

Ivani Jose da Silva

**Avidez de IgG na Toxoplasmose: padronização do pH como caotrópico para
quantificação direta de anticorpos de baixa avides**

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

**Área de concentração: Doenças Tropicais e
Saúde internacional**

**Orientadora: Profa. Dra. Luciana Regina
Meireles Jaguaribe Ekman**

**São Paulo
2011**

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

Silva, Ivani José

Avidéz de IgG na toxoplasmose: padronização do pH como caotrópico para quantificação direta de anticorpos de baixa avidéz / Ivani José da Silva. – São Paulo, 2011.

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
Orientadora: Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman

Descritores: 1. *TOXOPLASMA GONDII*. 2. TOXOPLASMOSE. 3. AFINIDADE DE ANTICORPOS. 4. ELISA. 5. TÉCNICAS IMUNOENZIMÁTICAS. 6. CAOTRÓPICO.

USP/IMTSP/BIB-01/2011.

Universidade de São Paulo
Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

Candidato: **Ivani Jose da Silva**

Título da Dissertação: **Avidéz de IgG na Toxoplasmose: padronização do pH como caotrópico para quantificação direta de anticorpos de baixa avidéz”**

Orientador: **Profa. Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman**

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada em/...../....., considerou

() **APROVADO(A)** () **REPROVADO(A)**

Examinador(a)

Assinatura

Nome.....

Instituição

Examinador(b)

Assinatura.....

Nome

Instituição

Presidente

Assinatura

Nome.....

Instituição.....

*Aos Meus Pais
Geraldo e Celita*

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós Graduação do Instituto de Medicina Tropical, seus funcionários e professores pela oportunidade e conhecimento compartilhado.

A Profa. Dra. Luciana Regina Meireles sempre presente em todas as etapas com atenção, esforço e compreensão na orientação deste trabalho.

Ao Dr. Heitor de Andrade Junior pelo apoio, incentivo e confiança.

A minha família pelo amor e apoio incondicional.

Aos amigos e funcionários do Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical: Roselaine, Solange, Sílvia, Luciano, Marilda, Andrés, Maria Tereza, Carlos e Sônia (biblioteca) pelo auxílio e companheirismo. A Dona Fran (Guardada no coração).

As Irmãzinhas e amigas (Luciana, Meca, Maria, Sonia, Samanta e Barbara) por tornarem meus dias mais serenos, compartilhando tristezas e alegrias.

As minhas amigas de infância Ju´s, Lu, Carol, Raquel, Val e Laíla pela compreensão e carinho.

Aos meus amigos e companheiros de trabalho da Universidade Metodista de São Paulo, DASA e Laboratório Raul Dias dos Santos.

*A Deus por estar em tudo e todos que amo.
Muito Obrigada.*

“QUEM ASSUME ALGUMA COISA
E ACREDITA,
É PORQUE JÁ A TEM NO CORAÇÃO” (John Ruskin)

RESUMO

Silva IJ. Avidéz de IgG na toxoplasmose: padronização do pH como caotrópico para quantificação direta de anticorpos de baixa avidéz (dissertação). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2011.

A toxoplasmose é uma protozoose altamente prevalente que atinge pelo menos um bilhão de indivíduos no mundo. A infecção causada pelo *Toxoplasma gondii* é benigna e assintomática, mas pode causar perdas visuais ou morte em fetos e pacientes imunossuprimidos. Isto pode ser controlado com diagnóstico e instituição de tratamento, mas depende da determinação de infecção ativa ou recente. O diagnóstico parasitológico é complexo, demorado e só executado em poucos centros, sendo a sorologia específica essencial no diagnóstico da doença. A avidéz de anticorpos IgG tem sido utilizada para determinação da infecção recente, porém os testes convencionais de avidéz só permitem uma estimativa indireta destes anticorpos a partir dos anticorpos totais e os de alta avidéz. A quantificação destes anticorpos de baixa avidéz seria interessante devido aos altos títulos na fase aguda da infecção ou como marcadores da atividade da doença. Padronizamos um ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando o pH como agente caotrópico, para permitir a determinação e quantificação dos anticorpos de baixa avidéz. Na padronização utilizamos amostras de soro de coelhos experimentalmente infectados ou amostras do banco de material biológico do Laboratório de Protozoologia do IMTSP. Nossos resultados mostraram que pH 3,5 apresentou poder caotrópico semelhante a uréia 6M ($r^2 = 0,9909$), e que nos soros experimentais, os anticorpos de alta avidéz foram resistentes aos dois caotrópicos associados. Os anticorpos recuperados na eluição com pH 3.5 ou Uréia eram semelhantes quanto a especificidade antigênica por imunomarcção ou Western Blot. A neutralização do anticorpo eluído por pH permitiu seu reensaio por ELISA após 1 hora de renaturação, com a quantificação direta dos anticorpos de baixa avidéz. A reprodutibilidade intra e inter teste foi superior a 95%, embora com resultados piores para o pH 3,5. Uma vez padronizada a reação, foram analisadas 150 amostras de soros humanos com sorologia e avidéz conhecidas, composta por grande maioria de soros de alta avidéz. As medidas de avidéz por porcentagem mostraram um resultado errático, atribuído ao uso de grande maioria de anticorpos de alta avidéz, embora a medida dos anticorpos recuperados mantivesse correlação com estimativa a partir da medida indireta ($r^2 = 0.48$). Esta abordagem permite a determinação direta dos anticorpos de baixa avidéz, que são os anticorpos inicialmente produzidos em um desafio antigênico. Nosso ensaio é semelhante ao imunológico, já que a apresentação de antígenos por exossomos ácidos de células dendríticas foliculares no centro germinativo parece ser o sistema de seleção de clones produtores de anticorpos de alta avidéz. As perspectivas futuras de uso da medida dos anticorpos de baixa avidéz na toxoplasmose são imensas, desde a relação com a gravidade da doença, pela sua quantidade, ou da presença de infecção recente, principalmente em infecção congênita ou e em imunossuprimidos, ou a reatividade da doença crônica, como na toxoplasmose ocular.

Descritores: *Toxoplasma gondii*. Toxoplasmose. Afinidade de Anticorpos. ELISA. Técnicas imunoenzimáticas. Caotrópico.

ABSTRACT

Silva IJ. IgG avidity in toxoplasmosis: standardization of pH as chaotrope for low avidity antibodies direct quantification (dissertation). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2011.

Toxoplasmosis is a highly prevalent protozoonosis, affecting at least one billion people worldwide. The infection caused by *Toxoplasma gondii* is asymptomatic and benign but it can cause visual losses in addition to death in fetuses and immunocompromised patients. The agent can be controlled by early diagnosis and treatment, but this therapy depends on the determination of active or recent infection. The parasitological diagnosis is complex, time consuming and only performed in few centers, so specific serology is essential for diagnosis. The IgG avidity tests has been used to determine recent infection, but avidity conventional tests only provide an indirect estimate of low avidity antibodies from the total and high avidity antibodies. The quantification of low avidity antibodies would be interesting due to high titers in the acute phase of infection or as markers of disease activity. Using reversible chaotrope such as pH, we standardized an enzyme immunoassay (ELISA) to allow the determination and quantification of low avidity antibodies. For standardization we used serum samples from experimentally infected rabbits or samples of biological material bank of the Laboratory of Protozoology, IMTSP. Our results showed that pH 3.5 is a chaotrope similar to 6M urea ($r^2 = 0.9909$) in avidity ELISA, and high avidity antibodies had similar resistance to two associated chaotrope in experimental sera. The antibodies recovered on elution with pH 3.5 or urea had similar antigen specificity by immunostaining or Western blot. The neutralizing antibody eluted by pH allowed retest by ELISA after 1 hour of refolding, with direct quantification of antibodies of low avidity. The reproducibility inter and intra test were above 95%, but with worse results for pH 3.5. After standardization, we analyzed 150 samples of human sera with known serology and avidity, composed by a large majority of high avidity samples. Avidity as percent of high avidity antibodies showed erratic results in chaotrope comparison, attributed to the majority of high avidity samples, although the direct measure of low avidity IgG kept correlation with the indirect estimate ($r^2 = 0.48$). This approach allows the direct determination of low avidity antibodies that are early produced in an antigen challenge. Our test is similar to the biology of antibody selection, since antigen presentation by acid exosomes of follicular dendritic cells in germinal center seems to be the system of selection of clones that produce high avidity antibodies. The prospective use of the quantification of low avidity antibodies in toxoplasmosis are attractive, either by the quantitative relationship with the severity of the disease; or the increased presence in recent infections, especially in congenital infection and in immunosuppressed patients, or their relative increase in reactivated chronic disease, such as ocular toxoplasmosis.

Descriptors: *Toxoplasma gondii*. Toxoplasmosis. Antibody affinity. ELISA. Immunoenzyme techniques. Chaotrope.

LISTA DE TABELAS

| | | |
|----------|---|----|
| Tabela 1 | Drogas utilizadas nos procedimentos de sedação e eutanásia dos animais estudados..... | 37 |
| Tabela 2 | Distribuição qualitativa da avidéz determinado por uréia 6M ou por pH 3.5 nas amostras utilizadas. Valores de comparação são apresentados abaixo, com os respectivos intervalos de confiança. | 49 |
| Tabela 3 | Reprodutibilidade da reação de ELISA IgG eluida com uréia 6M ou com pH 3,5. São apresentados o coeficiente de variação (CV) e a correlação entre as medidas dos ensaios de ELISA..... | 55 |

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|----------|--|----|
| Figura 1 | Ciclo de vida do <i>T.gondii</i> com as várias fontes de infecção humana e animal..... | 19 |
| Figura 2 | Evolução da maturação da avidéz de IgG anti- <i>T.gondii</i> por ELISA, utilizando uréia 6M como caotrópico. A linha preta tracejada mostra os títulos de anticorpos e a linha vermelha a avidéz de IgG, obtidos nos soros de coelhos experimentalmente infectados, sendo que as barra de erro representam o erro padrão da média de cada medida..... | 43 |
| Figura 3 | Uso de soluções de diferentes pHs como caotrópico em ELISA avidéz, utilizando soro de coelhos experimentalmente infectados com <i>T.gondii</i> . Correlação dos resultados da avidéz de anticorpos IgG obtidos pela uréia 6M e pelo tampão citrato fosfato de sódio..... | 45 |
| Figura 4 | Avaliação da concentração de extrato protéico antigênico de <i>T.gondii</i> (1µg/mL e 10µg/mL) para utilização no ELISA avidéz. Total: IgG ELISA sem caotrópico; Uréia: IgG ELISA após lavagem com uréia 6M; pH: IgG ELISA após lavagem com pH 3,5. A quantidade em µg expressa o adsorvente na fase sólida. A barra de erro, a caixa e a linha central expressam respectivamente a dispersão, o desvio padrão e a mediana dos valores analisados. Todos os valores apresentados foram calculados em relação ao <i>cut-off</i> dos controles negativos da reação de IgG ELISA sem caotrópico..... | 46 |
| Figura 5 | Avaliação da influência da diluição do soro na reação de ELISA avidéz com uréia 6M ou pH 3.5 como caotrópicos. A: ELISA IgG realizada com diferentes diluições de soro e com diferentes caotrópicos. Símbolos abertos: soros de alta avidéz; Símbolos sólidos: soros de baixa avidéz; Linhas sólidas: ELISA total; Linhas tracejadas: após lavagem com uréia 6M; Linhas pontilhadas: após lavagem com pH 3.5. B: Correlação entre avidéz determinada por uréia ou pH 3.5 na diluição 1:100 ou concentração de soro 0.01; C: Correlação entre avidéz determinada por uréia ou pH 3.5 na diluição 1:200 ou concentração de soro 0.005; D: Correlação entre avidéz determinada por uréia ou pH 3.5 na diluição 1:400 ou concentração de soro 0.0025. As retas representam a inclinação da relação e o valor de r^2 é expresso dentro da figura..... | 47 |
| Figura 6 | Avaliação da avidéz de IgG em amostras de soros de coelhos experimentalmente infectados com <i>T.gondii</i> , correlacionando os valores de avidéz por uréia 6M e pelo tampão citrato fosfato de sódio pH 3,5..... | 48 |

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 7 | Resistência dos anticorpos de alta avidéz à remoção por diferentes caotrópicos. Ensaio apresentado na forma de avidéz estimada com lavagens com uréia, pH ou seqüência de caotrópicos. Os resultados são a média dos resultados de 10 soros de alta avidéz e as barras representam o erro padrão desta média..... | 50 |
| Figura 8 | Reatividade dos anticorpos de baixa avidéz, presentes na solução eluída pelo pH 3,5 em amostras de soro de alta avidéz (A) e de baixa avidéz (B), provenientes de coelhos experimentalmente infectados com <i>T.gondii</i> . 1: Anticorpos totais; 2: Anticorpos resistentes a uréia 6M; 3: Anticorpos resistentes ao pH 3,5; 4: solução eluída pelo pH 3,5..... | 51 |
| Figura 9 | Elisa de avidéz por pH e uréia em soros humanos. A: Distribuição de valores de ELISA total ou com eluição por diferentes caotrópicos em soros humanos. B: Distribuição da média da determinação da avidéz por diferentes caotrópicos (uréia e pH) ou a diferença entre a avidéz por pH e a avidéz por uréia (Delta). As barras representam a média e o erro padrão da média de cada distribuição..... | 52 |
| Figura 10 | Comparação entre os resultados de anticorpos de alta avidéz obtidos por eluição dos anticorpos de baixa avidéz com uréia 6 M ou pH 3.5. A reta de regressão é apresentada e o valor de r^2 apresentado no inserto da figura..... | 53 |
| Figura 11 | Avaliação da determinação porcentual de anticorpos de alta avidéz (avidéz clássica) por ELISA, correlacionando os resultados da avidéz (AV) de anticorpos IgG obtidos pela uréia 6M e pelo pH 3,5 em amostras de soro humano..... | 54 |
| Figura 12 | Reatividade dos anticorpos de baixa avidéz, presentes na solução eluída pelo pH 3,5 em amostras: de soros humanos de alta avidéz (A) e de baixa avidéz (B). 1: Anticorpos totais; 2: Anticorpos resistentes a uréia 6M; 3: Anticorpos resistentes ao pH 3,5; 4: Solução eluída pelo pH 3,5..... | 56 |
| Figura 13 | Comparação entre a determinação direta de anticorpos de baixa avidéz, pela eluição com pH 3,5 e renaturação, com a determinação indireta de sua quantidade, pela diferença entre a reação ELISA total e a reação ELISA após eluição com o caotrópico. A: Comparação com a medida com uréia 6M. B: Comparação com a medida com pH 3.5. As retas representam a estimativa de regressão linear entre os eventos..... | 58 |
| Figura 14 | Correlação entre a medida direta de anticorpos de baixa avidéz, após eluição por pH 3,5 e renaturação e a medida estimada pela diferença entre a medida total e a obtida após eluição com o caotrópico. A reta representa a reta de regressão linear estimada. | 60 |

SUMÁRIO

| | | |
|---------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA..... | 15 |
| 1.1 | Aspectos Biológicos e Ciclo de vida do <i>Toxoplasma gondii</i> | 16 |
| 1.2 | Aspectos epidemiológicos e clínicos da toxoplasmose..... | 19 |
| 1.3 | Aspectos gerais da imunidade..... | 23 |
| 1.4 | Diagnóstico laboratorial da toxoplasmose..... | 25 |
| 1.5 | Avidéz de anticorpos IgG..... | 28 |
| 2 | OBJETIVOS..... | 32 |
| 2.1 | Geral | 33 |
| 2.2 | Específico..... | 33 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 34 |
| 3.1 | Parasitas..... | 35 |
| 3.1.2 | Cepa RH..... | 35 |
| 3.1.3 | Cepa ME49..... | 36 |
| 3.2 | Infecção Experimental em coelhos..... | 36 |
| 3.2.1 | Preparação e quantificação de inóculo..... | 36 |
| 3.2.2 | Delineamento Experimental..... | 37 |
| 3.3 | Sorologia..... | 37 |
| 3.3.1 | Soros..... | 37 |
| 3.3.2 | Ensaio imunoenzimático (ELISA)..... | 37 |
| 3.3.2.1 | Preparo do extrato antigênico solúvel..... | 37 |
| 3.3.2.2 | ELISA para avidéz de IgG por eluição com Uréia 6M..... | 38 |
| 3.3.2.3 | ELISA para medida direta de anticorpos de baixa avidéz por eluição ácida e neutralização..... | 39 |
| 3.4 | Western blotting..... | 39 |
| 3.5 | Análise Estatística..... | 41 |
| 4 | RESULTADOS | 42 |
| 4.1 | Padronização inicial de condições de determinação da avidéz de IgG por pH em coelhos experimentalmente infectados por <i>T.gondii</i> | 43 |
| 4.1.1 | Evolução da avidéz de IgG em coelhos experimentalmente infectados por <i>T.gondii</i> | 43 |
| 4.1.2 | Determinação do poder caotrópico de diferentes pHs e sua comparação com o poder caotrópico da uréia 6M em ELISA de IgG anti- <i>T.gondii</i> , utilizando soros de coelhos experimentalmente infectados com diferentes níveis de avidéz..... | 44 |
| 4.1.3 | Determinação da concentração ótima de adsorvente para a reação | 45 |

| | | |
|-------|---|----|
| | de ELISA avidéz de IgG anti- <i>T.gondii</i> , utilizando solução pH 3.5 como caotrópico em soros de coelhos experimentalmente infectados com diferentes níveis de avidéz..... | |
| 4.1.4 | Determinação da diluição de trabalho do soro para a reação de ELISA avidéz de IgG anti- <i>T.gondii</i> , utilizando solução pH 3.5 como caotrópico em soros de coelhos experimentalmente infectados com diferentes níveis de avidéz..... | 46 |
| 4.2 | Avaliação comparativa da determinação da avidéz por eluição com uréia 6M ou pH3.5 em reação de avidéz padronizada com soros experimentais..... | 48 |
| 4.2.1 | Avaliação Quantitativa..... | 48 |
| 4.2.2 | Avaliação Qualitativa..... | 49 |
| 4.3 | Caracterizações dos anticorpos frente a diferentes caotrópicos..... | 49 |
| 4.3.1 | Caracterização dos anticorpos de alta avidéz..... | 49 |
| 4.3.2 | Especificidade antigênica dos anticorpos eluidos e renaturados por diferentes caotrópicos em amostras experimentais..... | 50 |
| 4.4 | Ensaio de amostras humanas na reação de ELISA avidéz por pH..... | 51 |
| 4.4.1 | ELISA IgG e ELISA avidéz com diferentes caotrópicos..... | 51 |
| 4.4.2 | Reprodutibilidade intra e inter teste..... | 54 |
| 4.5 | Quantificação e caracterização de anticorpos de baixa avidéz..... | 55 |
| 4.5.1 | Padronização do tempo de renaturação dos anticorpos eluídos com pH 3.5..... | 55 |
| 4.5.2 | Especificidade antigênica dos anticorpos humanos eluidos por pH 3,5 em relação aos antígenos de <i>T.gondii</i> por <i>Western Blotting</i> | 56 |
| 4.5.3 | Determinação de anticorpos de baixa avidéz eluídos por pH 3,5 renaturadas em soros de animais experimentais..... | 57 |
| 4.5.4 | Relação entre a medida direta da IgG de baixa avidéz eluida a pH 3,5 e renaturada com a estimativa indireta por diferença entre a IgG total e a IgG de alta avidéz determinada em cada caotrópico para amostras humanas..... | 58 |
| 5 | DISCUSSÃO..... | 60 |
| 6 | CONCLUSÕES..... | 70 |
| 6.1 | Geral..... | 71 |
| 6.2 | Específica..... | 71 |
| | REFERÊNCIAS..... | 72 |
| | ANEXOS..... | 85 |

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A toxoplasmose é uma protozoose de grande importância médica e veterinária, causada pelo *Toxoplasma gondii*. A doença é endêmica em grande parte do globo terrestre, estimando-se que mais de dois bilhões de pessoas estejam infectadas pelo agente (Tenter et al., 2000; Silveira, 2001), sendo que a taxa de infecção está relacionada a fatores sócio - econômicos, faixa etária, áreas geográficas e hábitos culturais da população (Tenter et al., 2000; Kijlstra e Jongert, 2008).

