



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas

FERNANDO DOS REIS DE CARVALHO

Novas abordagens antigênicas no sorodiagnóstico da toxoplasmose
humana, com ênfase nas infecções primária e congênita

UBERLÂNDIA - MG

2014

FERNANDO DOS REIS DE CARVALHO

Novas abordagens antigênicas no sorodiagnóstico da toxoplasmose humana, com ênfase nas infecções primária e congênita

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Mineo

Coorientadora: Dra. Deise Aparecida de Oliveira Silva

UBERLÂNDIA - MG

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

-
- C331n
2015
- Carvalho, Fernando dos Reis de, 1980-
Novas abordagens antigênicas no sorodiagnóstico da toxoplasmose humana, com ênfase nas infecções primária e congênita / Fernando dos Reis de Carvalho. - 2015.
183 f. : il.
- Orientador: José Roberto Mineo.
Coorientador (a): Deise Aparecida de Oliveira Silva.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.
1. Imunologia - Teses. 2. *Toxoplasma gondii* - Teses.
3. Toxoplasmose congênita - Teses. 4. Peptídeos - Síntese - Teses.
I. Mineo, José Roberto. II. Silva, Deise Aparecida de Oliveira.
III. Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

CDU: 612.017



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Fernando dos Reis de Carvalho

“Novas abordagens antigênicas no sorodiagnóstico da toxoplasmose humana, com ênfase nas infecções primária e congênita”

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Doutor(a).

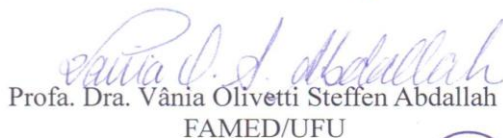
Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

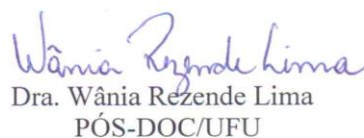
Banca Examinadora:


Uberlândia, 31 de outubro de 2014.


Profa. Dra. Ana Lúcia Falavigna Guilherme
UEM/PR


Profa. Dra. Rosângela Maria Rodrigues
UFG/JATAÍ


Profa. Dra. Vânia Olivetti Steffen Abdallah
FAMED/UFU


Dra. Wânia Rezende Lima
PÓS-DOC/UFU


Prof. Dr. José Roberto Mineo – orientador
ICBIM/UFU

Dedico este trabalho aos meus pais, *Natal* e *Ana Valéria*;
à minha esposa e companheira, *Lisiane*; e
aos meus filhos, *Ana Elisa*, *Paulo Fernando*
e *Maria Fernanda*.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A DEUS,

pela coleção de oportunidades oferecidas no meu caminho, por ter permitido que eu seguisse minha trajetória e chegasse até onde estou e por ter colocado em meu caminho pessoas especiais, com as quais posso contar em qualquer circunstância.

Aos meus pais, Natal e Ana Valéria,

por terem me conduzido no caminho da retidão, da justiça, da honestidade e da riqueza de princípios morais e éticos, por terem coragem e confiança para vencer todas as dificuldades, por permitirem que eu pudesse alcançar meus objetivos e por oferecerem apoio incondicional à conquista dos meus anseios.

À minha esposa e companheira, Lisiane,

pelo apoio total e irrestrito em todas as minhas realizações, pela compreensão nos momentos de ausência durante a conclusão deste trabalho, pela força e pela torcida nos momentos difíceis da caminhada, pela lucidez nos momentos de desespero, pelo carinho e alegria que tem trazido à minha vida e por ser alicerce na criação e educação dos nossos filhos.

Aos meus filhos, Ana Elisa, Paulo Fernando e Maria Fernanda,

pelo brilho e pela alegria que trazem todos os dias à minha vida, pela compreensão nos muitos programas “furados” dos últimos anos, por darem sentido à minha vida e à minha caminhada, por serem verdadeiros “presentes de Deus”.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Roberto Mineo,

pelos valiosos conhecimentos transmitidos durante este curso, pela compreensão nos momentos de falhas, pela confiança em mim depositada, abrindo as portas de seu laboratório para a execução deste trabalho, pelas brilhantes contribuições apresentadas na construção deste trabalho, pela conversa franca e sincera nos momentos mais delicados, e por ser um grande exemplo de profissionalismo e competência em sua área de atuação.

