clinical presentation and follow up of children with congenital toxoplasmosis in Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2003;7:325-31.

Sakamoto S, Pongkitwitoon B, Sasaki-Tabata K, Putalun W, Maenaka K, Tanaka H, et al. A fluorescent single domain antibody against plumbagin expressed in silkworm larvae for fluorescence-linked immunosorbent assay (FLISA). *Analyst*. 2011a;136:2056-63.

Sakamoto S, Tanizaki Y, Pongkitwitoon B, Tanaka H, Morimoto S. A chimera of green fluorescent protein with single chain variable fragment antibody against ginsenosides for fluorescence-linked immunosorbent assay. *Protein Expr Purif*. 2011b;77:124-30.

Sakata FB, Bellato V, Sartor AA, de Moura AB, de Souza AP, Farias JA. *Toxoplasma gondii* antibodies sheep in Lages, Santa Catarina, Brazil, and comparison using IFA and ELISA. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2012;21:196-200.

Sampaio BF, Macre MS, Meireles LR, Andrade HF Jr. Saliva as a source of anti-*Toxoplasma gondii* IgG for enzyme immunoassay in human samples. *Clin Microbiol Infect.* 2013.

Santos TR, Costa AJ, Toniollo GH, Luvizotto MC, Benetti AH, Santos RR, et al. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in dairy cattle, dogs, and humans from the Jauru micro-region, Mato Grosso state, Brazil. *Vet Parasitol.* 2009;161:324-6.

Sellami H, Amri H, Cheikhrouhou F, Sellami A, Makni F, Trabelsi H, et al. Toxoplasmosis in Sfax, Tunisia. *Bull Soc Pathol Exot.* 2010;103:37-40.

Shan Y, Wang L, Shi Y, Zhang H, Li H, Liu H, et al. NHS-mediated QDs-peptide/protein conjugation and its application for cell labeling. *Talanta.* 2008;75:1008-14.

Sheng S, Kong F. Separation of antigens and antibodies by immunoaffinity chromatography. *Pharm Biol.* 2012;50:1038-44.

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 São Paulo.* 1908;3:109-12.

Sittampalam GS, Kahl SD, Janzen WP. High-throughput screening: advances in assay technologies. *Curr Opin Chem Biol.* 1997;1:384-91.

Sobral CA, Amendoeira MR, Teva A, Patel BN, Klein CH. Seroprevalence of infection with *Toxoplasma gondii* in indigenous Brazilian populations. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;72:37-41.

Sousa S, Ajzenberg D, Vilanova M, Costa J, Dardé ML. Use of GRA6-derived synthetic polymorphic peptides in an immunoenzymatic assay to serotype *Toxoplasma gondii* in human serum samples collected from three continents. *Clin Vaccine Immunol.* 2008;15:1380-6.

Sousa S, Ajzenberg D, Marle M, Aubert D, Villena I, da Costa JC, et al. Selection of polymorphic peptides from GRA6 and GRA7 sequences of *Toxoplasma gondii* strains to be used in serotyping. *Clin Vaccine Immunol.* 2009;16:1158-69.

Souza-Júnior VG, Figueiró-Filho, EA, Borges DC, Oliveira VM, Coelho LR. Toxoplasmosis and pregnancy: perinatal results and association of the IgG avidity test with congenital infection in pregnant women with positive anti-*Toxoplasma gondii* IgM. *Scientia Medic.* 2010;20:45-50.

Souza W, Martins-Duarte ES, Lembgruber L, Attias M, Vommaro RC. Structural organization of the tachyzoite of *Toxoplasma gondii*. *Scientia Medica* 2010;20:1-131-43.

Sorensen T, Spenter J, Jaliashvili I, Christiansen M, Nørgaard-Pedersen B, Petersen E. Automated time-resolved immunofluorometric assay for *Toxoplasma gondii*-specific IgM and IgA antibodies: study of more than 130,000 filter-paper blood-spot samples from newborns. *Clin Chem.* 2002;48:1981-6.

Steinitz M. Quantitation of the Blocking Effect of Tween 20 and Bovine Serum Albumin in ELISA Microwells. *Anal Biochem*, 2000;282:232-8.

Steward MW, Lew AM. The importance of antibody affinity in the performance of immunoassays for antibody. *J Immunol Methods.* 1985;78:173-90.

Stoevesandt O, Taussig MJ. Affinity proteomics: the role of specific binding reagents in human proteome analysis. *Expert Rev Proteomics.* 2012;9:401-14.