Em indivíduos imunocompetentes, a doença é assintomática em 90% dos casos, apresentando curso benigno, sendo que cerca de 2-3% dos indivíduos sintomáticos podem apresentar a forma ocular da doença, resultando em coriorretinite e até perda da visão (Roberts e McLeod, 1999). Por outro lado, a doença assume grave importância em indivíduos imunodeprimidos, como pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA/AIDS), transplantados ou indivíduos submetidos à quimioterapia. A doença também é grave em fetos de mães que adquirem a primo-infecção durante a gestação (Remington et al., 2001).

A infecção pode ocorrer por via oral, através da ingestão de água e alimentos crus contaminados com oocistos, eliminados nas fezes de felinos, ou, pela ingestão de carne crua ou mal cozida, contendo cistos do agente. Outra forma importante de transmissão é a transplacentária que ocorre quando a mãe adquire a primoinfecção durante a gestação. E por fim, a doença pode ser adquirida, através de transplantes de órgãos, transfusão sanguínea e acidentes laboratoriais (Dubey, 1994; Remington e McLeod, 2001).

No Brasil, a prevalência da infecção pelo *T.gondii* varia de acordo com a região: Recife (64% a 79%), Rio de Janeiro (79%), Manaus (71%), São Paulo

(68%), e nas populações indígenas varia de 52% a 65% (Amendoeira et al., 2003; Coelho et al., 2003).

1.1 Aspectos Biológicos e Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*

O *Toxoplasma gondii* é um parasita intracelular obrigatório, cosmopolita, capaz de infectar qualquer espécie animal de sangue quente (Frenkel, 1970; Dubey e Beattie, 1988; Hill et al., 2005). O agente pertence ao Reino Protista, Subreino Protozoa, Filo Apicomplexa, Classe Sporozoa, Subclasse Coccidia, Ordem Eucoccidiida, Subordem Eimeriina, Família Sarcocystidae, Gênero *Toxoplasma*, Espécie (única) *gondii* (Tenter e Johnson, 1997; Dubey, 1998a)

O parasita foi descrito primeiramente em 1908, por Nicolle e Manceaux, a partir de tecidos de um roedor africano, *Ctenodactylus gondii* e por Splendore no Brasil no mesmo ano, descrevendo o parasita em coelhos. Em 1909, Nicolle e Manceaux introduziram o gênero *Toxoplasma*, referindo-se à forma em lua crescente do taquizoíto (Hill et al., 2005; Dubey, 2008).

Em 1923, foi descrito o primeiro caso humano em uma criança de 11 meses com hidrocefalia na Tchecoslováquia (Janku, 1923), porém a forma congênita foi descrita somente em 1937 por Wolf e Cowen. No Brasil, esta forma de transmissão foi descrita a partir de cortes histológicos com a presença do parasita em um recém nascido falecido com 29 dias de vida no Rio de Janeiro (Torres, 1927), sendo que somente na década de 40 foi relatada a toxoplasmose aguda em adultos.

Em 1939, Sabin revelou que o *Toxoplasma* isolado de seres humanos e aqueles, previamente obtidos em animais, pertenciam à mesma espécie. Em 1948, a frequência da infecção foi conhecida com a introdução do teste do corante azul de metileno por Sabin e Feldman, o que permitiu estudos soroepidemiológicos em seres humanos, bem como em várias espécies animais, mostrando a ampla distribuição e prevalência do agente em diferentes áreas do mundo (Pinkerton e Weinman, 1940; Pinkerton e Henderson, 1941; Tenter et al., 2000).

Em 1957 foi introduzida a hemaglutinação por Jacobs e Lunde e a partir de 1962 a imunofluorescência indireta por Kelen e colaboradores. Hutchison em 1965 observou a forma infectante e resistente do *T.gondii* nas fezes de felinos (Dubey, 2008)

O nome do gênero *Toxoplasma* deriva da palavra grega *Toxon* que significa arco e se refere à forma dos taquizoítos que medem de 4 a 8 µm de comprimento por 2 a 4 µm de largura (Dubey, 1998a). O nome da espécie deriva do roedor *Ctenodactylus gondii*, no qual o *Toxoplasma* foi isolado pela primeira vez.

Em seu ciclo vital, o *T. gondii* apresenta três formas infectantes, a saber: taquizoítos, bradizoítos e oocistos (Dubey, 1998a). Os taquizoítos (*tachos*: rápido) correspondem à forma assexuada de rápida proliferação do parasita. Esta forma do *T.gondii* apresenta diversas estruturas comuns às demais células animais, como mitocôndrias, retículo endoplasmático, complexo de Golgi e organelas características do filo, como os anéis polares, conóide, roptrias e micronemas (Hill et al., 2005). Os taquizoítos são encontrados durante a fase aguda da infecção, sendo também denominados de forma proliferativa. Possuem uma extremidade anterior afilada, onde está situado o complexo apical, formado por organelas específicas, responsáveis pela penetração e formação do vacúolo parasitóforo no citoplasma da célula parasitada. No vacúolo parasitóforo, os taquizoítos se multiplicam por endodiogenia, disseminando-se, por meio dos sistemas linfáticos e sangüíneos, para vários tecidos, incluindo o sistema nervoso central, olhos, musculatura esquelética e cardíaca (Dobrowolski e Sibley, 1996). Podem ser facilmente mantidos em laboratório, através de culturas celulares e passagens sucessivas em animais experimentais, porém são pouco resistentes, sendo facilmente destruídos pelas condições ambientais adversas como suco gástrico, desidratação ou variações osmóticas. Após a invasão da célula hospedeira, e na

vigência da resposta imune do hospedeiro, desenvolvem-se mais lentamente formando os bradizoítos (Dubey, 1998a; Hill et al., 2005).

Os bradizoítos são encontrados freqüentemente em células estáveis como cérebro, retina, músculo esquelético e cardíaco e são morfológicamente semelhantes aos taquizoítos, mas possuem uma replicação lenta. É a principal forma de transmissão da zoonose através da ingestão de carnes cruas ou mal cozidas. Estas estruturas localizam-se no interior dos cistos teciduais que podem variar de tamanho de 10 a 100 μm , dependendo de sua persistência, isto é, os mais jovens serão menores, contendo dois bradizoítos no seu interior, enquanto os mais velhos poderão ter milhares de bradizoítos. Os cistos representam a forma de latência do *T. gondii* nos tecidos, sendo encontrados durante a fase crônica da infecção (Dubey e Frenkel, 1972; Frenkel e Dubey, 1973; Dubey e Beattie, 1988; Hill et al., 2005). Seu tamanho também pode variar de acordo com sua localização, assim aqueles presentes no cérebro são menores do que os do músculo esquelético (Hill et al., 2005). Os cistos intactos provavelmente não causam nenhum dano e podem persistir por longos períodos, ou por toda a vida do hospedeiro, sem causar a este nenhuma resposta inflamatória significativa, mas podendo se romper com a queda da imunidade (Dubey 1994; Dubey, 1998b).

Os oocistos representam a forma de resistência ambiental do parasita, sendo caracterizados por uma parede dupla bastante resistente às condições do meio ambiente. São produzidos nas células intestinais de felídeos não imunes e eliminados ainda imaturos junto com as fezes destes animais (Dubey e Frenkel, 1972; Frenkel e Dubey, 1973; Dubey e Beattie, 1988; Hill et al., 2005). Após a ingestão dos oocistos, há liberação dos esporozoítos, que invadem as células intestinais e se transformam em taquizoítos, dando origem a fase aguda da infecção. Em seguida, serão formados os cistos teciduais, que podem ocorrer tanto nos tecidos de felídeos, hospedeiros definitivos do *T.gondii*, como em aves,

mamíferos e no homem, hospedeiros intermediários do agente (Dubey, 1994; Dubey,1998a),(Figura 1).

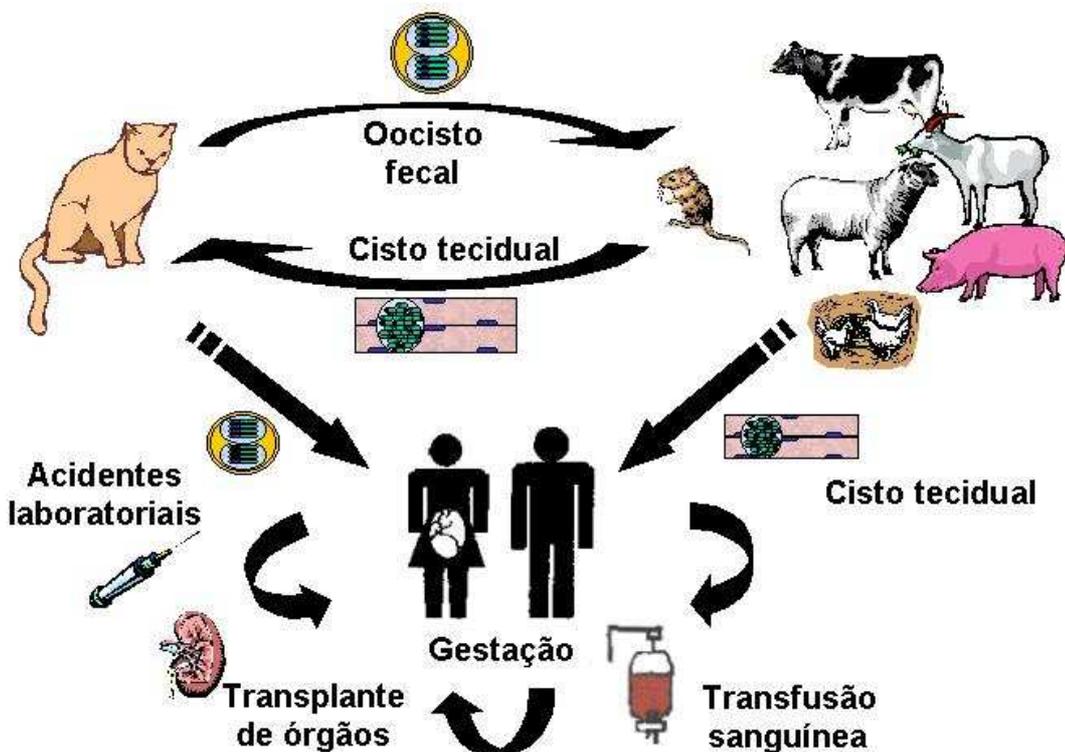


Figura 1 - Ciclo de vida do *T.gondii* com as várias fontes de infecção humana e animal. Fonte: Meireles (2005).

1.2 Aspectos epidemiológicos e clínicos da toxoplasmose

Estima-se que mais de um terço da população mundial tenha sido infectada pelo *Toxoplasma gondii*, sendo as prevalências descritas de 15% a 85% na população humana, com variações decorrentes do nível sócio econômico, idade, área geográfica, fatores climáticos e hábitos culturais da população (Tenter et al., 2000; Kijlstra e Jongert, 2008).

As taxas de infecção humana são variáveis, sendo nos países latino-americanos (51-72%), no Oeste Africano (54-77%), na França (85%) e Sudeste Asiático, China e Coréia (4-39%). As taxas de infecção são menores em zonas de

clima frio, como os países escandinavos (11-28%) e estados montanhosos do oeste central dos Estados Unidos. Por outro lado, as regiões altas do Atlântico leste e estados centrais dos EUA apresentam altas taxas de infecção devido ao clima quente (Tenter et al., 2000; Gagne, 2001).

O hábito cultural dos povos afeta diretamente a prevalência da infecção pelo *T. gondii*. Estudos relatam que nos EUA a maior parte das infecções nos seres humanos é provavelmente resultado da ingestão de cistos contidos em carne mal cozida. Na França, o hábito da ingestão de produtos cárneos crus ou mal cozidos, também interfere na prevalência da infecção em humanos, sendo que 84% das gestantes francesas apresentam sorologia positiva para toxoplasmose (Hill et al., 2005; Kijlstra e Jongert, 2008).

A faixa etária também parece influenciar diretamente na prevalência da infecção, que aumenta com o decorrer da idade, devido à exposição a fatores de riscos durante a vida. Entretanto, estudos demonstram que elevados níveis de contaminação ambiental podem aumentar a prevalência de infecção pelo *T. gondii* em crianças devido ao contato com oocistos presentes no solo, como descrito nas Américas Central e do Sul, especialmente em áreas brasileiras, onde foi observado que 60% das crianças entre seis a oito anos possuíam anticorpos anti-*T. gondii* (Tenter et al., 2000; Bahia-Oliveira et al., 2001; Hill et al., 2005).

Em relação aos aspectos clínicos, a toxoplasmose é assintomática em 90% dos casos em indivíduos imunocompetentes, apresentando-se de forma benigna e autolimitada. Cerca de 10% apresentam sintomas, porém estes não são patognomônicos, sendo a manifestação clínica semelhante a um quadro de mononucleose infecciosa, com adenopatias, principalmente cervicais, freqüentemente acompanhadas de febre baixa, desamino e anorexia com resolução espontânea no final de duas a quatro semanas (Remington e McLeod, 2001). Assim, apesar de acometer com freqüência o homem, a infecção pelo *T.gondii* passa muitas vezes despercebida, não sendo necessária terapêutica específica.

Porém, casos raros mostram que indivíduos, previamente saudáveis, podem desenvolver doença severa e até fatal na dependência da virulência do agente (Carme et al., 2002; Demar et al., 2007). Além disso, estudos têm avaliado a possibilidade de a infecção crônica causar diminuição do desempenho psicomotor (Havlicek et al., 2001), distúrbios e efeitos no comportamento (Flegr et al., 1996, 2000) e doença mental (Bachmann et al., 2005; Brown et al., 2005).

Dentre as manifestações clínicas em indivíduos sintomáticos, 2% a 3% desenvolvem um quadro de retinocoroidite (McLeod et al., 2006; Holland, 1999). A forma ocular é decorrente do tropismo do *Toxoplasma gondii* pela retina. O acometimento pode ser bilateral em 60 a 80% dos casos, ocorrendo alterações oculares com graus variáveis de degeneração, como edema de retina, lesões vasculares da coróide, neurite óptica, microftalmia, nistagmo e estrabismo. Em países como os EUA, a retinocoroidite é responsável por 30-50% de todos os casos de danos visuais. No Brasil, a maioria dos casos examinados em pessoas com lesões oculares, mostrou que a toxoplasmose ocular pode ser considerada uma seqüela da infecção aguda adquirida (Diniz et al., 1991; Glasner et al., 1992; McCannel et al., 1996; Kompalic-Cristo, 2005).

A doença congênita constitui outra forma clínica importante da toxoplasmose, que ocorre quando a mãe adquire a primo-infecção durante a gestação, ocasionando transmissão transplacentária de taquizoítos para o feto. A possibilidade de transmissão fetal é remota quando a toxoplasmose materna é adquirida antes da concepção. Cerca de 50% dos recém-nascidos de mães que adquiriram a infecção durante a gravidez são infectados, mas somente 10% apresentam manifestações clínicas precoces (Hinrichsen et al., 2005). A infecção intra-uterina pode ser muito grave, já que, no feto, o parasita se aloja em células do sistema mononuclear fagocitário, disseminando-se pela corrente sanguínea e linfática, com formação de pseudocistos em diferentes órgãos, sobretudo no sistema nervoso central. A infecção que se manifesta no período neonatal é

caracterizada pela clássica tétrade de Sabin, composta por alterações do volume craniano (hidrocefalia ou microcefalia), coriorretinite (geralmente bilateral, macular ou perimacular, simétrica), calcificações intracranianas e retardamento mental (Remington e McLeod, 2001). A maioria dos recém nascidos infectados não apresenta sinais clínicos ao nascer, mas podem desenvolver seqüelas da infecção congênita no decorrer da vida, com manifestações tardias da doença, geralmente na adolescência, dependendo da virulência do agente (Remington e McLeod, 2001). O diagnóstico de toxoplasmose congênita é, por vezes, impreciso, pois as manifestações clínicas podem ser confundidas com as causadas por outros agentes como Citomegalovírus, Herpes simples, Rubéola, HIV, Epstein Barr, *Treponema pallidum*, *Listeria monocytogenes*, *Borrelia burgdorferi* e *Trypanosoma cruzi*. Outras doenças também podem apresentar sinais clínicos semelhantes à toxoplasmose como a eritroblastose fetal e determinadas doenças degenerativas. (Remington e McLeod, 2001).

A toxoplasmose afeta de forma grave indivíduos que apresentam uma queda no sistema imunológico, como os portadores de HIV, levando à reativação de cistos latentes e reagudização da doença, que ocasionam lesões cerebrais e destruição dos tecidos neurais (Luft e Remington, 1992; Remington e McLeod, 2001). Outro grupo de pacientes que pode ser acometido por formas graves da doença são os transplantados, que devido à imunossupressão podem apresentar reativação dos cistos. Em São Paulo, estudos demonstram que 21% dos pacientes com HIV examinados no ano de 1988 e 46% no ano de 1991, apresentaram encefalite por *Toxoplasma gondii* (Passos et al., 2000), sendo que a toxoplasmose é uma das principais causas de óbitos em aids, sendo 12,2% dos óbitos atribuídos à encefalite pelo *T.gondii* (Ambroise-Thomas e Pelloux, 1993; Santo et al., 2000; Mozzatto e Procianny, 2003).

1.3 Aspectos gerais da imunidade

Grande parte das infecções pelo *T.gondii* são subclínicas, sendo dependente da resposta imune humoral e celular do hospedeiro. Acredita-se que a resposta imune celular, incluindo linfócitos e linfocinas, desempenha um papel mais acentuado no controle da doença do que os fatores humorais (Hill et al., 2005).

Sabe-se que o principal mecanismo para eliminar as formas intracelulares do *T. gondii* é a resposta imune do tipo Th1, que leva à produção de citocinas como a IL-2, IFN- γ , TNF- α e IL-12. A IL-12 e IFN- γ estimulam a produção de óxido nítrico (NO), que é fundamental para eliminação do parasita. O IFN- γ tem papel crucial na resistência contra a toxoplasmose e pode ser produzido por linfócitos T CD8⁺, T CD4⁺ e células *natural killers* (NK), em resposta à presença de IL-12. Presume-se que o IFN- γ participe da morte celular do parasita através de dois mecanismos: indução da produção de óxido nítrico ou depleção de nutrientes importantes para sua sobrevivência, como o triptofano (Gazzinelli et al., 1991)

A imunidade humoral ativada pelo sistema complemento, resulta na produção de anticorpos de diversas classes como IgM, IgA, IgE e IgG, sendo detectados até duas semanas após infecção (Cantos et al., 2000; Kompalic-Cristo et al., 2005).