À minha coorientadora, *Dra. Deise Aparecida de Oliveira Silva*,
pela grande contribuição prestada na execução deste trabalho, principalmente na interpretação
e análise dos resultados, pela dedicação e boa vontade com que se dispôs a me ajudar, mesmo
após sua aposentadoria, pelas palavras amigas e encorajadoras nos momentos difíceis, pelo
espírito materno com que trata a todos com quem trabalha e pelas grandes lições de vida
apresentadas neste período.

À grande amiga e colaboradora, *Dra. Ana Cláudia Arantes Marquez Pajuaba*,
pela inigualável e irretribuível contribuição prestada em todos os momentos da execução
deste trabalho, desde as etapas de planejamento e execução de experimentos até a redação
final desta tese, pela amizade e apoio nos momentos difíceis, pelos conhecimentos e
experiências transmitidas no decorrer do curso.

Aos amigos e colaboradores, *Silas Silva Santana, Heber Leão Silva Barros*
e Luiz Carlos Gebrim de Paula Costa,
pela grande ajuda na execução dos procedimentos experimentais da fase final deste trabalho,
sem a qual sua conclusão não teria sido possível, pela disposição em deixar seus próprios
trabalhos e experimentos para me auxiliar, mesmo em finais de semana e feriados, pelo apoio
e amizade nos momentos difíceis, e pelos momentos de descontração e boas risadas.

Aos professores membros da banca examinadora, *Dra. Ana Lúcia Falavigna Guilherme*
(UEM-PR), Dra. Rosângela Maria Rodrigues (UFG-Jataí), Dra. Vânia Olivetti Steffen
Abdallah (FAMED-UFU) e Dra. Wânia Rezende Lima (ICBIM-UFU),
pela disponibilidade em participar da banca avaliadora deste trabalho, pelos elogios
apresentados ao trabalho e à sua escrita e pelas valiosas contribuições e sugestões de
alterações apresentadas, que muito contribuíram para seu aperfeiçoamento.

AGRADECIMENTOS

Aos professores *Dra. Júlia Maria Costa Cruz, Dra. Celene Maria de Oliveira Simões Alves e Dr. Cláudio Vieira da Silva*, pela disposição em participar na banca de qualificação deste trabalho e pelas valiosas contribuições apresentadas, que muito ajudaram a enriquecê-lo.

Ao professor *Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo*, pela confiança no meu trabalho, por ter aberto as portas do laboratório para a execução deste trabalho, pelos conhecimentos transmitidos e pela grande colaboração nas ferramentas de bioinformática.

À professora *Dra. Fernanda Maria Santiago*, pela colaboração nas fases iniciais da execução deste trabalho, especialmente nas precipitações de antígeno em sulfato de amônio e na técnica de *immunoblotting*.

Ao professor *Dr. Jair Pereira Cunha Júnior*, pelas valiosas dicas nas precipitações de antígeno em sulfato de amônio e nas ferramentas de bioinformática.

À professora *Dra. Neide Maria da Silva*, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, pela paciência e apoio, principalmente nos momentos finais e mais difíceis.

Aos grandes amigos e companheiros do Laboratório de Imunoparasitologia, *Silas, Gebrim, Heber, Cristina, Vinícius, Patrício, Elivaine, Lourenço, Márley e Zilda*, pelo excelente convívio neste período, pelas contribuições dadas a este trabalho, pelos bons momentos compartilhados no dia a dia do laboratório, especialmente pelas nossas discussões variadas durante o café diário e pela torcida e força positiva nos momentos mais difíceis.

Às colegas do Laboratório de Imunoparasitologia, *Ana Carolina, Caroline Mota, Tamires Lopes e Elivaine*, pela preciosa colaboração na manutenção da cepa RH de *Toxoplasma gondii* em camundongos, pela ajuda na coleta dos exsudatos peritoneais nas tardes de sexta-feira e nos feriados e por me substituir nesta tarefa, quando não podia estar presente.