Sullivan WJ Jr, Jeffers V. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. *FEMS Microbiol Rev.* 2012;36:717-33.

Suzuki LA, Rocha RJ, Rossi CL. Evaluation of serological markers for the immunodiagnosis of acute acquired toxoplasmosis. *J Med Microbiol.* 2001;50:62-70.

Swai ES, Kaaya JE. A survey of *Toxoplasma gondii* antibodies by latex agglutination assay in dairy goats in Northern Tanzania. *Trop Anim Health Prod.* 2012;45:211-7.

Szénási Z, Nagy E, Ozsvár Z, Szabó J, Gellén J, Jeszenszky M, Végh M. Serodiagnosis of toxoplasmosis. *Orv Hetil.* 1997;138:3241-7.

Tenter A M, Heckeroth A R, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology.* 2000;30:1217– 58.

Torrey EF, Bartko JJ, Yolken RH. *Toxoplasma gondii* and other risk factors for schizophrenia: an update. *Schizophr Bull.* 2012;38:642-7.

Turner G K. Measurement of light from chemical or biochemical reactions. In: Van Dyke K, editors. Bioluminescence and Chemiluminescence: Instruments and Applications. Boca Raton: CRC Press. 1985;p. 45-7.

Vallochi AL, Nakamura MV, Schlesinger D, Martins MC, Silveira C, Belfort Júnior C. et al. Ocular toxoplasmosis: more than just what meets the eye. Scand J Immunol. 2002;55:324-8.

Varella IS, Canti IC, Santos BR, Coppini AZ, Argondizzo LC, Tonin C, et al. Prevalence of acute toxoplasmosis infection among 41,112 pregnant women and the mother-to-child transmission rate in a public hospital in South Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104:383-8.

Vasconcelos-Santos DV, Machado Azevedo DO, Campos WR, Oréfice F, Queiroz-Andrade GM, Carellos EV, et al. Congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil: results of early ophthalmologic examination of a large cohort of neonates. Ophthalmology. 2009;116:2199-205.

Velappan N, Clements J, Kiss C, Valero-Aracama R, Pavlik P, Bradbury AR. Fluorescence linked immunosorbant assays using microtiter plates. J Immunol Methods, 2008;336:135-41.

Velmurugan G V, Dubey J P, Su C. Genotyping studies of *Toxoplasma gondii* isolates from Africa revealed that the archetypal clonal lineages predominate as in North America and Europe. Vet. Parasitol. 2008;155:314–318.

Venkatesan P, Wakelin D. ELISAs for parasitologists: or lies, damned lies and ELISAs. Parasitol Today. 1993;9:228-32.

Xavier GA, Cademartori BG, Cunha Filho NA, Farias NA. Evaluation of seroepidemiological toxoplasmosis in HIV/AIDS patients in the south of Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2013;55:25-30.

Xue M, He S, Cui Y, Yao Y, Wang H. Evaluation of the immune response elicited by multi-antigenic DNA vaccine expressing SAG1, ROP2 and GRA2 against *Toxoplasma gondii*. Parasitol In. 2008;57:424–429

Wakankar A, Chen Y, Gokarn Y, Jacobson FS. Analytical methods for physicochemical characterization of antibody drug conjugates. MAbs. 2011;3:161-72.

Wallon M, Kodjikian L, Binquet C, Garweg J, Fleury J, Quantin C, et al. Long-term ocular prognosis in 327 children with congenital toxoplasmosis. *Pediatrics*. 2004; 113:1567-72.

Walsh MC, Shaffer LA, Guikema BJ, Body SC, Shernan SK, Fox AA, et al. Fluorochrome-linked immunoassay for functional analysis of the mannose binding lectin complement pathway to the level of C3 cleavage. *J. Immunol. Methods*. 2007; 323:147-59.

Webb IK, Mentinova M, McGee WM, McLuckey SA. Gas-phase intramolecular protein crosslinking via ion/ion reactions: ubiquitin and a homobifunctional sulfo-NHS ester. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2013;24:733-43.

Wisdom GB. Conjugation of antibodies to fluorescein or rhodamine. *Methods Mol Biol*. 2005;295:131-4.

Wyns H, Croubels S, Demeyere K, Watteyn A, De Backer P, Meyer E. Development of a cytometric bead array screening tool for the simultaneous detection of pro-inflammatory cytokines in porcine plasma. *Vet Immunol Immunopathol*. 2013;151:28-36.