Os anticorpos IgA e IgE estão freqüentemente presentes na fase aguda da infecção, mas podem ser detectados por meses ou até mesmo mais de um ano após a infecção, sendo questionáveis como marcadores de fase aguda da infecção (Mineo et al., 1993; Ashburn et al., 1998; Foulon et al., 1999).

A IgM está presente a partir do 5^o dia de infecção, com pico em torno de seis a oito semanas, quando então declina, sendo considerada como marcador de fase aguda. Entretanto, com o advento de técnicas imunoenzimáticas mais sensíveis como o ensaio de ELISA, esta classe de anticorpos pode ser detectada no paciente por até dezoito meses após o início da infecção, já que em alguns casos, a IgM

pode persistir em títulos baixos no hospedeiro, devendo ser considerada como IgM residual (Ferreira e Camargo, 2002).

Os níveis de IgG são detectados a partir da primeira ou segunda semanas pós-infecção, podendo permanecer elevados por anos. Interessante notar que a passagem de IgG específica pela placenta pode dificultar o diagnóstico no recém-nascido, já que a IgG presente no sangue do lactente consiste em imunoglobulina materna que foi transferida pela via transplacentária durante a gestação como forma de proteção (Remington e McLeod, 2001).

Durante muitos anos, a confirmação de suspeita clínica de toxoplasmose aguda foi determinada pela presença de anticorpos IgM específicos associados aos anticorpos IgG. Contudo, à medida que as técnicas mais sensíveis para a pesquisa de anticorpos IgM foram sendo desenvolvidas, problemas como a persistência de anticorpos IgM tornaram-se mais frequentes. Assim, a detecção de anticorpos IgM por longos períodos após a infecção pode levar a uma interpretação errônea dos resultados por atribuir excessivo valor aos níveis de anticorpos residuais, os quais são erroneamente interpretados como indicativo de infecção aguda, com sérias conseqüências, especialmente em gestantes (Ferreira e Camargo, 2002).

Com o intuito de auxiliar o clínico na elucidação do tempo de infecção pelo *T.gondii*, foram propostas as reações de avidéz de IgG, que permitem a distinção entre infecções agudas e crônicas (Hedman et al., 1989). O teste de avidéz de anticorpos IgG tem sido um marcador informativo porque a baixa avidéz é um indicador do diagnóstico de infecção recente, em combinação com um painel de anticorpos de diferentes classes, sobretudo IgM (Montoya e Liesenfeld, 2004), sendo este o teste mais indicado e aceito, já que permite, em uma única amostra de soro, determinar se a infecção é aguda ou não (Bobic et al., 2009). Estudo realizado para avaliar o valor diagnóstico da utilização de um painel de testes para detecção da infecção aguda pelo *T.gondii*, mostrou que a pesquisa conjunta de anticorpos

IgG, IgM, IgA e índice de avidéz, permite uma melhor estimativa do tempo de infecção (Roberts et al., 2001).

Com a utilização freqüente do teste de avidéz como método complementar no discernimento dos casos de IgM residual e definição de doença aguda, o perfil proposto por Camargo et al (1977) foi adaptado para uma nova classificação (Ferreira e Camargo, 2002), que subdivide o perfil sorológico da toxoplasmose aguda em duas fases, a saber: “recente aguda” e “recente não aguda”. O perfil “recente agudo” é caracterizado pela presença de anticorpos IgG e IgM específicos e baixa avidéz de anticorpos IgG, já no perfil “recente não agudo”, observa-se a presença de anticorpos IgG e IgM específicos e alta avidéz de anticorpos IgG. No perfil crônico, os anticorpos IgM são indetectáveis e os anticorpos IgG apresentam alta avidéz.

1.4 Diagnóstico laboratorial da toxoplasmose

Por muito tempo, a técnica de Sabin-Feldman foi utilizada em inquéritos soro-epidemiológico, sendo considerada como teste de referência para toxoplasmose, no entanto, a utilização de parasitas vivos e o possível risco de infecção do manipulador levaram o teste do corante a ceder lugar para técnicas mais seguras e de melhor aplicabilidade (Sabin e Feldman, 1948; Montoya e Liensfeld, 2004).

Assim, para suprir a dificuldade de manuseio e aplicabilidade deste teste surgiram outros métodos sorológicos que podem ser imunoenzimáticos, aglutinantes ou fluorimétricos. A reação de hemaglutinação baseia-se na formação de agregados visíveis como resultado da interação entre anticorpos específicos e a membrana dos eritrócitos sensibilizados com antígenos de *T.gondii*, sendo considerado um ensaio sensível e específico, fácil de ser realizado e com baixo custo, podendo ser utilizado no diagnóstico de triagem de inquéritos epidemiológicos. Outros tipos de reações com o mesmo princípio vêm sendo realizadas, através do emprego de parasitas tratados com formaldeído, cetona e

partículas de látex (Camargo, 2001). A técnica de aglutinação direta modificada (MAT) tem sido amplamente utilizada em muitas espécies de animais para evidenciar aglutininas anti-*Toxoplasma gondii*, através da interação entre anticorpos presentes no soro e taquizoítos inativados pela formalina, mostrando-se muito sensível, específica e de fácil realização, o que permite sua aplicação a campo (Dubey et al., 1985; Bertozzi et al., 1999).

A imunofluorescência indireta (IFI) baseia-se na capacidade de ligação do anticorpo a fluorocromos. A técnica utiliza taquizoítos íntegros e formolizados como antígeno, sendo que o anticorpo marcado deve ser purificado para aumentar a eficiência da coloração e evitar reações inespecíficas. A IFI é frequentemente utilizada para a detecção de IgM e IgG, porém a sensibilidade do teste é limitada ao nível de fluorescência detectável pelo olho humano (Goldsmith, 1998; Ferreira e Ávila, 2001).

Atualmente, os ensaios imunoenzimáticos de fase sólida, como o ELISA, são os mais utilizados na rotina laboratorial para detecção de anticorpos anti-*T.gondii*, já que permitem automação com custo reduzido. Na reação de ELISA, o antígeno é adsorvido à superfície de placas de poliestireno por meio de ligações não covalentes, permitindo a formação do imuno-complexo a partir da ligação dos anticorpos, presentes no soro, com os antígenos aderidos à placa. É interessante notar que o grau de pureza do antígeno ou do anticorpo da fase sólida é muito importante, pois qualquer material heterólogo competirá pelo espaço na placa. Após a sensibilização da placa com o antígeno, os sítios reativos da placa devem ser bloqueados com uma alta concentração de proteína (5mg/ml) para evitar reações inespecíficas. Em relação à amostra, é importante que esta seja ensaiada na faixa de concentração em que a curva dose-resposta do ELISA tenha grande inclinação, ou seja, na região em que pouca variação na concentração resulta em grande aumento da densidade óptica, assim é necessário diluir a amostra. As lavagens

entre as incubações do teste são feitas com tampão fosfato contendo Tween 20 a 0,05% para promover a dissociação das ligações mais fracas. Após a incubação da amostra para pesquisa de anticorpos, a lavagem pode ser realizada com solução de uréia que promove a dissociação de anticorpos de baixa avidéz. É preciso ressaltar que os conjugados devem ser preparados com anticorpos purificados e de alta afinidade. Para revelação da reação são utilizados substratos cromógenos que, devido à degradação enzimática, dão origem a produtos solúveis coloridos. Para a peroxidase, o substrato é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e os cromógenos ou doadores de hidrogênio mais utilizados são ortofenilenodiamina (OPD), ácido 5-amino salicílico, ortotoluidina, 2,2'-diazino do ácido etilbenzotiazolino sulfônico (ABTS) e tetrametilbenzidina (TMB). A peroxidase reduz a H_2O_2 levando à oxidação do segundo substrato, que dá origem a um produto de reação solúvel e colorido. A escolha do cromógeno deve levar em consideração vários fatores como sensibilidade, reação de fundo, estabilidade do composto, toxicidade e custo. Após o desenvolvimento da coloração, a densidade óptica da amostra deve ser determinada por espectrofotometria (Ferreira e Ávila, 2001).

Interessante notar que, vários estudos tem sido desenvolvidos com o intuito de aprimorar a sensibilidade e especificidade da reação de ELISA para pesquisa de anticorpos IgG anti-*T.gondii*. Assim, vários trabalhos têm proposto a utilização de antígenos recombinantes de *T.gondii* para o diagnóstico sorológico da toxoplasmose (Béla et al., 2008; Kotresha e Noordin, 2010; Elyasi et al., 2010). Da mesma forma, vários autores têm sugerido a utilização de peptídeos sintéticos derivados de antígenos de superfície (SAG1 e SAG2), antígenos dos grânulos densos (GRA1 e GRA7) e antígenos das roptrias (ROP1 e ROP2) do *T.gondii* (Hughes, 1981; Potasman et al., 1986; Begheto et al., 2006; Kato et al., 2007), inclusive com a utilização de MAPs (antígenos peptídicos múltiplos) como proposto recentemente por Araújo e Ferreira (2010). Entretanto, a composição e combinação

exata destes peptídeos para a utilização em imunoenaios é ainda uma questão que deve ser aprimorada.

Com o advento das técnicas de biologia molecular, a reação em cadeia pela polimerase (PCR) tem sido amplamente utilizada para detecção do agente em diferentes materiais biológicos como humor aquoso, sangue, lavado bronco pulmonar, líquido amniótico e urina, sendo uma reação de grande sensibilidade e especificidade utilizada, sobretudo no diagnóstico da infecção congênita (Kompalic-Cristo et al., 2005).

1.5 Avidéz de anticorpos IgG

Nos últimos anos, a determinação da avidéz de anticorpos IgG tem sido amplamente utilizada em testes imunoenzimáticos (ELISA) para determinação do período de infecção pelo *T.gondii*, discriminando infecções agudas e crônicas. Estes testes baseiam-se na afinidade do anticorpo que é definida pela força de ligação com o antígeno, sendo que esta interação é resultante de forças atrativas e repulsivas entre as moléculas envolvidas (Steward e Lew, 1985). Entretanto, para antígenos complexos, com múltiplos determinantes antigênicos, como o *T. gondii*, as reações antígeno-anticorpo envolvem a ligação de diversos epítomos com os anticorpos policlonais correspondentes. Assim, a força de ligação resultante de todas essas interações é denominada avidéz de anticorpos ou afinidade funcional (Underwood e Rook, 1992; Camargo, 2001; Bartoline e Ribela, 2005).

A produção de anticorpos policlonais requer uma série de reações celulares seqüenciais, que envolvem sinapses entre diversos tipos celulares, desde células apresentadoras de antígenos até células linfóides reguladoras, em locais específicos do tecido linfóide. O processo envolve a apresentação de antígenos e a seleção de clones responsivos de células T, o crescimento e ativação destes clones cooperando com células B produtoras de anticorpos e células T CD8⁺, e como terceira etapa, o aprimoramento da resposta pela seleção de clones de maior

afinidade e de células de memória. Este processo resulta na produção progressiva de anticorpos com maior afinidade pelo antígeno e células específicas de memória (McHeyzer-Williams e McHeyzer-Williams, 2005).

A mudança na afinidade dos anticorpos IgG durante a resposta imune adaptativa (Eisen e Siskind, 1964; Steiner e Eisen, 1967; Lappalainen e Hedman, 2004) depende da maturação e evolução temporal da resposta imune, sendo que a medida desta afinidade permite a distinção entre uma infecção primária recente e uma infecção passada ou crônica, e tem sido, nos últimos anos, uma ferramenta eficaz no diagnóstico temporal de diversas doenças infecciosas (Sensini, 2006; Flori et al., 2009).

A avidéz de anticorpos pode ser determinada por diversos métodos. As técnicas clássicas, baseadas no cálculo da constante de equilíbrio (Underwood e Rook, 1992), embora sejam os métodos quimicamente mais coerentes, não são aplicáveis em rotina diagnóstica devido à sua complexidade. Outros métodos de relativa complexidade, como o radioimunoensaio com duplo radioisótopo (Gaze et al., 1973; Underwood e Rook, 1992; Chargelegue et al., 1995) e curva dose resposta (Lehtonen e Meurman, 1982) também foram utilizados para estudar a afinidade dos anticorpos em diversas doenças.

Com o desenvolvimento dos testes imunoenzimáticos, a avidéz pôde ser determinada pelo emprego de agentes caotrópicos (Lehtonen e Meurman, 1982; Firer, 2001). No ELISA, a avidéz dos anticorpos IgG pode ser determinada pelo método da diluição, em que o agente caotrópico (Dietilamina ou Guanidina-HCl) é adicionado ao diluente do soro, impedindo a formação do complexo antígeno-anticorpo (Inouye et al., 1984; Devey et al., 1988; Thomas et al., 1992; Firer, 2001), ou através do método de eluição, em que o agente caotrópico (Uréia ou Tiocianato) é utilizado na lavagem da placa após a incubação do soro, levando à dissociação

do complexo antígeno-anticorpo (Pullen et al., 1986; Hedman e Seppala, 1988; Firer, 2001).

O método de inibição da ligação de anticorpos de baixa avidéz ao antígeno da fase sólida ou da diluição do soro com guanidina-HCl, foi utilizado para a determinação de anticorpos de baixa avidéz em infecções agudas e crônicas pelos vírus da encefalite japonesa, rotavírus e rubéola (Inouye et al., 1984). Baseado no mesmo princípio, a dietilamina (DEA) foi utilizada como agente caotrópico, na determinação da avidéz de anticorpos contra a toxina tetânica (Devey et al., 1988). Posteriormente, esta técnica foi também usada para determinar a avidéz de anticorpos IgG contra o vírus da rubéola (Thomas et al., 1992).

O princípio da eluição dos anticorpos de baixa avidéz, com finalidade diagnóstica, foi utilizada pela primeira vez em 1986 para determinação da avidéz de anticorpos IgG contra rubéola, sendo utilizado o tiocianato de amônio como agente caotrópico (Pullen et al., 1986). A uréia, como agente caotrópico para eluição dos anticorpos de baixa avidéz, foi introduzida em 1988, com melhores resultados do que diversos outros agentes como o SDS, tiocianato de amônio, pH ácido e guanidina - HCl para distinção entre infecção aguda e crônica pelo vírus da rubéola (Hedman e Seppala, 1988).

A técnica de determinação da avidéz por ELISA, utilizando a uréia como caotrópico, é a mais amplamente utilizada em diagnóstico temporal em infecções virais, como as causadas por Citomegalovírus (Blackburn et al., 1991), Sarampo (Pannuti et al., 2004), Dengue e Doença de Lyme (Assou, 2007).

Na toxoplasmose, a avidéz de anticorpos IgG tem sido, nos últimos anos, útil no diagnóstico da infecção aguda por *T. gondii*, como demonstrado por vários estudos (Araújo e Ferreira, 2010; Elyasi et al., 2010). A avidéz de IgG é uma ferramenta muito importante para o diagnóstico temporal da infecção primária aguda por *T. gondii* na gestação (Mioranza et al., 2008; Macre et al., 2009), já que o

uso preconizado da determinação da presença e título de anticorpos IgM (Camargo et al., 1978) foi prejudicado pelo avanço tecnológico das técnicas de medida deste anticorpo, que resultaram em detecção positiva por um tempo prolongado, nem sempre indicativo de infecção primária recente (Remington e McLeod, 2001, Peterson, 2007). A avidéz tem um uso seqüencial no diagnóstico da infecção fetal em neonatos após o nascimento, sendo que os anticorpos de alta avidéz maternos são substituídos por anticorpos de baixa avidéz do neonato, quando este teve infecção congênita mantida, resultando em queda da avidéz (Buffolano et al., 2004).

Vários estudos têm demonstrado a importância da avidéz de IgG no diagnóstico da toxoplasmose em indivíduos imunossuprimidos (Siteo et al., 2010), inclusive com descrição de casos de transmissão congênita em mães HIV positivas (Azevedo et al., 2010)

É necessário ressaltar que os testes convencionais de avidéz não permitem a quantificação direta dos anticorpos de baixa avidéz, possibilitando apenas uma estimativa da porcentagem destes anticorpos a partir dos resultados obtidos com os anticorpos totais e com os de alta avidéz. Neste trabalho, propomos um teste imunoenzimático (ELISA) que permita a recuperação e quantificação direta dos anticorpos de baixa avidéz. Isto seria interessante devido à alta prevalência destes anticorpos na fase aguda da infecção, podendo ser utilizados como marcadores da atividade da doença.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

2.1 Geral

- Padronizar uma reação imunoenzimática (ELISA), utilizando o pH como caotrópico para quantificação direta de anticorpos IgG de baixa avidéz anti-*T.gondii*.

2.2 Específicos

- Avaliar o poder caotrópico do tampão citrato fosfato em diferentes pHs frente à solução de uréia 6M em ELISA de IgG anti-*T.gondii*, utilizando soros de modelos experimentais de infecção;

- Determinar a concentração ótima de antígeno na placa e a diluição de trabalho do soro para a reação de ELISA avidéz de IgG anti-*T.gondii*, utilizando o pH como agente caotrópico;

- Comparar quantitativamente as reações de avidéz de IgG utilizando o pH ou a uréia como agente caotrópico;

- Avaliar por *western blotting* a especificidade antigênica dos anticorpos eluídos e renaturados em amostras de modelos experimentais e de soro humano;

- Avaliar a reprodutibilidade intra e inter teste da reação de ELISA avidéz, utilizando o pH como agente caotrópico;

- Avaliar o tempo de renaturação dos anticorpos de baixa avidéz após eluição em pH, visando à quantificação de IgG por ELISA avidéz;

- Avaliar a determinação percentual de anticorpos de alta avidéz por ELISA, correlacionando os resultados da avidéz de anticorpos IgG obtidos pela uréia 6M e pelo pH em amostras de soros experimentais e humanas;

- Avaliar a relação entre a medida direta da IgG de baixa avidéz eluída em pH e renaturada com a estimativa indireta por diferença entre a IgG total e a IgG de alta avidéz determinada pela uréia e pelo pH em amostras de soros de modelos experimentais e humanas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram realizados no laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, USP, após anuência da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – IMTSP) e da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP (CAPPesq).

3.1 Parasitas

Para manutenção das cepas RH e ME49 de *T.gondii* foram utilizados camundongos Swiss não isogênicos e C57Bl/6j isogênicos fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina USP. Esses animais foram mantidos no Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, permanecendo em estantes ventiladas, com ar estéril e ventilação forçada, sendo alojados em gaiolas de plástico contendo maravalha de pinho autoclavada. A manipulação dos animais foi conduzida de acordo com o “Manual Sobre Cuidados e Uso de Animais de Laboratório” (ISBN 0-309-05377-3), preconizado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA.