Aos demais amigos e companheiros de convívio do Laboratório de Imunoparasitologia, tanto da graduação quanto da pós-graduação, *Renata, Flávia, Eliézer, Margareth, Miguel, Leandro, Vanessa Rezende, Vanessa Miranda, Lydiane, Mylla, Maraísa, Aline, Mariana, Paula, Lara, Lucas Bello, Víctor, Lucas, Frederico, Arlindo, Hercílio, Álvaro*, pelos bons momentos de convivência no laboratório, pelos conhecimentos compartilhados e pela colaboração.

Aos técnicos do Laboratório de Imunoparasitologia, *Ana Cláudia, Zilda, Márley, Murilo e Max*, pelo apoio na rotina laboratorial e pela gentileza e presteza diárias em atender nossas solicitações.

Aos técnicos e funcionários do Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA), *Taísa, Junão, Fabiano, Marcelo, Fátima e Luciene*, pelo apoio com os animais de experimentação e pela gentileza e boa vontade em atender nossas solicitações.

Às secretárias do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, *Lucileide* e *Lucélia*, pela atenção e boa vontade na solução dos nossos problemas burocráticos e das nossas dúvidas frequentes.

Ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, pela compreensão e concessão da prorrogação do prazo de defesa e conclusão deste trabalho.

Aos servidores do Setor de Arquivo Médico do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU), especialmente à *Elvira*, pela boa vontade e gentileza em separar os prontuários clínicos dos pacientes nas datas e horários agendados.

A todos os demais colegas e professores da Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, pela contribuição na minha formação e pela colaboração direta ou indireta na realização deste trabalho.

Às agências brasileiras financiadoras de pesquisa, *CAPES*, *CNPq* e *FAPEMIG*, pelo apoio financeiro fornecido na aquisição de materiais e reagentes necessários à execução deste trabalho e no custeio de viagens e taxas de inscrição para participação em eventos científicos.

Ao *Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás (IFG)*, especialmente à *Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação* e ao *Câmpus Itumbiara*, pelo apoio aos servidores que estão cursando pós-graduação e pela concessão do afastamento de 18 meses, fundamental para a finalização deste trabalho.

Ao prof. *Wagner Pereira Lopes*, ex-Chefe de Departamento das Áreas Acadêmicas do IFG-Câmpus Itumbiara, pelo apoio durante as etapas iniciais deste trabalho, especialmente na flexibilização dos meus horários de trabalho para cursar as disciplinas do curso.

Ao prof. *Marcos Antônio Arantes de Freitas*, Chefe de Departamento das Áreas Acadêmicas do IFG-Câmpus Itumbiara, pelo apoio e compreensão durante as etapas finais deste trabalho, especialmente na adequação dos meus horários para permitir a redação final desta tese.

Aos colegas professores do IFG-Câmpus Itumbiara, em especial *Blyeny*, *Frederico Mercadante*, *Rodrigo Lima*, *Nélson Ney*, *Ghunter* e *Ghesley*, que direta ou indiretamente prestaram alguma colaboração na concretização deste trabalho, seja pelas trocas de horários de aulas, pela aplicação de provas e atividades avaliativas ou pelas palavras de apoio.

Aos meus alunos do IFG-Câmpus Itumbiara, pela compreensão e apoio, principalmente com relação às constantes trocas de horários e às ausências não programadas, especialmente na etapa de conclusão deste trabalho.

À *Tianinha*, minha tia-amiga, grande incentivadora da minha jornada acadêmica, pela atenção, pelo carinho, pela força positiva e pela grande torcida e interesse durante toda a trajetória deste trabalho e da minha formação acadêmica.

“Olhai como crescem os lírios do campo. Eles não trabalham nem fiam. No entanto, eu vos digo que nem Salomão em toda a sua glória jamais se vestiu como um só dentre eles. Se Deus assim veste a erva do campo, que hoje existe e amanhã é lançada ao forno, não fará ele muito mais por vós, homens de pouca fé?[...]Assim, buscai primeiramente o reino de Deus e a sua justiça, e todas estas coisas vos serão acrescentadas.”