Yamamoto YI, Mourad AM, Prescende FR, Ribeiro KS, Oliveira CB, Garcia RS. Seroepidemiological survey of *Toxoplasma gondii* infection among students of a university. *Rev Bras Amal Clin*. 2009;41:299-302.

Yan M, Cai SX, Wybourne MN, Keana JF. N-hydroxysuccinimide ester functionalized perfluorophenyl azides as novel photoactive heterobifunctional cross-linking reagents. The covalent immobilization of biomolecules to polymer surfaces. *Bioconjug Chem*. 1994;5:151-7.

Yao Y, He SY, Wang HX, Zhou HY, Zhao H, Li T, et al. Protective immunity induced in mice by multiantigenic DNA vaccine with genes encoding SAG1 and MIC8 of *Toxoplasma gondii*. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*. 2010;28:81-88.

Zhang J, Gao L, Zhou B, Zhu L, Zhang Y, Huang B. Simultaneous detection of deoxynivalenol and zearalenone by dual-label time-resolved fluorescence immunoassay. *J Sci Food Agric*. 2011;91:193-7.

Zou H, Luo Q, Zhou D. Affinity membrane chromatography for the analysis and purification of proteins. *J Biochem Biophys Methods*. 2001;49:199-240.

Zhu K, Li J, Wang Z, Jiang H, Beier RC, Xu F, Shen J, Ding S. Simultaneous detection of multiple chemical residues in milk using broad-specificity antibodies in a hybrid immunosorbent assay. *Biosens Bioelectron.* 2011a;26:2716-9

Zhu X, Chen L, Shen P, Jia J, Zhang D, Yang L. High sensitive detection of Cry1Ab protein using a quantum dot-based fluorescence-linked immunosorbent assay. *J Agric Food Chem.* 2011b;59:2184-9.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

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 o desenvolvimento de novos testes sorológicos para o diagnóstico da doença denominada **"Toxoplasmose"**;
- II) Serão feitas 1 coleta de 5 mL de sangue
- III) Essa coleta será feita apenas para este estudo e em nada influenciará o meu tratamento; não vai me curar; não vai 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 2013

() Paciente / () Responsável

.....

Testemunha 1 : _____
Nome / RG / Telefone

Testemunha 2 : _____
Nome / RG / Telefone

Responsável pelo Projeto:

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

Telefone para contato: 11 - 30617010

ANEXOS

ANEXO A - Amostras selecionadas para a validação do ensaio imunofluorescente multiplex de fase sólida (FLISAm), valores de referência do ELISA comercial e resultados da Imunofluorescência Indireta (IFI) dos soros IgM positivos no ELISA comercial

Valores de referência do ELISA comercial: Para IgG : Não reagente < 1; Inconclusivo ≥ 1 e < 3; Reagente ≥ 3 . Para IgM : Não reagente < 0,8; Inconclusivo $\geq 0,8$ e < 1, Reagente ≥ 1 .

Soros	ELISA comercial IgG		ELISA comercial IgM		IFI
	UI/mL	Resultado	UI/mL	Resultado	
1	650	Positivo	2,57	Positivo	Não reagente
2	650	Positivo	2,15	Positivo	Não reagente
3	436,9	Positivo	1	Positivo	Não reagente
4	0,13	Negativo	1,55	Positivo	Não reagente
5	650	Positivo	1,42	Positivo	Não reagente
6	650	Positivo	5,47	Positivo	Reagente
7	0,17	Negativo	1,33	Positivo	Não reagente
8	650	Positivo	2,63	Positivo	Não reagente
9	290	Positivo	0,36	Negativo	-
10	264,3	Positivo	0,32	Negativo	-
11	650	Positivo	0,73	Negativo	-
12	650	Positivo	0,23	Negativo	-
13	392,7	Positivo	0,74	Negativo	-
14	532,1	Positivo	0,3	Negativo	-
15	338,6	Positivo	0,71	Negativo	-
16	650	Positivo	0,56	Negativo	-
17	0,14	Negativo	0,23	Negativo	-
18	0,13	Negativo	0,36	Negativo	-
19	0,13	Negativo	0,5	Negativo	-
20	0,15	Negativo	0,24	Negativo	-
21	0,13	Negativo	0,25	Negativo	-
22	0,13	Negativo	0,27	Negativo	-
23	0,13	Negativo	0,29	Negativo	-
24	0,13	Negativo	0,34	Negativo	-

ANEXO B – Parecer de aprovação do Comitê de Ética do CEP-IMT e da CAPPesq

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo – Brasil
e-mail: cpq-imt@usp.br
Telefone: (55-11) 3061-7193 e 3061-8650 FAX: (55-11) 3064-5132 e 3062-2174

São Paulo, 29 de fevereiro de 2012.