3.1.1 Cepa RH

Suspensões de taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* foram obtidas por meio de sucessivas passagens, por via intraperitoneal, com intervalos de 3 a 4 dias, em camundongos Swiss não isogênicos, pesando em torno de 20 g, e com idade variando entre 30 e 60 dias. Os animais previamente infectados foram submetidos à eutanásia por narcose em câmara de CO₂ e o peritônio lavado com 5 ml de solução salina tamponada com fosfato 0,01M pH 7,2 (PBS) estéril contendo Penicilina Cristalina 2500 UI/ml e Estreptomicina 10 mg/ml. A suspensão antigênica foi purificada por filtração em membrana de policarbonato de 5 µm, e os parasitas quantificados em câmara de Neubauer em microscópio de contraste de fase.

3.1.2 Cepa ME49

A cepa ME 49 cistogênica foi obtida através de sucessivas passagens com intervalos de 30 a 45 dias, em camundongos C57BL/6j isogênicos. Os animais cronicamente infectados foram submetidos à eutanásia por narcose em câmara de CO₂ e os cérebros macerados em PBS. Uma alíquota da suspensão cerebral foi examinada para a quantificação do número de cistos em microscopia óptica convencional e, em seguida, diluída em PBS, sendo que cada animal foi inoculado por via oral com 10 cistos por sonda oral.

3.2 Infecção Experimental em coelhos

Para estudo da maturação da avidéz de anticorpos IgG anti- *T. gondii* foram utilizados seis coelhos recém desmamados (New Zealand) com sorologia prévia negativa para toxoplasmose pelo ELISA. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina - USP e foram mantidos no Biotério do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, em gaiolas individuais, mantidas em salas ventiladas e isoladas com acesso restrito às pessoas envolvidas na pesquisa.

Para colheita de sangue e procedimentos invasivos, os animais foram sedados de acordo com o protocolo descrito na tabela 1. A eutanásia foi realizada com superdosagem dos anestésicos utilizados no procedimento anterior.

Tabela 1 - Drogas utilizadas nos procedimentos de sedação e eutanásia dos animais estudados.

| | | |
|--------------------------|------------------|--|
| Coelhos (New Zealand) | Sedação | Clorpromazina: 0,75 mg/kg (IM) Midazolam: 0,2 mg/Kg (IM) Atropina: 0,044mg/KG (IM) Cloridrato de cetamina: 35mg/Kg (IM) Xilazina: 5mg/Kg(IM) |
| | Eutanásia | Clorpromazina: 0,75 mg/kg (IM) Cloridrato de cetamina: 35mg/Kg (IM) |

3.2.1 Preparação e quantificação de inóculo

Para infecção dos seis coelhos foram utilizados cistos de *T.gondii* obtidos do cérebro de camundongos C57BL/6j cronicamente infectados com a cepa ME 49

como descrito no item 3.1.2. Os cérebros dos animais foram retirados e homogeneizados em solução de Hank's (HBSS) com 30% de dextran, centrifugados a 3000g a 4°C por 10 minutos e o sedimento suspenso em HBSS. A quantificação dos cistos foi realizada por microscopia óptica com contraste de fase e a suspensão final foi ajustada para um volume contendo 500 cistos/ml, diluídos em PBS, para inoculação subcutânea.

3.2.2 Delineamento Experimental

Os animais foram inoculados por via subcutânea com 5×10^2 cistos da cepa ME 49. A infecção foi acompanhada por até 24 semanas, com colheitas semanais de sangue e avaliação diária do estado clínico geral dos animais. Parte dos animais foi submetida à eutanásia com seis semanas de infecção e o restante com 24 semanas.

3.3 Sorologia

3.3.1 Soros humanos

Foram utilizadas 150 amostras de soro de pacientes adultos, provenientes do banco de material biológico do Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, previamente triadas por ELISA e IFI para *T.gondii*.

3.3.2. Ensaio imunoenzimático (ELISA)

3.3.2.1 Preparo do extrato antigênico solúvel

A preparação do extrato antigênico para o ELISA foi realizada a partir de uma concentração de 10^8 parasitas/mL, provenientes de animais infectados com a cepa RH de *T. gondii* como descrito no item 3.1.1. Suspensões purificadas de *T.gondii* foram adicionadas de 5 mL de água destilada e submetidas à ruptura sônica (Sonic Dismembrator, Quigley-Rochester Inc.,USA), a 40 ciclos por 5 a 10 períodos de 30 segundos em banho de gelo até a lise completa dos parasitas, sob observação em microscopia. Após essa etapa, foi adicionada solução de NaCl 0,3M para manter a osmolaridade da solução. Em seguida, a solução foi centrifugada a 10.000g por 30 minutos a 4°C, em centrífuga refrigerada Eppendorf 5403, e o sobrenadante

utilizado como antígeno salino solúvel. A dosagem protéica foi realizada pelo método Bradford (Bradford, 1976), utilizando gama-globulina humana como padrão e o antígeno foi distribuído em alíquotas de 0,5mL e armazenado a -70°C.

3.3.2.2 ELISA para avidéz de IgG por eluição com Uréia 6M

Placas de poliestireno de 96 poços, certificadas para alta ligação de proteínas (Costar®), foram sensibilizadas com 100µL/poço de solução de tampão carbonato de sódio 0,1M pH 9,5 contendo antígeno protéico solúvel de *T.gondii* (10µg/mL). Após sensibilização por 20hs a 4°C em câmara úmida, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS 0,01M pH7,2, contendo 0,05% de Tween 20 (PBST) e bloqueadas com 0,3% de solução de leite desnatado (Molico®) em PBST (PBSTL) por uma hora em estufa a 37°C. Na incubação da amostra, dois conjuntos de duas duplicatas de amostras de soro 100µL/poço em diluições seriadas (1/100, 1/200 e 1/400) foram incubados por 1 hora, sendo a seguir lavadas cinco vezes com PBSTL. A seguir, um conjunto de duplicatas de cada amostra recebeu 100 uL de solução caotrópica de Uréia 6M em PBS 0,02M pH 7,2 enquanto que o segundo conjunto de duplicatas da mesma amostra foi mantido repleto de PBSTL. Após 10 minutos de incubação a 37° C, a placa foi lavada e, em seguida, foram adicionados 100 µL/poço de conjugado imunoenzimático anti-IgG humano marcado com peroxidase (Sigma®) e as placas foram mantidas por 1 hora a 37°C. Após lavagem, a revelação da reação foi feita pela adição de solução citrato de sódio 0,05M pH 5,8, contendo OPD 0,4mg/mL e H₂O₂ 0,03%, por 30 minutos em câmara escura, seguida de estabilização pela adição de HCl 4N. A avidéz de anticorpos IgG (AV) foi determinada através da comparação dos valores de absorbância de uma diluição da amostra, total ou após eluição com o caotrópico (Prince & Wilson, 2001), sendo os valores expressos em porcentagem de acordo com a fórmula:

$$\text{Medida AV} = \frac{\text{Absorbância após eluição com o caotrópico}}{\text{Absorbância total da amostra}} \times 100$$

3.3.2.3 ELISA para medida direta de anticorpos de baixa avides por eluição ácida e neutralização

O processamento da placa de ELISA nas fases iniciais e finais foi semelhante ao descrito no item 3.3.2.2. Na incubação da amostra três conjuntos de duas duplicatas de amostras foram utilizados. Inicialmente, dois conjuntos foram incubados com amostras de soro 100µL/poço em diluições seriadas por 1 hora, enquanto o terceiro conjunto foi mantido repleto de PBSTL, livres para reações posteriores. Após cinco lavagens, o primeiro e terceiro conjuntos foram repletos de PBSTL, sendo que o segundo conjunto recebeu 100µL/poço de tampão citrato fosfato 0,2M pH 3,5, com incubação por 10 minutos a 37°C. A seguir, o conteúdo foi transferido para o terceiro conjunto, sendo imediatamente neutralizado com 12 µL de Tris-HCl 2M pH 8,5, com controle por indicador colorimétrico. O segundo conjunto recebeu PBSTL, com incubação por 1 hora a 37°C. Após lavagens, a placa foi submetida ao processamento posterior convencional descrito no item 4.3.2.3. Esta abordagem permitiu a determinação direta de anticorpos de baixa avides, pela determinação da densidade óptica de IgG presente nos poços com a amostra eluída e neutralizada.

3.4 Western blotting

Amostras de soro humano e soro de coelhos, experimentalmente infectados, foram submetidas à técnica de *western blotting* para avaliação da especificidade antigênica dos anticorpos de baixa avides.

Para realização do *western blotting*, amostras de taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* purificadas foram submetidas à análise de mobilidade eletroforética e constituintes protéicos por meio de SDS-PAGE (Laemmli, 1970), num sistema descontínuo e desnaturante utilizando o sistema Mini-Protean II (BIO-RAD®), utilizando gel de empilhamento a 5% e gel de corrida em gradiente 5-20%. Todas as amostras, bem como, o padrão de baixo peso molecular (Pharmacia®), foram desnaturadas após a dissolução v/v em tampão de amostra (Tris – HCl 0,0625M,

SDS 2%, glicerol 10%, β -Mercaptoetanol 5%, uréia 1M, Azul de Bromofenol 0,001), e aquecimento em banho-maria a 100°C por 3 minutos, em uma concentração de 300 μ g/mL e a corrida eletroforética foi realizada na presença de tampão de corrida contendo Tris 0,025M, glicina 0,192M e SDS 1% pH 8.3 a 120V (20-30 mA) por cerca de 1 hora.

Após eletroforese, as proteínas de *T. gondii* foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Milipore®), em sistema de transferência semi-seco Trans-Blot RD (BIO-RAD®) para posterior ensaio. O gel foi colocado sobre membrana de nitrocelulose, envolta por folhas de papel filtro, embebidas em tampão de transferência de Towbin (Tris 25mM, glicina 192mM, metanol 205, pH 8.1-8.5). A transferência foi conduzida a 10V com amperagem constante por 30 minutos. Em seguida, a membrana foi corada com solução de Ponceau 0,5% para verificação da eficiência da transferência.

As membranas foram bloqueadas por imersão em 20 mL de solução de PBS 0,01M pH 7.2 contendo 0,05% de Tween-20 e 5% de leite desnatado (PBSTL) durante 2 horas sob agitação em temperatura ambiente. Após o bloqueio, as membranas foram lavadas três vezes com PBS 0,01M pH 7.2 contendo 0,05% de Tween-20, cortadas em tiras de aproximadamente 5mm e colocadas em bandejas de incubação com canaletas de 10,5cm x 5mm (BIO-RAD®), onde foram incubadas *overnight* a 4°C sob agitação com 1mL de cada amostra a saber: a) soros totais (1/200), b) resistentes ao caotrópico e removidos pela dissociação do complexo imune por glicina 0.1M pH 2.5 e c) sensíveis ao pH, neutralizados após eluição pela adição de tampão Tris-HCl 2M pH 8.5. Decorrido o tempo de incubação, as membranas foram lavadas cinco vezes em intervalos de dois minutos com PBST e incubadas em temperatura ambiente por 1 hora, sob agitação constante, com 1mL de conjugado imunoenzimático marcado com peroxidase. As membranas foram submetidas a mais cinco lavagens, e a reação foi revelada com solução cromógena

diaminobenzidina 1,0 mg /mL em tampão citrato 0,1M pH 6.0 contendo H₂O₂ 0,01% e interrompida por lavagem com H₂O milliQ logo após o aparecimento das bandas.

3.5 Análise Estatística

A comparação entre a quantidade de anticorpos IgG entre os diferentes testes foi realizada por correlação de Pearson e expressa como r^2 . A comparação entre dados quantitativos dos grupos foi feita pelo teste-t ou ANOVA com pós-teste de Bonferroni. As correlações foram consideradas significantes quando a probabilidade de igualdade entre elas foi menor que 5% ($p < 0,005$).

4 RESULTADOS

4.1 Padronização inicial de condições de determinação da avidéz de IgG por pH em coelhos experimentalmente infectados por *T.gondii*

4.1.1 Evolução da avidéz de IgG em coelhos experimentalmente infectados por *T.gondii*

Seis coelhos foram experimentalmente infectados como descrito em Métodos (item 3.2), com coletas semanais de sangue. A determinação dos títulos de IgG anti-*T.gondii* e da avidéz de IgG, utilizando uréia 6M como caotrópico, bem como a evolução da maturação da avidéz podem ser vistos na Figura 2. Podemos observar padrão de resposta de produção de anticorpos e de maturação da avidéz característicos da infecção, com níveis elevados de IgG de baixa avidéz nas primeiras semanas de infecção e subsequente substituição dos anticorpos de baixa avidéz por anticorpos de alta avidéz, a partir da 15ª semana da infecção original. Este modelo experimental permite avaliar soros com diferentes níveis de avidéz e atinge perfeitamente os objetivos para uma padronização de ensaios de avidéz, utilizando o pH como agente caotrópico.

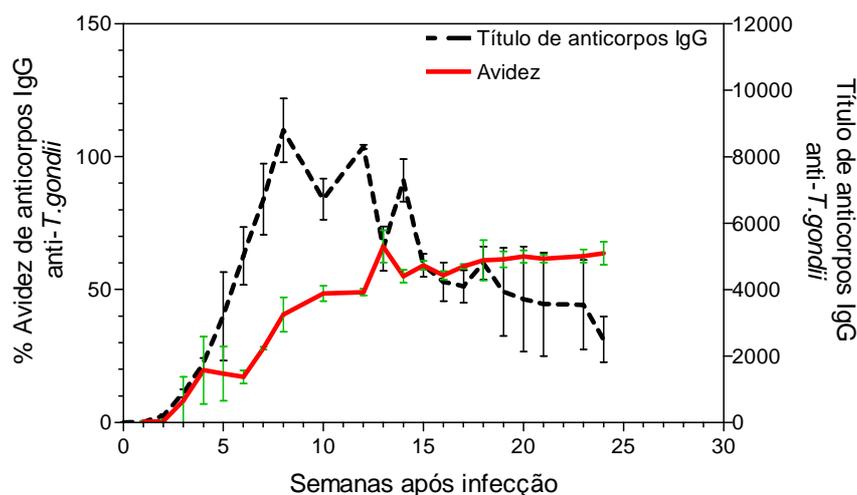


Figura 2 - Evolução da maturação da avidéz de IgG anti-*T.gondii* por ELISA, utilizando uréia 6M como caotrópico. A linha preta tracejada mostra os títulos de anticorpos e a linha vermelha a avidéz de IgG, obtidos nos soros de coelhos experimentalmente infectados, sendo que as barra de erro representam o erro padrão da média de cada medida.

4.1.2 Determinação do poder caotrópico de diferentes pHs e sua comparação com o poder caotrópico da uréia 6M em ELISA de IgG anti-*T.gondii*, utilizando soros de coelhos experimentalmente infectados com diferentes níveis de avides

Para avaliar o poder caotrópico de soluções de diferentes pHs, foram realizados ensaios de ELISA avides, como descrito em Métodos (item 3.3.2). Foram utilizados soluções de tampão citrato - fosfato de sódio 0,2M, a partir de soluções padrões de forma a obter soluções com pHs variando de 2,5 a 4,0 em escala de 0.5 pH. Para padronização desta reação, ensaiamos soros de coelhos experimentalmente infectados com *T.gondii*, utilizando amostras em fases conhecidas de infecção (aguda e crônica), que foram testadas em placas adsorvidas com extrato protéico solúvel de *T.gondii* (10µg/mL). Os resultados foram comparados com aqueles obtidos pelo caotrópico usual, uréia 6M. Os resultados obtidos podem ser vistos na Figura 3, onde também é apresentada a correlação de valores de avides obtidos por pH e por uréia. Como podemos observar, o uso de soluções com pH abaixo de 3,0 como agentes caotrópicos mostrou uma dispersão maior dos valores com excessiva remoção de anticorpos, enquanto que o uso de solução pH 4.0 como caotrópico não removeu a maior parte dos anticorpos, inclusive aqueles de baixa avides. A avides obtida com tampão citrato fosfato de sódio em pH 3,5 apresentou a melhor correlação ($r^2=0,9857$), quando associada a avides medida por uréia 6M, o que justificou seu uso nos ensaios subseqüentes.

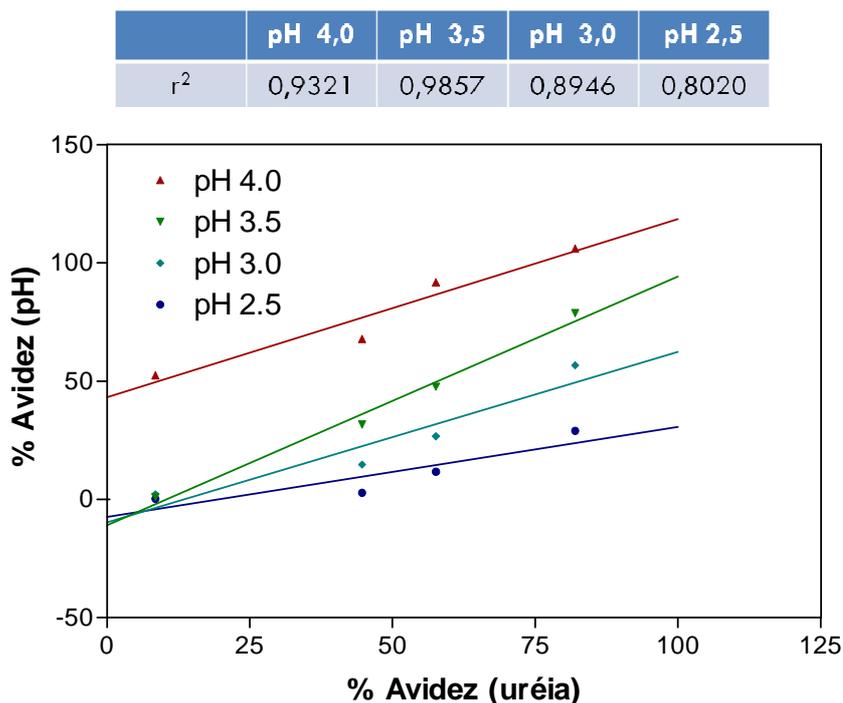


Figura 3 - Uso de soluções de diferentes pHs como caotrópico em ELISA avidéz, utilizando 04 soros de coelhos experimentalmente infectados com *T.gondii*. Correlação dos resultados da avidéz de anticorpos IgG obtidos pela uréia 6M e pelo tampão citrato fosfato de sódio

4.1.3. Determinação da concentração ótima de adsorvente para a reação de ELISA avidéz de IgG anti-*T.gondii*, utilizando solução pH 3.5 como caotrópico em soros de coelhos experimentalmente infectados com diferentes níveis de avidéz

O aprimoramento de uma reação de ELISA passa pela influência da concentração de adsorvente específico na fase sólida, no caso extrato protéico solúvel de *T.gondii* produzido como descrito em Métodos (item 3.3.2.1), uma vez definido o pH mais semelhante ao caotrópico usual. Para tanto, a reação ELISA avidéz pH 3.5 foi ensaiada com duas concentrações de antígeno na fase sólida da placa, a saber 10 μ g/mL ou 1 μ g/mL, utilizando um painel de soros com diferentes níveis de avidéz de IgG obtidos de coelhos experimentalmente infectados, que pode ser visto na figura 4. Pode ser observado pelos resultados e pela dispersão dos valores, que a reação foi mais discriminante em placas adsorvidas com 10 μ g/mL com maior dispersão de valores, sem perda de sinal em nenhuma das

reações utilizadas, sendo que em placas adsorvidas com 1 µg/mL, houve uma menor intensidade da reação que poderia ocasionar em resultados falso negativos. Assim, a concentração de 10 µg/ml no adsorvente da placa foi utilizada nos ensaios subsequentes.