(Trecho do Sermão da Montanha; Mt 6, 28-30. 33)

RESUMO

Capítulo I - Toxoplasmose é uma zoonose causada pelo parasita intracelular *Toxoplasma gondii*, que infecta diferentes hospedeiros, incluindo cerca de um terço da população humana mundial. Uma das manifestações mais graves da infecção por este parasita em humanos corresponde à toxoplasmose congênita, quando há transmissão placentária do parasita para o feto durante infecção materna primária na gestação. A infecção congênita pode causar abortos ou perdas fetais, além de sequelas graves em recém-nascidos (RNs), principalmente oculares e/ou cerebrais. A triagem sorológica de gestantes e RNs, baseada principalmente na detecção de anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii* constitui-se em importante medida a ser adotada em programas de controle desta infecção, apesar das limitações na detecção dos anticorpos e na interpretação dos resultados. **Capítulo II** - Um total de 173 pares de amostras de soros de mães com suspeita de toxoplasmose primária na gestação e seus respectivos RNs, provenientes do Setor de Pediatria e Neonatologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU) no período de 2006 a junho de 2014, foi analisado por ELISA para a detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii*, e os resultados obtidos foram correlacionados com dados clínicos obtidos a partir de pesquisa nos prontuários clínicos de cada paciente. Concluiu-se que (i) a triagem sorológica pré-natal é de grande relevância na identificação de gestantes expostas à toxoplasmose durante a gestação; (ii) o tratamento materno reduz a transmissão congênita de *T. gondii*; (iii) a triagem sorológica neonatal, aliada à análise de parâmetros clínicos permite identificar RNs verticalmente infectados, principalmente por meio da detecção conjunta de anticorpos IgM e IgA; e (iv) o acompanhamento sorológico de RNs é importante no esclarecimento de situações duvidosas, principalmente em casos de RNs assintomáticos, mas com sorologia sugestiva de infecção congênita. **Capítulo III** - Diferentes frações antigênicas derivadas do antígeno solúvel de taquizoítas de *T. gondii* (STAg) foram obtidas a partir de precipitação sequencial em concentrações crescentes de sulfato de amônio e utilizadas na técnica de *immunoblotting* para a detecção de anticorpos IgG total e suas subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) presentes em amostras pareadas de soros de mães com sorologia presuntiva de toxoplasmose recente na gestação e seus respectivos RNs. Concluiu-se que a utilização destas frações antigênicas de STAg no diagnóstico da toxoplasmose humana se mostrou interessante na detecção de anticorpos IgG e suas subclasses, permitindo diferenciação entre amostras positivas e negativas, mas não se mostrou uma boa alternativa no diagnóstico da toxoplasmose congênita, com resultados inferiores aos do STAg, em função da menor frequência de bandas antigênicas reconhecidas e da ausência de reconhecimento diferencial de antígenos pelos soros dos RNs, em relação aos soros maternos. **Capítulo IV** - As sequências de aminoácidos de 16 antígenos imunodominantes de *T. gondii* foram usadas para a predição de epítomos lineares de células B usando ferramentas de bioinformática. Um total de 22 epítomos de antígenos de superfície (SRS), roptrias (ROP), micronemas (MIC) e grânulos densos (GRA) de *T. gondii* foram identificados e utilizados para a síntese de peptídeos com 15 resíduos de aminoácidos, os quais foram quimicamente conjugados ao esqueleto proteico da albumina sérica bovina (BSA), e o desempenho diagnóstico destes peptídeos sintéticos foi avaliado por ELISA para a detecção de anticorpos IgG em soros de pacientes com suspeita de toxoplasmose aguda (G1) ou crônica (G2). Concluiu-se que peptídeos sintéticos obtidos a partir da predição de epítomos lineares de células B constituem antígenos promissores em ensaios sorológicos para o diagnóstico da toxoplasmose e para a diferenciação das fases aguda e crônica da infecção, representando uma alternativa ao uso de antígenos nativos ou recombinantes.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*. Toxoplasmose congênita. Triagem sorológica. Soros pareados mãe-RN. STAg. Subclasses de IgG. *Immunoblotting*. Peptídeos sintéticos.