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

Em reunião na presente data, a Comissão de Pesquisa e Ética do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, tomou ciência do projeto classificado sob número **CPE-IMT 2011/116** e intitulado “Testes fluorimétricos na sorologia da toxoplasmose humana”, sob sua responsabilidade. O projeto deverá ser enviado à Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPESQ), para aprovação.

Atenciosamente

Dr. Jorge Casseb
Presidente da Comissão de Pesquisa e Ética do IMT-USP
Prof. Dr. Jorge S.R. Casseb
Professor Doutor do IMT
LIM 56 - FMUSP

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:** 1
Pesquisador Executante: Jaqueline Polizeli Rodrigues **CAAE:** 01539512.8.0000.0068
Finalidade Acadêmica: Mestrado
Instituição: HCFMUSP
Departamento: INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 26420

Data da Relatoria: 23/05/2012

Apresentação do Projeto: O projeto está bem elaborado, com proposta bastante definida e desenho experimental apropriado. Tem finalidade acadêmica (mestrado).

Objetivo da Pesquisa: 1. Desenvolver método sorológico fluorimétrico para a detecção de anticorpos (IgG/IgM/IgA) anti- T gondii de auxílio diagnóstico da toxoplasmose; 2. Comparar seu desempenho em relação aos métodos convencionais quanto à sensibilidade e especificidade. As amostras de soro de pacientes a serem testadas para esse fim serão provenientes de biorrepositórios do Laboratório de Protozoologia do IMTSP.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: A introdução de uma nova tecnologia que incorpore a análise das diferentes classes de imunoglobulinas e exibindo melhor performance (maior sensibilidade e maior grau de especificidade ao T. gondii) será importante na rotina laboratorial de auxílio diagnóstico da toxoplasmose. Não há riscos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Projeto é exequível. A seção "Introdução" é clara quanto à necessidade de se estabelecer metodologia mais específica e sensível no auxílio diagnóstico da toxoplasmose.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: O uso de amostras estocadas no IMT nesse projeto foi aprovado pelo seu Diretor.

Recomendações: Nenhuma

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Pela aprovação do projeto por não apresentar pendência ética que o comprometa.

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

Considerações Finais a critério do CEP: Aprovado

São Paulo, 25 de Maio de 2012

 Prof. Dr. Luiz Eugênio Garcez Leme
 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

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

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 8664

Número do Parecer: 335.541

Data da Relatoria: 17/07/2013

Apresentação do Projeto: Uma nova versão do projeto original foi encaminhada com a inserção da emenda proposta e aprovada por esta comissão.

Objetivo da Pesquisa: O projeto visa desenvolver métodos sorológicos fluorimétricos para a detecção de anticorpos (IgG, IgM e IgA) contra *T.gondii* em sorotecas estocadas no Laboratório de Protozoologia do IMTSP, com perfil sorológico e clínico definidos. Serão utilizadas ainda 1.000 amostras de soro humano de pacientes adultos com procedimento de rotina em exames no Laboratório de Imunologia do Hospital das Clínicas (DLC HC FMUSP), utilizadas com consentimento informado para uso em pesquisas sorológicas da toxoplasmose humana e armazenadas em biorrepositório no Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMTSP-HCFMUSP). A coleta será realizada com a colaboração da Dra. Natalya Zaidan Maluf, Dra. Ellane Aparecida Rosseto, e Profa. Dra. Leila Antonagelo (Laboratório de Imunologia DLC HC FMUSP). Os soros ficarão sob o gerenciamento do pesquisador Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Junior, e as amostras serão utilizadas de acordo com o regulamento do biorrepositório.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Não há riscos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Relevância do projeto se baseia no estabelecimento de um biorrepositório de amostras de soro de pacientes com toxoplasmose com dados clínicos definidos e no desenvolvimento de metodologia sensível e ampla para o auxílio diagnóstico da toxoplasmose.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: O pesquisador responsável enviou a nova versão do projeto e o TCLE com as alterações propostas por esta Comissão.

Recomendações: Alertamos os pesquisadores quanto ao formato do TCLE que não se encontra na versão atual e que, portanto, deve ser modificado.

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

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