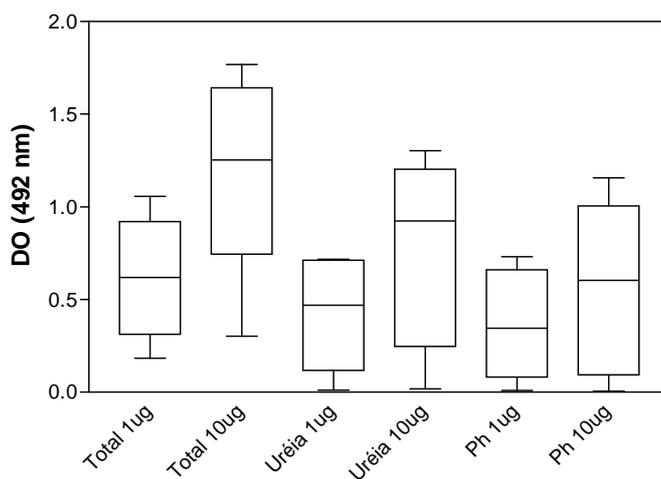


Figura 4 - Avaliação da concentração de extrato protéico antigênico de *T.gondii* (1µg/mL e 10µg/mL) para utilização no ELISA avidéz. Total: IgG ELISA sem caotrópico; Uréia: IgG ELISA após lavagem com uréia 6M; pH: IgG ELISA após lavagem com pH 3,5. A quantidade em µg expressa o adsorvente na fase sólida. A barra de erro, a caixa e a linha central expressam respectivamente a dispersão, os percentis 5 - 95% e a mediana dos valores analisados. Todos os valores apresentados foram calculados em relação ao *cut-off* dos controles negativos da reação de IgG ELISA sem caotrópico

4.1.4. Determinação da diluição de trabalho do soro para a reação de ELISA avidéz de IgG anti-*T.gondii*, utilizando solução pH 3.5 como caotrópico em soros de coelhos experimentalmente infectados com diferentes níveis de avidéz

A diluição do soro também é fator importante em ELISA IgG e para sua padronização, ensaiamos diferentes diluições de soros de animais experimentalmente infectados em ELISA IgG e em avidéz IgG por pH, sendo os resultados apresentados na Figura 5. Notamos que as reações foram mais eficientes em menores diluições de soro (1/100 ou 0.01), porém com menor relação entre os caotrópicos na determinação da avidéz. A diluição maior (1/400 ou 0.0025)

causou um desvio inadequado do cálculo da avidéz, impedindo seu uso, pela interferência dos valores baixos obtidos após as lavagens da placa. Na diluição 1/200 do soro ou 0,005 ocorreu uma boa determinação da reação de ELISA IgG e uma melhor relação entre as medidas de avidéz com uréia 6M e pH 3.5 ($r^2=0.7385$). Assim sendo, esta diluição de soro foi utilizada nos ensaios subseqüentes.

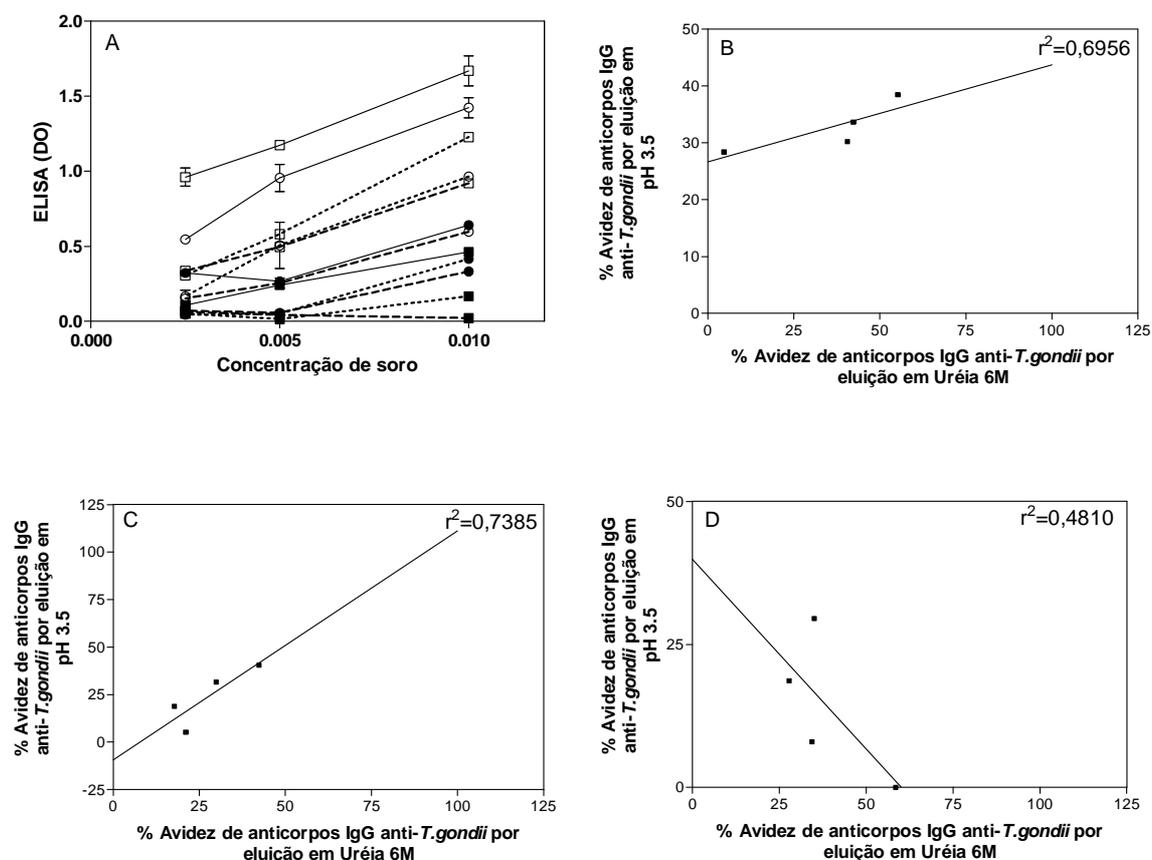


Figura 5 - Avaliação da influência da diluição do soro na reação de ELISA avidéz com uréia 6M ou pH 3.5 como caotrópicos. A: ELISA IgG realizada com diferentes diluições de soro e com diferentes caotrópicos. Símbolos abertos: soros de alta avidéz; Símbolos sólidos: soros de baixa avidéz; Linhas sólidas: ELISA total; Linhas tracejadas: após lavagem com uréia 6M; Linhas pontilhadas: após lavagem com pH 3.5. B: Correlação entre avidéz determinada por uréia ou pH 3.5 na diluição 1:100 ou concentração de soro 0.01; C: Correlação entre avidéz determinada por uréia ou pH 3.5 na diluição 1:200 ou concentração de soro 0.005; D: Correlação entre avidéz determinada por uréia ou pH 3.5 na diluição 1:400 ou concentração de soro 0.0025. As retas representam a inclinação da relação e o valor de r^2 é expresso dentro da figura.

4.2 Avaliação comparativa da determinação da avidéz por eluição com uréia 6M ou pH3.5 em reação de avidéz padronizada com soros experimentais

4.2.1. Avaliação Quantitativa

Uma vez determinados os parâmetros iniciais mais confiáveis do ensaio de ELISA avidéz, utilizando o pH como caotrópico, avaliamos a avidéz de IgG em todas as amostras de soros de coelhos, utilizando a medida clássica de avidéz que consiste na porcentagem de anticorpos resistentes ao caotrópico e correlacionamos os resultados obtidos para ambos os caotrópicos, uréia 6M e pH 3,5. Na figura 6, verificamos que houve uma excelente correlação ($r^2 = 0,9909$) entre os valores de avidéz obtidos com os dois caotrópicos, embora com inclinação e valores iniciais semelhantes, mas não iguais. Como pode ser observado, ocorre uma diferença importante entre a inclinação perfeita, que seria 1.0 e a inclinação obtida, 0.8545, o que mostra diferença entre os dois tipos de caotrópicos utilizados.

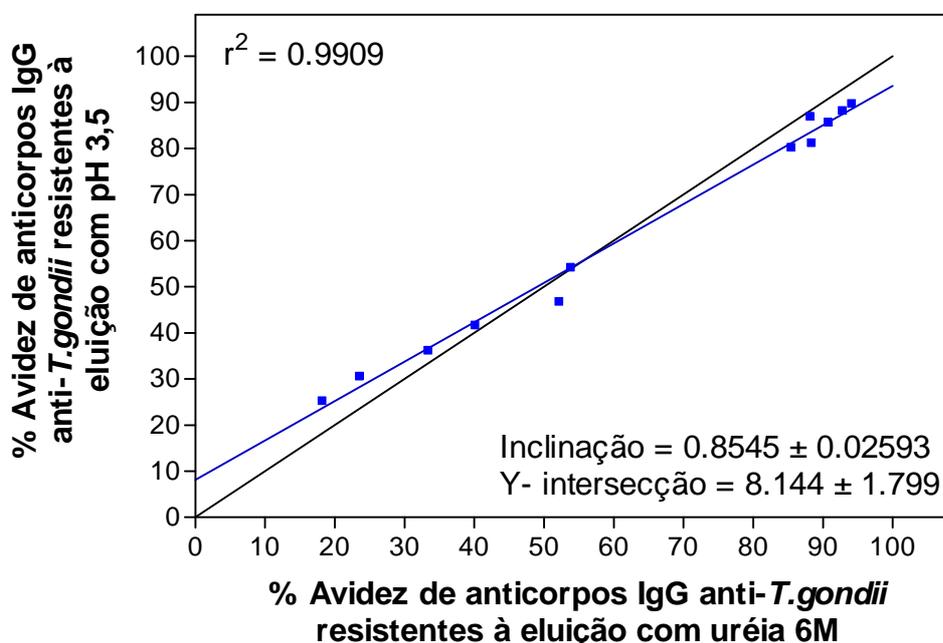


Figura 6 - Avaliação da avidéz de IgG em 12 amostras de soros de coelhos experimentalmente infectados com *T.gondii*, correlacionando os valores de avidéz por uréia 6M e pelo tampão citrato fosfato de sódio pH 3,5.

4.2.2 Avaliação Qualitativa

Um aspecto importante na avaliação de reações sorológicas de avidéz é seu caráter qualitativo, de maior aplicabilidade prática que valores quantitativos individuais. Avaliamos a distribuição de freqüência de definição qualitativa de avidéz pelo critério de valor > 50% de anticorpos resistentes ao caotrópico como definição de alta avidéz, como habitualmente empregados em reações utilizando o cálculo pela calorimetria do ELISA. Esta distribuição pode ser observada na tabela 2, onde podemos verificar que há uma grande concordância de valores, embora a avidéz com pH 3.5 apresente maior freqüência de soros de baixa avidéz que a avidéz com uréia 6M. Avaliamos os valores de sensibilidade e especificidade da avidéz obtida com o tampão citrato fosfato em pH 3,5, em relação a avidéz usual realizada com uréia 6M.

Tabela 2 - Distribuição qualitativa da avidéz determinado por uréia 6M ou por pH 3.5 nas amostras utilizadas. Valores de comparação são apresentados abaixo, com os respectivos intervalos de confiança.

| Avidéz com pH 3,5 | Avidéz com Uréia 6M | | |
|-------------------|---------------------|--------------|-------|
| | Alta avidéz | Baixa avidéz | Total |
| Alta avidéz | 07 | 0 | 07 |
| Baixa avidéz | 01 | 04 | 05 |
| Total | 08 | 04 | 12 |

Sensibilidade = 87,5% (IC 95%: 46,7 -99,3); **Especificidade** =100,0% (IC 95%: 39,6 – 100,0); **Valor preditivo positivo** = 100,0% (IC 95%: 56,1 – 100,0); **Valor preditivo negativo** = 80,0% (IC 95%: 29,9 – 98,9).

4.3 Caracterizações dos anticorpos frente a diferentes caotrópicos

4.3.1 Caracterização dos anticorpos de alta avidéz

Para avaliar a identidade dos anticorpos de alta avidéz resistentes tanto a uréia como ao pH 3,5, ensaiamos uma reação de ELISA realizando lavagens com os dois caotrópicos de forma seqüencial. Assim, anticorpos ligados eram submetidos à lavagem com uréia 6M ou pH 3,5 e depois submetidos a nova lavagem com caotrópico diferente, para avaliar a identidade do tipo de anticorpo

removido ou resistente. Se um caotrópico removesse anticorpos totalmente diferentes do outro caotrópico, então a fração de avides seria mantida mesmo nos anticorpos resistentes a outro tipo de caotrópico. Como pode ser observado na figura 7, há uma grande identidade dos anticorpos de alta avides resistentes a ambos os caotrópicos, embora cada um deles tenha uma pequena variação quanto à capacidade de retirada de anticorpos de baixa avides. Isto apenas demonstra a semelhança do efeito caotrópico do pH e da uréia, embora com diferenças.

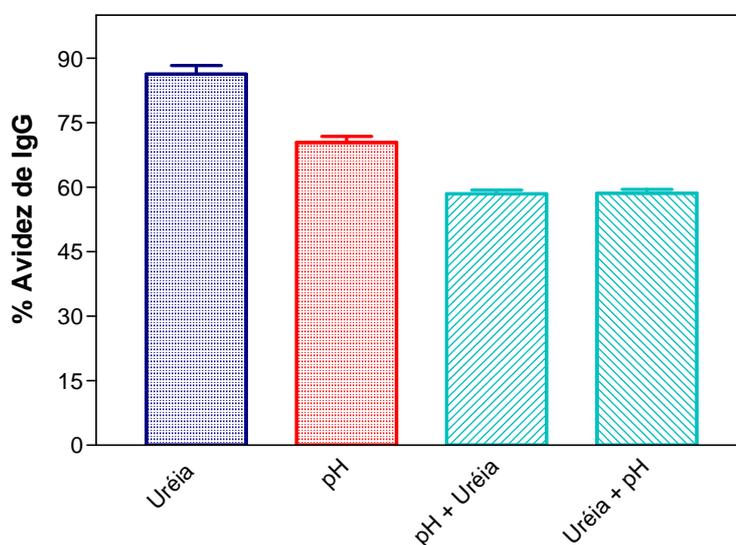


Figura 7 - Resistência dos anticorpos de alta avides (>50%) à remoção por diferentes caotrópicos. Ensaio apresentado na forma de avides estimada com lavagens com uréia, pH ou seqüência de caotrópicos. Os resultados são a média dos resultados de 10 soros de alta avides e as barras representam o erro padrão desta média.

4.3.2 Especificidade antigênica dos anticorpos eluídos e renaturados por diferentes caotrópicos em amostras experimentais

A especificidade e a reatividade dos anticorpos de coelhos presentes na solução eluída da reação de ELISA avides por pH 3,5 foram avaliadas frente a antígenos de *T.gondii* separados por SDS-PAGE e transferidos a membranas de nitrocelulose (*western blotting*), como descrito em métodos (item 3.4). As frações dos anticorpos podem ser vistas na Figura 8. Pode-se notar bandas antigênicas reconhecidas pelos anticorpos eluídos pelo pH (baixa avides) após neutralização, com padrões um pouco diferentes do ponto de vista qualitativo entre anticorpos de

baixa avidéz e anticorpos de alta avidéz, certificando que na solução eluída existe anticorpos de baixa avidéz.

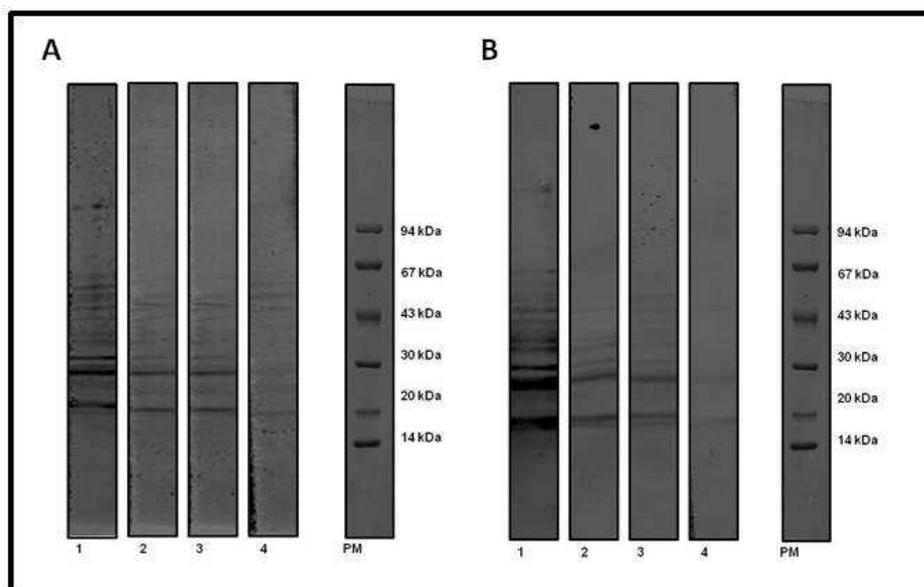


Figura 8 - Reatividade dos anticorpos de baixa avidéz, presentes na solução eluída pelo pH 3,5 em amostras de soro de alta avidéz (A) e de baixa avidéz (B), provenientes de coelhos experimentalmente infectados com *T.gondii*. 1: Anticorpos totais; 2: Anticorpos resistentes a uréia 6M; 3: Anticorpos resistentes ao pH 3,5; 4: solução eluída pelo pH 3,5.

4.4 Ensaio de amostras humanas na reação de ELISA avidéz por pH

4.4.1 ELISA IgG e ELISA avidéz com diferentes caotrópicos

Uma vez caracterizada a reação de avidéz de IgG por pH em amostras experimentais, ensaiamos 150 amostras humanas da soroteca do laboratório de Protozoologia nas condições definidas acima, com apenas substituição do conjugado específico. A reação foi feita também em paralelo com reação de avidéz com uréia 6M e a distribuição dos valores obtidos pode ser vista na figura 9. Como pode ser observada pela distribuição dos valores na figura 9A, a lavagem por cada um dos caotrópicos promoveu a retirada de parte dos anticorpos na reação de ELISA, com distribuição similar, sendo que a média dos soros era significativamente menor em cada um deles ($p < 0.001$ ANOVA), quando comparada ao total, mas semelhante entre si ($p > 0.05$) pelo pós-teste de Bonferroni. Esta diferença poderia

ser significativa quando comparada à capacidade porcentual em cada soro, portanto, calculamos a avidéz para cada soro individual e determinamos a diferença entre essa medida por uréia e por pH, exposta como delta, sendo os dados apresentados na figura 9B. Notamos que nas amostras de soros humanos, a avidéz por pH foi maior em cerca de 10% em média que a avidéz por uréia, mostrando que os diferentes caotrópicos extraem uma população de anticorpos de alta avidéz semelhante, mas não igual.

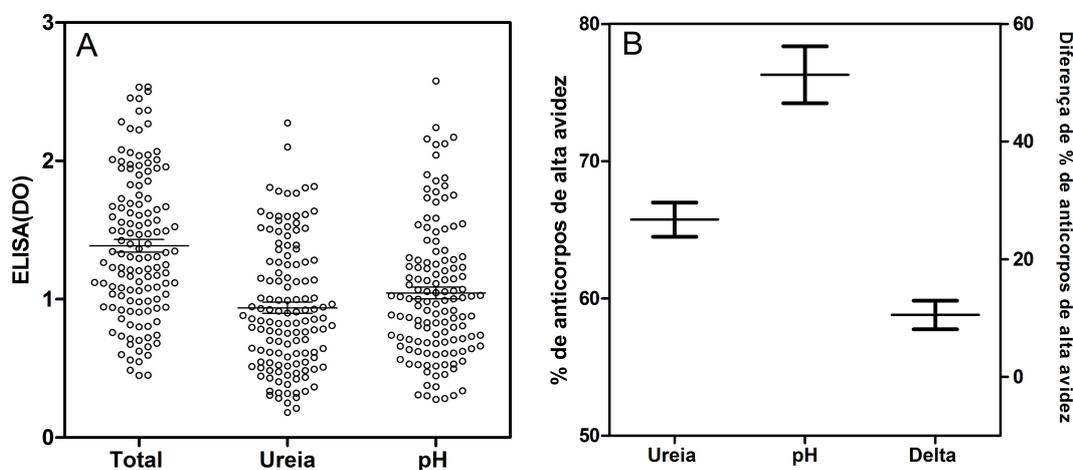


Figura 9 - Elisa de avidéz por pH e uréia em soros humanos. A: Distribuição de valores de ELISA total ou com eluição por diferentes caotrópicos em soros humanos. B: Distribuição da média da determinação da avidéz por diferentes caotrópicos (uréia e pH) ou a diferença entre a avidéz por pH e a avidéz por uréia (Delta). As barras representam a média e o erro padrão da média de cada distribuição.

A comparação entre os valores de anticorpos de alta avidéz obtidos pelos dois tipos de caotrópicos pode ser observada na figura 10. Como pode ser observado existe uma correlação boa entre os dois tipos de caotrópicos ($r^2=0,6987$), quando comparados por seus valores de reação, como seria esperado pelos resultados anteriores. Esta correlação na realidade depende da quantidade total de anticorpos nos ensaios, já que como demonstramos anteriormente, a fração não retirada de anticorpos de alta avidéz é semelhante entre os dois caotrópicos.

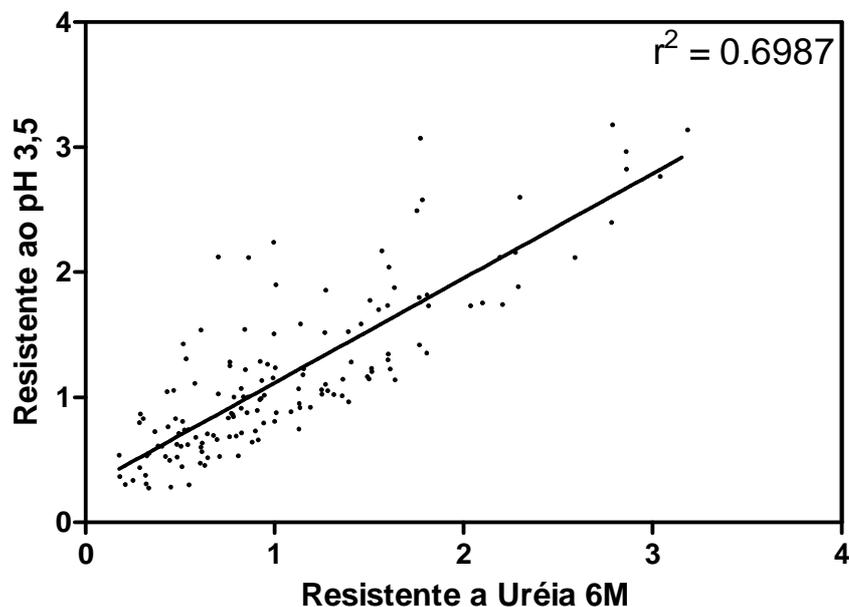


Figura 10 - Comparação entre os resultados de anticorpos de alta avidéz (DO) obtidos por eluição dos anticorpos de baixa avidéz com uréia 6 M ou pH 3.5. A reta de regressão é apresentada e o valor de r^2 apresentado no inserto da figura.

A partir dos valores obtidos na reação de ELISA com eluição pelos diferentes caotrópicos, podemos comparar a avidéz, por porcentagem, nas amostras estudadas, cuja relação pode ser vista na figura 11. A comparação entre os dois tipos de caotrópicos mostra a existência de uma relação muito menos importante entre eles, com um impacto associado menor, embora significativo. Este achado seria esperado pelos resultados anteriores, onde mostramos que apesar de semelhantes, a determinação porcentual da avidéz pelos diferentes caotrópicos sofre diversos tipos de interferências, o que resulta na correlação encontrada.

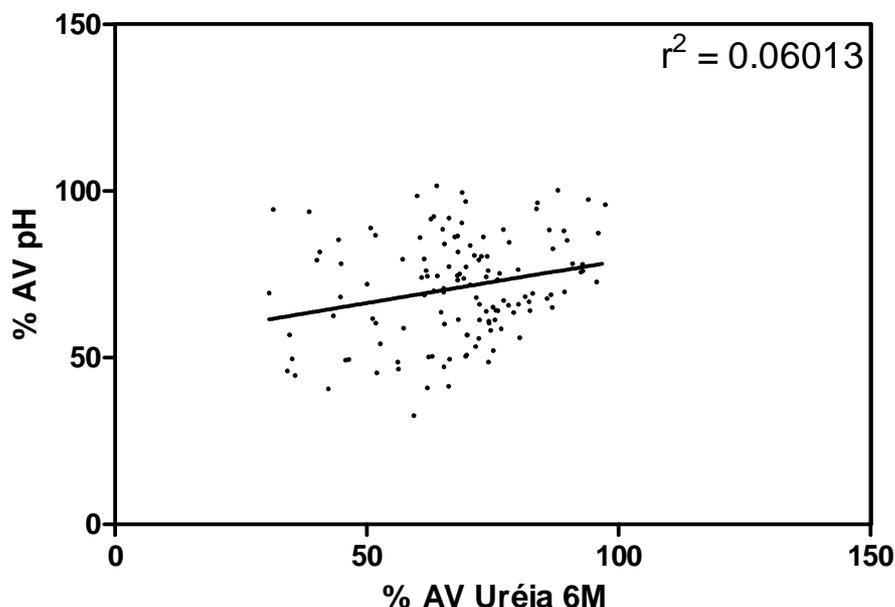


Figura 11 - Avaliação da determinação percentual de anticorpos de alta avides (avides clássica >50%) por ELISA, correlacionando os resultados da avides (AV) de anticorpos IgG obtidos pela uréia 6M e pelo pH 3,5 em amostras de soro humano.

4.4.2 Reprodutibilidade intra e inter teste

A reprodutibilidade da reação de ELISA avides com pH 3,5 foi testada ensaiando-se amostras padrões de soros de diferentes reatividades e níveis de avides em testes múltiplos na mesma placa, para o estudo da reprodutibilidade intrateste e realizadas nas mesmas amostras em dias diferentes e em placas diferentes, para o estudo da reprodutibilidade inter teste. Observamos o coeficiente de variação e a relação entre testes na Tabela 3, onde podemos observar que houve uma pequena variação <5% para a maioria das medidas e apenas os testes com pH mostraram uma variação um pouco maior, mas com uma excelente correlação entre as medidas, o que garante ao protocolo utilizado a confiabilidade das amostras analisadas e a real determinação da avides do anticorpo.

Tabela 3 - Reprodutibilidade da reação de ELISA IgG eluída com uréia 6M ou com pH 3,5. São apresentados o coeficiente de variação (CV) e a correlação entre as medidas dos ensaios de ELISA.

| Ensaio | Reprodutibilidade intratestes | | Reprodutibilidade intertestes | |
|---------------------------|-------------------------------|----------------------|-------------------------------|----------------------|
| | CV (%) | Correlação (r^2) | CV (%) | Correlação (r^2) |
| ELISA sem eluição | 3,36 | 0,9942 | 6,57 | 0,9800 |
| ELISA eluído com Uréia 6M | 2,55 | 0,9900 | 16,17 | 0,9864 |
| ELISA eluído com pH 3.5 | 4,43 | 0,9853 | 10,77 | 0,9790 |

4.5 Quantificação e caracterização de anticorpos de baixa avides

4.5.1 Padronização do tempo de renaturação dos anticorpos eluídos com pH

3.5

A partir da demonstração da eficiência do pH 3,5 e sua equivalência e reprodutibilidade com a uréia 6M na determinação da avides de anticorpos IgG no modelo experimental, realizamos uma reação de ELISA voltada para a determinação direta dos anticorpos de baixa avides, pela neutralização do pH na solução de anticorpos eluídos, o que permitiria a reação direta dos mesmos com o suporte sólido e determinação direta dos anticorpos de baixa avides, como descrito em Métodos (3.3.2.3). Inicialmente, para avaliar o efeito da neutralização do pH na reação dos anticorpos eluídos, ensaiamos amostras eluídas em pH ácido e neutralizadas, com poços recobertos com antígeno de *T.gondii* como descrito para a reação de ELISA padronizada nas etapas anteriores. As amostras foram ensaiadas em diferentes tempos de exposição ao antígeno após neutralização a pH 7.5. Foram realizadas incubações por 1 hora (reação convencional) ou 12 horas (reação estendida) para demonstrar uma eventual renaturação mais lenta dos anticorpos. Nossos dados mostram que houve uma boa correlação entre as medidas ($r^2=0,9991$), permitindo que as reações dos anticorpos eluídos e neutralizados fossem realizadas com o antígeno de *T.gondii* no tempo convencional (1 hora) da reação de ELISA.

4.5.2 Especificidade antigênica dos anticorpos humanos eluídos por pH 3,5 em relação aos antígenos de *T.gondii* por *Western Blotting*

Para avaliarmos a especificidade dos anticorpos eluídos com pH e renaturados nos soros humanos, realizamos um ensaio de *western blotting* sobre membranas revestidas por antígenos do agente separados por SDS-PAGE, com frações semelhantes às descritas acima, utilizando soros de coelhos. Novamente, foi possível identificar as reações de anticorpos eluídos e neutralizados, como pode ser visto na figura 12, sendo que estas bandas apresentaram maior intensidade que aquelas observadas nos soros experimentais. A partir dos resultados obtidos com amostras de soro humano de baixa e alta avidéz, podemos verificar a presença de bandas específicas nas amostras eluídas, comprovando a eluição pelo pH e recuperação dos anticorpos de baixa avidéz. Além disso, verificamos um padrão de bandas distinto entre as amostras eluídas provenientes de soros de alta avidéz (figura 12A) e de soros de baixa avidéz (figura 12B), com banda de 30kDa mais proeminente em amostras provenientes de soros de baixa avidéz, quando comparada com o perfil de resposta das amostras de alta avidéz de anticorpos.

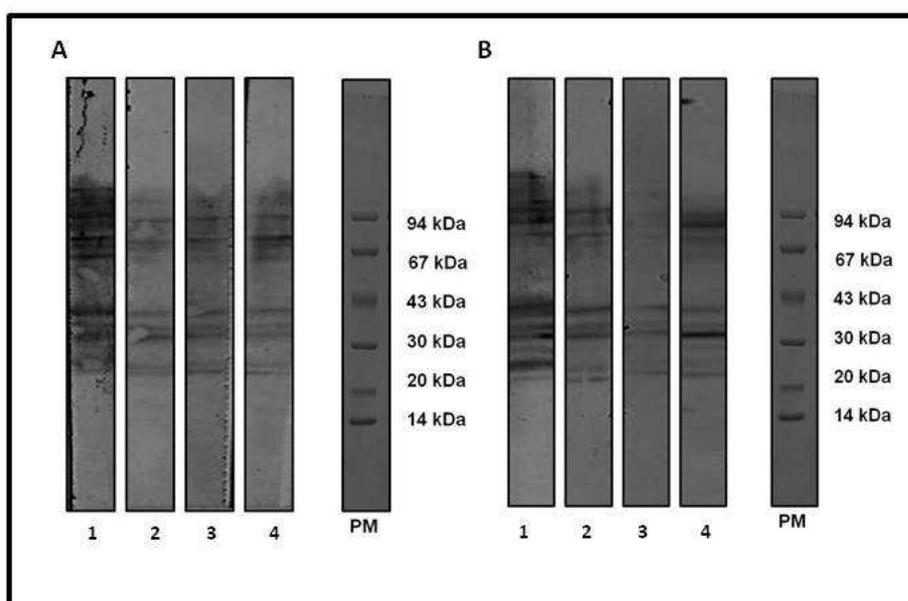


Figura 12 - Reatividade dos anticorpos de baixa avidéz, presentes na solução eluída pelo pH 3,5 em amostras: de soros humanos de alta avidéz (A) e de baixa avidéz (B). 1: Anticorpos totais; 2: Anticorpos resistentes a uréia 6M; 3: Anticorpos resistentes ao pH 3,5; 4: Solução eluída pelo pH 3,5.

4.5.3 Determinação de anticorpos de baixa avidéz eluídos por pH 3,5 renaturadas em soros de animais experimentais

Para o ensaio da medida direta dos anticorpos de baixa avidéz, após eluição por pH 3.5 e renaturação, ensaiamos várias amostras de soro de coelhos experimentalmente infectados utilizando soros com diferentes quantidades de IgG de alta avidéz, determinadas pelo método clássico de eluição por uréia 6M e igualmente ensaiados com reações de avidéz com pH 3,5. Para comparação da eficiência da determinação, a mera apresentação dos resultados em ELISA por densidade óptica (DO) perde o significado, pelo que optamos por apresentar a relação entre a quantidade de anticorpos de baixa avidéz determinada indiretamente na reação de avidéz e a reação de determinação direta, como descrito em Métodos, o que pode ser visto na Figura 13. Como pode ser observado, utilizando soros com diferentes níveis de avidéz, é possível correlacionar com alto grau de significância a medida direta com a estimativa indireta dos anticorpos de baixa avidéz. Esta medida foi mais eficiente quando a relação foi feita com a medida indireta induzida pela eluição com uréia 6M ($p < 0.0001$, $r^2 = 0.75$), vista na figura 13A. A medida foi bastante eficiente também quando comparada com a medida indireta induzida pela eluição com pH 3,5 ($p < 0,001$, $r^2 = 0.48$), embora houvesse uma maior dispersão dos valores, como pode ser observado na figura 13B. Estes dados são favorecidos pela amplitude de proporções de anticorpos de baixa avidéz obtida no modelo experimental, mas garantem a validade de ensaio da medida direta dos anticorpos de baixa avidéz em amostras de soros humanos.

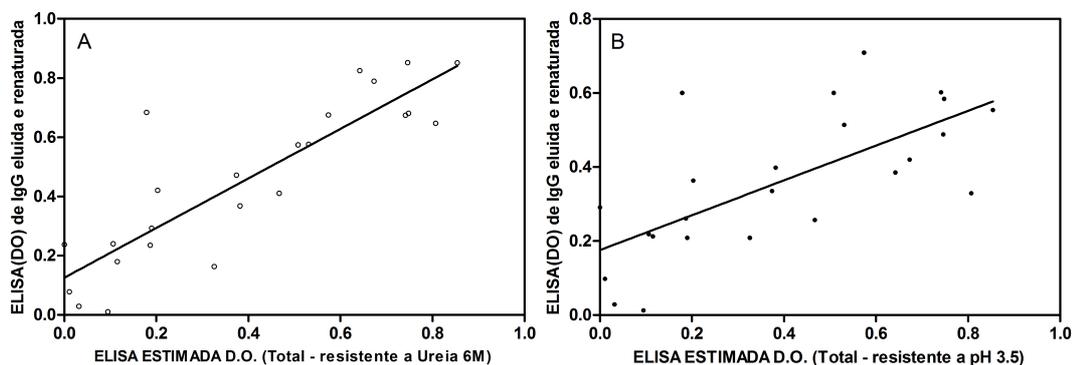


Figura 13 - Comparação entre a determinação direta de anticorpos de baixa avides, pela eluição com pH 3,5 e renaturação, com a determinação indireta de sua quantidade, pela diferença entre a reação ELISA total e a reação ELISA após eluição com o caotrópico. A: Comparação com a medida com uréia 6M. B: Comparação com a medida com pH 3.5. As retas representam a estimativa de regressão linear entre os eventos.

4.5.4 Relação entre a medida direta da IgG de baixa avides eluída a pH 3,5 e renaturada com a estimativa indireta por diferença entre a IgG total e a IgG de alta avides determinada em cada caotrópico para amostras humanas

Para avaliar a relação entre esta determinação direta de anticorpos de baixa avides e a quantidade estimada destes anticorpos, nos dois sistemas de eluição utilizados para a determinação da avides de anticorpos, realizamos a correlação entre as medidas diretas e estimadas de anticorpos que podem ser vistas na figura 15. Na figura 15A, correlacionamos a medida direta dos anticorpos de baixa avides de cada amostra com a estimativa indireta pela diferença entre os anticorpos totais e os anticorpos de alta avides retidos na placa após a eluição com uréia 6M. Notamos uma boa correlação entre os eventos, com alta significância ($p < 0.0001$, $r^2 = 0.10$), com uma relativa dispersão entre os valores. Quando comparamos a correlação entre a medida direta e a medida indireta pela eluição com pH 3,5, mostrada na figura 15B, a associação entre eventos manteve significância estatística, mas foi muito mais dispersa ($p < 0.05$, $r^2 = 0.04$), com valores discrepantes, inclusive com aumento de reação induzida pelo pH, fato raro na eluição por uréia. Evidentemente, o processo de eluição e renaturação é bastante

complexo e precisa de aprimoramento, mas os resultados são promissores e permitem concluir pela possibilidade de medida direta dos anticorpos de baixa avides.

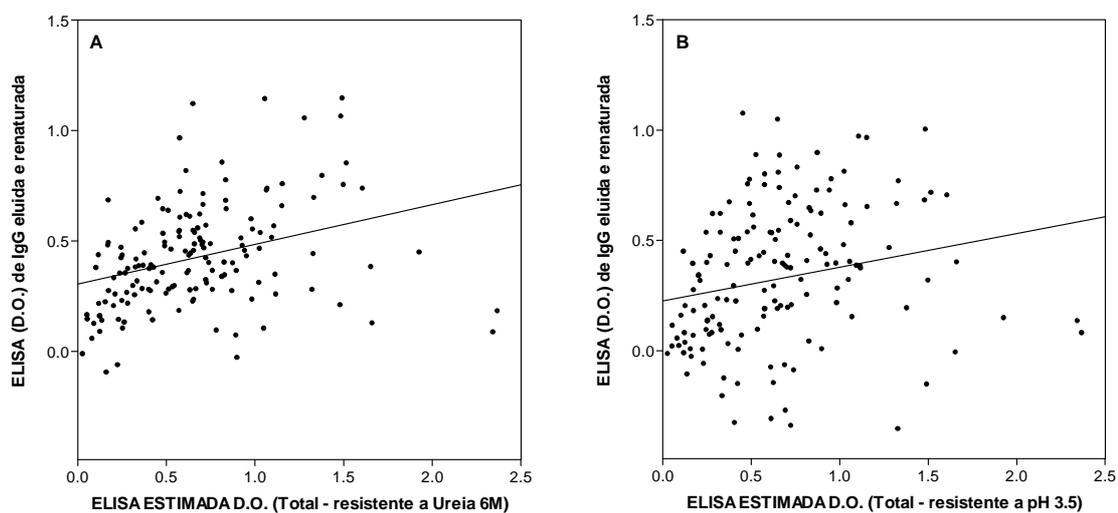


Figura 14 - Correlação entre a medida direta de anticorpos de baixa avides, após eluição por pH 3,5 e renaturação e a medida estimada pela diferença entre a medida total e a obtida após eluição com o caotrópico. A reta representa a reta de regressão linear estimada.

5. DISCUSSÃO

Como descrito em nossos objetivos, foi possível padronizar uma infecção experimental em coelhos que resultou em grandes quantidades de soros seqüencialmente obtidos a partir do modelo experimental, com excelente determinação de IgG específica por ELISA, bem como da maturação da avidéz. Nesse tipo de estudo, é evidente que há uma intensa produção de anticorpos nos tempos iniciais de infecção e que esta produção é basicamente de anticorpos de baixa avidéz, que são substituídos progressivamente por anticorpos de alta avidéz, como é de se esperar numa resposta imunológica típica de uma infecção auto-controlada como a toxoplasmose (Remington e McLeod, 2001). Assim, a medida direta dos anticorpos de baixa avidéz facilitaria o diagnóstico, já que a avidéz clássica é freqüentemente calculada pela razão entre anticorpos resistentes à eluição com o agente caotrópico e anticorpos totais, estimando-se indiretamente a porcentagem de anticorpos de baixa avidéz (Hedman et al., 1989; Camargo et al., 1991; Montoya, 2002; Lappalainen e Hedman, 2004).

No ELISA, a avidéz de anticorpos IgG pode ser determinada por diferentes métodos, como o da diluição, em que o agente caotrópico é adicionado ao diluente do soro, impedindo a formação do complexo antígeno-anticorpo (Inouye et al., 1984; Devey et al., 1988; Thomas et al., 1992), ou através do método de eluição, em que o agente caotrópico é utilizado na lavagem da placa após a incubação do soro, levando à dissociação do complexo imune (Pullen et al., 1986; Hedman e Seppala, 1988).

É difícil estabelecer regras gerais para a seleção do agente caotrópico a ser empregado na eluição do complexo imune, uma vez que as propriedades do antígeno como ponto isoelétrico, solubilidade e estabilidade em solução, devem ser levadas em consideração no processo de dissociação. Além disso, é preciso ressaltar que na seleção de uma estratégia de eluição, é importante considerar os efeitos químicos de diferentes soluções, já que o papel do tampão de eluição é

dissociar as interações entre receptor e ligante, de modo a alterar a afinidade de ligação entre eles (Firer, 2001).

Nosso trabalho procurou empregar o pH como uma condição caotrópica reversível e após várias abordagens, utilizando soros experimentais, foi possível padronizar uma reação de ELISA avides de IgG anti-*T.gondii*, através da eluição dos anticorpos em solução com pH 3.5, que apresentou correlação direta com a avides clássica determinada pela eluição com uréia, permitindo a determinação direta de anticorpos de baixa avides.

A reprodutibilidade desta reação seguiu os padrões convencionais da reprodutibilidade de reações de avides, que são menos eficientes que as reações convencionais de ELISA por envolverem um ou mais passos adicionais de interferência na reação antígeno-anticorpo. Os níveis encontrados de reprodutibilidade nos soros experimentais foram até maiores que os reportados na literatura. É importante ressaltar que não há possibilidade de comparação entre testes semelhantes, a menos que todas as condições experimentais sejam controladas, desde a preparação antigênica no suporte sólido, o tipo de conjugado utilizado, a concentração e o pH do agente caotrópico e demais condições de reação. Este é o maior impedimento para as reações de avides dado a dificuldade de definição de painéis de soros e outras condições experimentais entre laboratórios.

Do ponto de vista dos anticorpos de alta avides, nossos dados mostraram claramente que estes anticorpos não eram removíveis por nenhum dos processos caotrópicos utilizados, uréia e pH 3.5, embora houvesse uma discrepância pequena causada por uma fração de anticorpos de baixa avides resistente à uréia e sensível ao pH 3.5 e vice versa. Esta pequena variação também explica a diferença de inclinação da regressão linear observada entre os caotrópicos. Esta discrepância pode ser explicada por diferentes mecanismos químicos resultantes de um comportamento caotrópico similar, porém não idêntico. Obviamente, a alteração de

ponto isoelétrico que ocorre com mudanças de pH também interfere na reação receptor-ligante do anticorpo, o que não ocorre com a uréia, cuja ação é mediada pela interferência em pontes de hidrogênio e na hidrofobicidade da proteína, com poucas alterações de carga elétrica (Bennion e Daggett, 2003).

Na eluição por tampões com valores extremos de pH, abaixo de 2,5 e acima de 10, ocorre a dissociação do complexo imune devido à desestabilização das ligações iônicas entre as moléculas, já a eluição com a uréia interfere na dissociação de ligações de hidrogênio, enfraquecendo sobretudo as interações hidrofóbicas (Firer, 2001).

Outra questão importante a ser considerada na escolha do caotrópico, é que o anticorpo eluído deve manter sua funcionalidade após a dissociação do complexo imune (Yarmush et al., 1992; Firer, 2001). Assim, no processo de renaturação do anticorpo eluído é importante que a estrutura nativa da proteína seja preservada, o que pode ser realizado com a remoção do agente desnaturante por diálise, no caso da uréia, ou por neutralização para tampões com variações do pH (Firer, 2001). Interessante notar que a neutralização é um processo mais simples e rápido quando comparado com a diálise, que necessita de membrana e tampões específicos, onerando o processo e consumindo um tempo maior de execução. Em nosso trabalho, a utilização do pH ácido para dissociação do complexo imune permitiu a recuperação rápida dos anticorpos após neutralização da solução eluída, permitindo a quantificação direta de anticorpos IgG anti *T.gondii* de baixa avidéz. Estudos prévios já haviam demonstrado que as modificações da proteína em pH baixo não prejudicam a funcionalidade do anticorpo (Firer, 2001).

Os anticorpos de baixa avidéz retirados pelo pH ácido na condição experimental reagiam novamente com os mesmos antígenos utilizados no primeiro ensaio, o que prova a reversibilidade da condição anterior, desde que usadas condições específicas de renaturação. Assim, para demonstrar a preservação da funcionalidade e a especificidade antigênica dos anticorpos de baixa avidéz,

recuperados da solução eluída pelo pH 3,5, realizamos reações de *western blotting* nos soros de animais experimentalmente infectados, e em amostras de soro humano. Em nossas reações de *western blotting*, os anticorpos de baixa avidéz, recuperados após neutralização da solução eluída, reagiram contra frações antigênicas específicas, demonstrando que a estrutura da proteína foi preservada após o processo de renaturação. Assim, a metodologia proposta e padronizada em nosso trabalho, poderia ser uma ferramenta útil para estudos futuros de caracterização de marcadores imunológicos da fase aguda da infecção que são extremamente importantes para o diagnóstico sorológico da toxoplasmose.

Estudos prévios, utilizando anticorpos monoclonais altamente específicos, demonstraram que amostras de baixa avidéz reagiram contra uma proteína antigênica específica de 60kDa, sugerindo que esta proteína poderia ser utilizada como marcador de fase aguda em ensaios sorológicos. Da mesma forma, Araújo e Ferreira (2010) em um estudo recente sobre avidéz de anticorpos IgG contra antígenos de secreção e excreção do *T.gondii* por *immunoblot* verificaram reatividade específica de anticorpos de baixa avidéz para a fração protéica de 30KDa correspondente ao antígeno de superfície SAG1, abrindo perspectivas futuras para caracterização de novos marcadores.

Nas amostras humanas, a variabilidade, já detectada durante os testes com modelos experimentais, foi maior e com correlação quantitativa moderada, embora mais significativa quando o número de amostras de baixa avidéz foi aumentado, como nos modelos experimentais. Isto mostra que a determinação direta de anticorpos de baixa avidéz é correlata com a avidéz clássica, mas certamente precisa de aprimoramento do ponto de vista quantitativo, já que a dispersão e a renaturação resultaram em uma variabilidade muito grande, embora ainda com correlação. Interessante notar, que os resultados foram sempre mais correlatos quando o sistema de eluição com uréia era usado para comparação com a renaturação. Provavelmente, a caotropia desta solução é mais uniforme do que a

caotropia nas condições de eluição por pH. Independente destes problemas, as possibilidades de medida direta de anticorpos de baixa avides por pH são muito interessantes e promissoras. A abordagem utilizada de avides por eluição, embora mais simples tecnicamente é mais agressiva que a avides por diluição (Yarmush et al., 1992; Ibarra et al., 1999), que poderia ser uma alternativa futura para aprimorar a parte quantitativa de nossos ensaios.

Além das características inerentes ao ensaio imunoenzimático e ao agente caotrópico empregado, é importante ressaltar a heterogeneidade dos métodos empregados para o cálculo do índice de avides e definição do valor do ponto de corte, acima do qual a avides é considerada alta. Bobic et al. (2009) relataram uma boa correlação entre os resultados de diferentes testes comerciais de avides de IgG, demonstrando que o índice de avides não estaria relacionado ao sistema de análise, mas sim ao período de infecção. Este fato foi questionado por alguns autores que encontraram resultados discordantes entre diferentes kits comerciais de avides de IgG para toxoplasmose (Lefevre-Pettazzoni et al., 2006). Além disso, estudos mostram que índices de baixa avides podem ser observados em alguns casos de infecção crônica em gestantes (Lefevre-Pettazzoni et al., 2006), sugerindo que a maturação da avides IgG não seja linear ao longo do tempo desde a infecção, especialmente em mulheres grávidas, nas quais a produção de anticorpos pode ser modificada (Lefevre-Pettazzoni et al., 2006).

Nestes pacientes, além da variação da resposta individual do hospedeiro, o efeito do tratamento parece ser crucial na maturação da avides de IgG. Sensini (2006) relatou um atraso significativo na maturação de anticorpos IgG em pacientes tratados. Lefevre-Pettazzoni et al. (2006) relataram que 6/19 pacientes que mantiveram um índice de avides baixo por pelo menos um ano após infecção tinham recebido tratamento antiparasitário. Meroni et al. (2009) demonstraram que o tratamento com espiramicina em gestantes prejudica a produção e a maturação da avides de anticorpos IgG. Por outro lado, Jenum et al. (1997) não observaram

nenhum impacto do tratamento na maturação de IgG. Estes dados ressaltam a necessidade de investigação da maturação da avidéz de IgG em gestantes e pacientes em tratamento com drogas antiparasitárias. Na realidade, esta discrepância poderia estar relacionada com a época do tratamento em relação à infecção e o estímulo antigênico diferente induzido pelo tratamento.

Contudo, deve-se ter em mente que o principal papel do teste de avidéz no diagnóstico da infecção recente materna e risco de toxoplasmose congênita é descartar infecção recente em mulheres grávidas que apresentaram a primeira sorologia positiva para IgM e IgG anti-*T.gondii*, o que é eficiente quando são detectados altas proporções de anticorpos de alta avidéz, não havendo relatos de pacientes nestas condições com infecção recente.

Neste contexto, é preciso ressaltar que a maioria dos métodos para detecção da avidéz de anticorpos IgG utilizam a eluição do complexo imune com agentes caotrópicos como a uréia, considerando apenas as propriedades físicoquímicas da reação receptor-ligante ou antígeno – anticorpo, sem levar em conta os processos biológicos de seleção da resposta imune. Neste trabalho, procuramos padronizar um sistema imunoenzimático para detecção da avidéz de anticorpos IgG anti-*T.gondii*, utilizando a dissociação do complexo imune de forma semelhante aos processos fisiológicos que poderiam estar ocorrendo no centro germinativo dos folículos linfóides e que são responsáveis pela maturação dos anticorpos IgG. Assim, a utilização do pH como agente caotrópico estaria próximo ao processo imunológico natural do hospedeiro, que depende da interação de várias células do sistema imune, por meio de sinapses imunológicas (McHeyzer-Williams e McHeyzer-Williams, 2005), com especial importância aos exossomos (Denzer et al., 2000; Théry et al., 2002; Chaput e Théry, 2010), que estão diretamente envolvidos no mecanismo de ativação e seleção de linfócitos B de maior afinidade pelo antígeno (Denzer et al., 2000; Chaput e Théry, 2010).

A via endocítica das células eucariontes é formada por uma complexa rede de vesículas, freqüentemente, referidas como corpos multivesiculares (MVB), capazes de se fundir com a membrana plasmática, formando os exossomos que liberam as vesículas para o exterior (Denzer et al., 2000). É no interior destas vesículas que ocorre a separação entre muitos ligantes - receptores, através do pH ácido do seu lúmen e a partir dos quais muitos receptores se reciclam para a superfície celular (Luzio et al., 2000).

A população celular com capacidade para produção de exossomos mais bem estudada são as APCs. Tal profusão de estudos se deve ao fato dos exossomos estarem associados à produção de respostas de contra-ataque a tumores, o que gera um considerável interesse nessas partículas por pesquisadores da área oncológica. Exossomos carregados com antígenos tumorais já foram descritos em estudos de fase I em pacientes portadores de melanoma metastático, com resultados parciais indicando regressão clínica das lesões em pele e em linfonodos. Outro estudo fase I com exossomos conduzido em pacientes com neoplasia pulmonar demonstrou estabilização clínica prolongada após o tratamento com exossomos (They et al., 2002). Duijvesz et al. (2011) demonstraram a importância dos exossomos como marcadores biológicos para terapia do câncer de próstata. Estudos recentes têm mostrado a importância da aplicação dos exossomos em vacinas contra o câncer.

Vários estudos têm demonstrado também a importância dos exossomos em vacinas para toxoplasmose, já que estas estruturas apresentam características tanto antigênicas como de adjuvantes em vacinas (Beauvillain et al., 2009). Estes trabalhos mostram que os exossomos produzidos por determinadas linhagens de células dendríticas esplênicas (SRDCs) cultivadas *in vitro* com antígenos de *T.gondii* foram capazes de induzir resposta imune celular e humoral nos camundongos imunizados, ressaltando os exossomos como ferramenta importante em protocolos de vacinação contra toxoplasmose. Estudo recente mostrou

resultados satisfatórios com a utilização de exossomos em vacinas contra toxoplasmose congênita em camundongos, induzindo resposta imune humoral protetora nos filhotes, com redução significativa de cistos cerebrais (Beauvillain et al., 2009).

A primeira descrição de produção de exossomos por APC foi realizada por Raposo et al. (1996). Esses autores demonstraram que clones de células B eram capazes de secretar partículas derivadas de MVB indutoras de proliferação *in vitro* de clones de células T CD4⁺ humanas, de forma dependente do antígeno apresentado. Em outro estudo, demonstrou-se que, de forma semelhante, exossomos derivados de células dendríticas saturados com antígenos específicos seriam capazes de induzir atividade de células T CD4⁺ (via MHC II) e T CD8⁺ (via MHC I) *in vitro* (Chaput e Théry, 2010). Estes resultados mostram que os exossomos funcionam como moléculas de sinalização intercelular e que estão implicados na ativação tanto da resposta imune inata como da adquirida.

Alguns autores têm demonstrado a presença abundante de exossomos em células dendríticas foliculares (FDC) de linfonodos. Estas células do sistema imune estão envolvidas com a apresentação do antígeno aos linfócitos T e B. Células B reconhecem o antígeno presente em imune complexo na superfície das FDCs, já que estas expressam um conjunto de receptores do complemento (Liu et al., 1989). A ligação dos linfócitos B a esses antígenos é altamente competitiva e representa um passo essencial para a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos e seleção de linfócitos B de memória (Denzer et al., 2000; Chaput e Théry, 2010). A presença de partículas com características de exossomos ricas em MHC II na superfície das FDCs sugere que essas células poderiam funcionar como alvo fisiológico dos exossomos. Neste sentido, as FDCs poderiam estimular as células T antígeno-específicas responsáveis pela ativação da diferenciação das células B ao nível dos folículos germinativos (Denzer et al., 2000), influenciando diretamente no processo de maturação da avides de anticorpos IgG.

Um aspecto interessante da estimulação de linfócitos por exossomos é que, freqüentemente, há necessidade da presença de APC para que essa estimulação ocorra. Por exemplo, a proliferação induzida por exossomos de células T CD4⁺ imaturas *in vitro* só ocorre com a presença associada de células dendríticas maduras. Do mesmo modo, exossomos humanos derivados de células dendríticas carregados com MHC I foram capazes de ativar os clones T CD8⁺ correspondentes em cultura, desde que houvesse presença concomitante de DC (Théry et al., 2002; Chaput e Théry, 2010). Essa necessidade de interação entre APC, exossomos e células efectoras indica que, sob determinadas circunstâncias, a ação dos exossomos poderia ocorrer ao nível de sinapse imunológica entre APC e linfócitos T.

Estes achados explicariam de certa forma os resultados que obtivemos em nossa reação de ELISA para recuperação e quantificação de anticorpos IgG de baixa avidéz, já que o pH ácido utilizado na reação estaria próximo ao do processo fisiológico que ocorre nos folículos germinativos na presença dos exossomos que estão envolvidos diretamente com a sinapse imunológica responsável pela maturação e ativação de clones de células B a partir da interação com APCs e linfócitos T.

Como comentários finais, nossos dados mostram que o pH pode ser usado como caotrópico em reações de avidéz de IgG anti-*T.gondii* com eficiência semelhante à da uréia, permitindo uma quantificação posterior dos anticorpos de baixa avidéz, e abrindo uma nova perspectiva para a sorologia com esta tecnologia, fornecendo subsídios mais seguros para a determinação temporal da doença aguda em gestantes ou outros pacientes com toxoplasmose.

6 CONCLUSÕES

6.1 Geral

- Foi possível padronizar uma reação imunoenzimática (ELISA), utilizando o pH como caotrópico, com possibilidade de quantificação direta de anticorpos IgG de baixa avidéz anti-*T.gondii*.

6.2 Específicas

- A avidéz obtida com o tampão citrato fosfato de sódio em pH 3,5 apresentou melhor correlação com a avidéz medida por uréia 6M em soros experimentais de avidéz conhecida, com concentração ótima de 10 ug/ml de adsorvente na placa e diluição 1/200 dos soros;

- Quantitativamente, as reações de avidéz de IgG *anti-T.gondii* com pH 3,5 ou uréia 6M foram semelhantes em amostras experimentais, em especial na preservação de anticorpos de alta avidéz, com ótima correlação entre as medidas percentuais de anticorpos IgG de alta avidéz;

- A especificidade antigênica dos anticorpos de baixa avidéz demonstrada por *western blotting* foi similar com os dois caotrópicos;

- A reação de ELISA avidéz de IgG *anti-T.gondii* apresentou uma boa reprodutibilidade intra e inter teste para ambos os caotrópicos, com uma maior variação para os ensaios com pH;

- O tempo de incubação de 1h permitiu a renaturação dos anticorpos de baixa avidéz, eluídos pelo pH 3,5 em reações de ELISA avidéz de IgG *anti-T.gondii*;

- A medida direta dos anticorpos de baixa avidéz eluídos em pH foi possível após renaturação por 1h, apresentando correlação com a estimativa indireta por diferença entre a IgG total e a IgG de alta avidéz determinada pela uréia ou pelo pH, tanto em amostras experimentais como humanas, com maior dispersão dos valores para as amostras humanas devido ao número reduzido de amostras de baixa avidéz.

REFERÊNCIAS

Ambroise-Thomas P, Pelloux H. Toxoplasmosis. Congenital and in immunocompromised patients: a parallel. *Parasitol Today*. 1993;9:61-3.

Amendoeira MR, Sobral CA, Teva A, Lima JN, Klein CH. Inquérito sorológico para a infecção por *Toxoplasma gondii* em ameríndios isolados, Mato Grosso. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003;36:671-6.

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.

Ashburn D, Joss AW, Pennington TH, Ho-Yen DO. Do IgA, IgE, and IgG avidity tests have any value in the diagnosis of toxoplasma infection in pregnancy? *J Clin Pathol*. 1998;51:312-5.

Assou S, Le Carrour T, Tondeur S, Ström S, Gabelle A, Marty S, et al. A meta-analysis of human embryonic stem cells transcriptome integrated into a web-based expression atlas. *Stem Cells*. 2007;25:961-73.

Azevedo KM, Setúbal S, Lopes VG, Camacho LA, Oliveira SA. Congenital toxoplasmosis transmitted by human immunodeficiency-virus infected women. *Braz J Infect Dis*. 2010;14:186-9.

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, Abreu AMW, Azevedo-Silva J, Oréface F. Toxoplasmosis in southeastern Brazil: an alarming situation of highly endemic acquired and congenital infection. In: Petersen E, Pollak A, Reiter-Owona I. Recent trends in research on congenital toxoplasmosis. *Int J Parasitol* 2001;31:115-44.

Bartolini P, Ribela MTCP. Cromatografia de imunoafinidade. In: Pessoa Junior A, Kilikian BV, coordenador. Purificação de produtos biotecnológicos. Barueri : Editora Manole, 2005. p. 248-60. Disponível em: <http://pintassilgo2.ipen.br/biblioteca/2005/clivro/11004.pdf>

Beauvillain C, Juste MO, Dion S, Pierre J, Dimier-Poisson I. Exosomes are an effective vaccine against congenital toxoplasmosis in mice. *Vaccine*. 2009;27:1750-7.

Beghetto E, Spadoni A, Bruno L, Buffolano W, Gargano N. Chimeric antigens of *Toxoplasma gondii*: toward standardization of toxoplasmosis serodiagnosis using recombinant products. *J Clin Microbiol*. 2006;44:2133-40.

Béla SR, Oliveira Silva DA, Cunha-Júnior JP, Pirovani CP, Chaves-Borges FA, Reis de Carvalho F, et al. Use of SAG2A recombinant *Toxoplasma gondii* surface antigen as a diagnostic marker for human acute toxoplasmosis: analysis of titers and avidity of IgG and IgG1 antibodies. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008;62:245-54.

Bennion BJ, Daggett V. The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:5142-7.

Bertozzi LC, Suzuki LA, Rossi CL. 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 Sao Paulo*. 1999;41:175-7.

Blackburn NK, Besselaar TG, Schoub BD, O'Connell KF. Differentiation of primary cytomegalovirus infection from reactivation using the urea denaturation test for measuring antibody avidity. *J Med Virol*. 1991;33:6-9.

Bobic B, Klun I, Vujanic M, Nikolic A, Ivovic V, Zivkovic T, et al. Comparative evaluation of three commercial *Toxoplasma*-specific IgG antibody avidity tests and significance in different clinical settings. *J Med Microbiol*. 2009;358-64.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.

Brown AS, Schaefer CA, Quesenberry CP Jr, Liu L, Babulas VP, Susser ES. Maternal exposure to toxoplasmosis and risk of schizophrenia in adult offspring. *Am J Psychiatry*. 2005;162:767-73.

Buffolano W, Lappalainen M, Hedman L, Ciccimarra F, Del Pezzo M, Rescaldani R, et al. Delayed maturation of IgG avidity in congenital toxoplasmosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004;23:825-30.

Camargo ME. Toxoplasmose. In: Ferreira AW, Ávila SLM. Diagnóstico laboratorial avaliação de métodos de diagnóstico das principais doenças infecciosas e parasitárias e auto-imunes. Correlação clinico-laboratorial. 2ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. p.278-88.

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;21:55-8.

Camargo ME, Leser PG, Leser WSP. Definição de perfis sorológicos na toxoplasmose. Importância diagnóstica e epidemiológica. *Rev Bras Pat Clin*. 1977;13:113-27

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

Cantos GA, Prando MD, Siqueira MV, Teixeira RM. Toxoplasmose: ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e diagnóstico. *Rev Assoc Med Bras*. 2000;46:335-41.

Carme B, Aznar C, Motard A, Demar M, de Thoisy B. Serologic survey of *Toxoplasma gondii* in noncarnivorous free-ranging neotropical mammals in French Guiana. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2002;2:11-7.

Chaput N, Théry C. Exosomes: immune properties and potential clinical implementations. *Semin Immunopathol*. In Press 2010.

Chargelegue D, Stanley CM, O'Toole CM, Colvin BT, Steward MW. The affinity of IgG antibodies to gag p24 and p17 in HIV-1-infected patients correlates with disease progression. *Clin Exp Immunol*. 1995;99:175-81.

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

Demar M, Ajzenberg D, Maubon D, Djossou F, Panchoe D, Punwasi W, et al. Fatal outbreak of human toxoplasmosis along the Maroni River: epidemiological, clinical, and parasitological aspects. *Clin Infect Dis*. 2007;45:e88-95.

Denzer K, Kleijmeer MJ, Heijnen HF, Stoorvogel W, Geuze HJ. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J Cell Sci*. 2000;113 Pt 19:3365-74.

Devey ME, Bleasdale K, Lee S, Rath S. Determination of the functional affinity of IgG1 and IgG4 antibodies to tetanus toxoid by isotype-specific solid-phase assays. *J Immunol Methods*. 1988;106:119-25.

Diniz EMA, Camargo ME, Vaz FAC. Toxoplasmose congênita. In: Diniz EMA, Vaz FAC. *Infecções congênitas e perinatais*. São Paulo: Atheneu; 1991. p. 31-72.

Dobrowolski JM, Sibley LD. Toxoplasma invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell*. 1996;84:933-9.

Dubey JP. Toxoplasmosis. *J Am Vet Med Assoc*. 1994;205:1593-8.

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

Dubey JP. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. *Vet Parasitol*. 1998b;74:75-7.

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

Dubey, JP, Beattie, CP. Toxoplasmosis in man (*Homo sapiens*). In: *Toxoplasmosis of animals and man*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1988. p.41-60.

Dubey JP, Desmouts G, Antunes F, McDonald C. Serologic diagnosis of toxoplasmosis in experimentally infected pregnant goats and transplacentally infected kids. *Am J Vet Res*. 1985;46:1137-40.

Dubey JP, Frenkel JK. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *J Protozool.* 1972;19:155-77.

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.

Dubey JP, Thulliez P, Weigel RM, Andrews CD, Lind P, Powell EC. Sensitivity and specificity of various serologic tests for detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected sows. *Am J Vet Res.* 1995;56:1030-6.

Duijvesz D, Luider T, Bangma CH, Jenster G. Exosomes as biomarker treasure chests for prostate cancer. *Eur Urol.* 2011;59:823-31.

Eisen HN, Siskind GW. Variations in affinities of antibodies during the immune response. *Biochemistry.* 1964;3:996-1008.

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.

Ferreira AW, Ávila SLM. Diagnóstico laboratorial avaliação de métodos de diagnóstico das principais doenças infecciosas e parasitárias e auto-imunes. Correlação clinico-laboratorial. 2ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.

Ferreira AW, Camargo ME. Toxoplasmosis and the laboratory: diagnosis and a constant striving for improvement. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2002;44:119-20.

Firer MA. Efficient elution of functional proteins in affinity chromatography. *J Biochem Biophys Methods.* 2001;49:433-42.

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.

Flegr J, Zitková S, Kodym P, Frynta D. Induction of changes in human behaviour by the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. Parasitology. 1996;113:49-54.

Flori P, Chene G, Varlet MN, Sung RT. Sérologie de la toxoplasmose chez la femme enceinte : caractéristiques et pièges. Ann Biol Clin (Paris). 2009;67:125-33.

Foulon W, Villena I, Stray-Pedersen B, Decoster A, Lappalainen M, Pinon JM, et al. Treatment of toxoplasmosis during pregnancy: a multicenter study of impact on fetal transmission and children's sequelae at age 1 year. Am J Obstet Gynecol. 1999;180(2 Pt 1):410-5.

Frenkel JK. Pursuing toxoplasma. J Infect Dis. 1970;122:553-9.

Frenkel JK, Dubey JP. Effects of freezing on the viability of toxoplasma oocysts. J Parasitol. 1973;59:587-8.

Gagne SS. Toxoplasmosis. Prim Care Update Ob Gyns. 2001;8:122-6.

Gaze S, West NJ, Steward MW. The use of a double isotope method in the determination of antibody affinity. J Immunol Methods. 1973 ;3:357-64.

Gazzinelli RT, Hakim FT, Hieny S, Shearer GM, Sher A. Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. J Immunol. 1991;146:286-92.

Glasner PD, Silveira C, Kruszon-Moran D, Martins MC, Burnier Júnior M, Silveira S, et al. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. Am J Ophthalmol. 1992;114:136-44.

Goldsmith RS. Infectious diseases; protozoal & helminthic. In: Tierney LM Jr, McPhee SJ, Papadakis MA, editors. Current medical diagnosis and treatment. 37th.ed. Connecticut, USA: Appleton & Lange; 1998. p. 1324-88.

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

Hedman K, Lappalainen M, Seppä I, Mäkelä O. Recent primary toxoplasma infection indicated by a low avidity of specific IgG. *J Infect Dis.* 1989;159:736-40.

Hedman K, Seppälä I. Recent rubella virus infection indicated by a low avidity of specific IgG. *J Clin Immunol.* 1988;8:214-21.

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

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

Hinrichsen SL, Valente A, Rolim H, Jucá M. Toxoplasmose. In: Hinrichsen SL, organizador Doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 421-7.

Holland GN, Muccioli C, Silveira C, Weisz JM, Belfort R Jr, O'Connor GR. Intraocular inflammatory reactions without focal necrotizing retinochoroiditis in patients with acquired systemic toxoplasmosis. *Am J Ophthalmol.* 1999;128:413-20.

Hughes HP. Characterization of the circulating antigen of *Toxoplasma gondii*. *Immunol Lett.* 1981;3:99-102.

Ibarra N, Caballero A, González E, Valdés R. Comparison of different elution conditions for the immunopurification of recombinant hepatitis B surface antigen. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1999;735:271-7.

Inouye S, Hasegawa A, Matsuno S, Katow S. Changes in antibody avidity after virus infections: detection by an immunosorbent assay in which a mild protein-denaturing agent is employed. *J Clin Microbiol.* 1984;20:525-9.

Janku J. Pathogenesis and pathologic anatomy of coloboma of macula lutea in eye of normal dimensions and in microphthalmic eye with parasites in retina. *Cas Lek Ceskych.* 1923;62:1021-7.

Jenum PA, Stray-Pedersen B, Gundersen AG. Improved diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in early pregnancy by determination of antitoxoplasma immunoglobulin G avidity. *J Clin Microbiol.* 1997;35:1972-7.

Kato M, Claveria FG, Maki Y, Sanda K, Tanaka T, Omata Y, et al. Reactivity of synthetic SAG1 (p30) peptide sequences with RH, S273 and Beverley strain-induced anti-*Toxoplasma gondii* antibodies. *Pathobiology*. 2007;74:50-6.

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

Kompalic-Cristo, Britto C, Fernandes O. Diagnóstico molecular de toxoplasmose : revisão. *J Bras Patol Med Lab*. 2005;41:229-35.

Kotresha D, Noordin R. Recombinant proteins in the diagnosis of toxoplasmosis. *APMIS*. 2010;118:529-42.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-5.

Lappalainen M, Hedman K. Serodiagnosis of toxoplasmosis. The impact of measurement of IgG avidity. *Ann Ist Super Sanita*. 2004;40:81-8.

Lefevre-Pettazzoni M, Le Cam S, Wallon M, Peyron F. Delayed maturation of immunoglobulin G avidity: implication for the diagnosis of toxoplasmosis in pregnant women. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2006;25:687-93.

Lehtonen OP, Meurman OH. An ELISA for the estimation of high-avidity and total specific IgG and IgM antibodies to rubella virus. *J Virol Methods*. 1982;5:1-10.

Liu YJ, Joshua DE, Williams GT, Smith CA, Gordon J, MacLennan IC. Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature*. 1989;342:929-31.

Luft BJ, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin Infect Dis*. 1992;15:211-22.

Luzio JP, Rous BA, Bright NA, Pryor PR, Mullock BM, Piper RC. Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. *J Cell Sci*. 2000;113:1515-24.

Macre MS, Pires M, Meireles LR, Angel SO, Andrade HF Jr. Serology using rROP2 antigen in the diagnostic of toxoplasmosis in pregnant women. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2009;51:283-8.

Manual sobre cuidados e usos de animais de laboratório. Goiânia; AAALAC, COBEA; 2003. Disponível em:
<http://ceua.ufabc.edu.br/downloads/GuideForTheCareAndUse.pdf>

McCannel CA, Holland GN, Helm CJ, Cornell PJ, Winston JV, Rimmer TG. Causes of uveitis in the general practice of ophthalmology. UCLA Community-Based Uveitis Study Group. *Am J Ophthalmol*. 1996;121:35-46.

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

McLeod R, Boyer K, Karrison T, Kasza K, Swisher C, Roizen N, et al. Outcome of treatment for congenital toxoplasmosis, 1981-2004: the National Collaborative Chicago-Based, Congenital Toxoplasmosis Study. *Clin Infect Dis*. 2006;42:1383-94.

Meireles LR. Padronização e aplicações da avidéz de anticorpos IgG no diagnóstico laboratorial da toxoplasmose animal [tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2005.

Meroni M, Rossini M, Guanter L, Alonso L, Rascher U, Colombo R et al. Remote sensing of solar-induced chlorophyll fluorescence: Review of methods and applications. *Remote Sensing Environ*. 2009;113:2037-51.

Mineo JR, McLeod R, Mack D, Smith J, Khan IA, Ely KH, et al. Antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (SAG-1, P30) inhibit infection of host cells and are produced in murine intestine after peroral infection. *J Immunol*. 1993;150:3951-64.

Mioranza SL, Meireles LR, Mioranza EL, Andrade Júnior HF. Evidência sorológica da infecção aguda pelo *Toxoplasma gondii* em gestantes de Cascavel, Paraná. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008;41:628-34.

Montoya JG. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. *J Infect Dis*. 2002;185 Suppl 1:S73-82.

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

Mozzatto L, Procianoy RS. Incidence of congenital toxoplasmosis in southern Brazil: a prospective study. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2003;45:147-51.

Pannuti CS, Morello RJ, Moraes JC, Curti SP, Afonso AM, Camargo MC et al. Identification of primary and secondary measles vaccine failures by measurement of immunoglobulin G avidity in measles cases during the 1997 São Paulo epidemic. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2004;11:119-22.

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.

Peterson ML. Mechanisms controlling production of membrane and secreted immunoglobulin during B cell development. *Immunol Res*. 2007;37:33-46.

Pinkerton H, Henderson RG. Adult toxoplasmosis: previously unrecognized disease entity simulating the typhus-spotted fever group. *J Am Med Assoc*. 1941; 116: 807-14.

Pinkerton H, Weinman D. Toxoplasma infection on man. *Arch Pathol*. 1940; 30: 374-92.

Potasman I, Araujo FG, Desmonts G, Remington JS. Analysis of *Toxoplasma gondii* antigens recognized by human sera obtained before and after acute infection. *J Infect Dis*. 1986;154:650-7.

Prince HE, Wilson M. Simplified assay for measuring *Toxoplasma gondii* immunoglobulin G avidity. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001;8:904-8.

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

Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ, Geuze HJ. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med*. 1996;183(3):1161-72

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

Roberts A, Hedman K, Luyasu V, Zufferey J, Bessières MH, Blatz RM, et al. Multicenter evaluation of strategies for serodiagnosis of primary infection with *Toxoplasma gondii*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2001;20:467-74.

Roberts F, McLeod R. Pathogenesis of toxoplasmic retinochoroiditis. *Parasitol Today*. 1999;15:51-7.

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

Santo AH, Pinheiro CE, Jordani MS. Causas básicas e associadas de morte por Aids, Estado de São Paulo, Brasil, 1998. *Rev Saude Publica*. 2000;34:581-8.

Sensini A. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy: opportunities and pitfalls of serological diagnosis. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12:504-12.

Silveira C, Belfort R Jr, Muccioli C, Abreu MT, Martins MC, Victora C, et al. A follow-up study of *Toxoplasma gondii* infection in southern Brazil. *Am J Ophthalmol*. 2001;131:351-4.

Siteo SP, Rafael B, Meireles LR, Andrade HF Jr, Thompson R. Preliminary report of HIV and *Toxoplasma gondii* occurrence in pregnant women from Mozambique. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2010;52:291-5.

Steiner LA, Eisen HN. Sequential changes in the relative affinity of antibodies synthesized during the immune response. *J Exp Med*. 1967;126:1161-83.

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

Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol*. 2000;30:1217-58.

Tenter AM, Johnson AM. Phylogeny of the tissue cyst-forming coccidia. *Adv Parasitol*. 1997;39:69-139.

Théry C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol*. 2002;2:569-79.

Thomas HI, Morgan-Capner P, Enders G, O'Shea S, Caldicott D, Best JM. Persistence of specific IgM and low avidity specific IgG1 following primary rubella. *J Virol Methods*. 1992;39:149-55.

Torres CM. Morphologie d'un nouveau parasite de l'homme, *Encephalitozoon chagasi*, N. sp., observe dans un cas de meningo-encephalo-myelite congenitale avec myosite et myocardite. *C R Seances Soc Biol Fil*. 1927;97:1787-90.

Underwood WJ, Rook JS. Toxoplasmosis infection in sheep. *Comp Cont Edu Pract Vet*. 1992;14:1543-9.

Van Knapen F, Kremers AF, Franchimont JH, Narucka U. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in cattle and swine in The Netherlands: towards an integrated control of livestock production. *Vet Q*. 1995;17:87-91.

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

Yarmush ML, Antonsen KP, Sundaram S, Yarmush DM. Immunoabsorption: strategies for antigen elution and production of reusable adsorbents. *Biotechnol Prog*. 1992;8:168-78.