ABSTRACT

Chapter I - Toxoplasmosis is a zoonosis caused by the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*, which infects a range of hosts, including about one-third of the world's human population. One of the most severe manifestations of this infection in humans corresponds to congenital toxoplasmosis, which occurs when there is placental transmission of the parasite to the fetus in cases of primary maternal infection during pregnancy. Congenital infection may cause abortions or fetal losses, as well as severe ocular and/or cerebral sequelae in newborns. The serological screening of pregnant women and newborns is mainly based on the detection of IgG and IgM antibodies to *T. gondii* and constitutes an important measure to be adopted in programs to control this infection, despite the limitations in the antibody detection and interpretation of results. **Chapter II** - A total of 173 pairs of serum samples from mothers with suspected primary toxoplasmosis during pregnancy and their newborns, obtained from the Department of Pediatrics and Neonatology of Clinical Hospital of the Federal University of Uberlândia (HC-UFU) from 2006 to June 2014, was analyzed by ELISA for the detection of IgG, IgM and IgA anti-*T. gondii*, and the results were correlated with clinical data obtained from research in the clinical records of each patient. It was concluded that (i) prenatal serological screening is very important for the identification of pregnant women exposed to toxoplasmosis during pregnancy; (ii) maternal treatment reduces congenital transmission of *T. gondii*; (iii) neonatal serologic screening, associated with analysis of clinical parameters, allows the identification of vertically infected newborns, mainly through simultaneous detection of IgM and IgA antibodies; and (iv) serological follow-up of newborns is important in clarifying doubtful situations, especially in cases of asymptomatic newborns that present suggestive serology of congenital infection. **Chapter III** - Different antigenic fractions derived from soluble antigen of tachyzoites of *T. gondii* (STAg) were obtained from sequential precipitation with increasing concentrations of ammonium sulfate and used in immunoblotting technique to detect IgG antibodies and its subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4) present in paired serum samples from mothers with presumptive serology of recent toxoplasmosis during pregnancy and their newborns. It was concluded that the use of antigenic fractions obtained from STAg precipitation in the diagnosis of human toxoplasmosis proved to be interesting to detect IgG and its subclasses, allowing differentiation between positive and negative samples, but it was not a good alternative for the diagnosis of congenital toxoplasmosis, presenting results considered inferior to the STAg, due to the lower frequency of recognized antigenic bands and the absence of differential recognition of antigens by sera of newborns. **Chapter IV** - The amino acid sequences of sixteen immunodominant antigens of *T. gondii* were used to perform B cell linear epitope prediction using a software-based approach. A total of 22 epitopes of antigens from surface (SRS), rhoptries (ROP), micronemes (MIC) and dense granules (GRA) of *T. gondii* were identified, and 15 residues from their amino acid sequences were used to synthesize peptides chemically linked to bovine serum albumin backbone, and the diagnostic performance of these synthetic peptides was evaluated in ELISA to detect specific IgG antibodies in sera of patients with suspected acute toxoplasmosis (G1) or chronic (G2). It was concluded that synthetic peptides designed from B cell linear epitope prediction constitute promising antigens in serological assays to diagnose toxoplasmosis and differentiate acute from chronic phases of toxoplasmosis, representing an alternative to the use of native or recombinant antigens.

Keywords: *Toxoplasma gondii*. Congenital toxoplasmosis. Serological screening. Mother-newborn paired sera. STAg. IgG subclasses. Immunoblotting. Synthetic peptides.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1 -	Estágios infecciosos de <i>Toxoplasma gondii</i>	29
Figura 2 -	Representação esquemática das formas taquizoíta e bradizoíta de <i>Toxoplasma gondii</i>	31
Figura 3 -	Ciclo reprodutivo de <i>Toxoplasma gondii</i>	32
Figura 4 -	Formas de transmissão de <i>Toxoplasma gondii</i> para a espécie humana.....	34
Figura 5 -	Soroprevalência mundial da infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> na espécie humana.....	40
Figura 6 -	Processo de invasão e multiplicação de <i>Toxoplasma gondii</i> no interior da célula hospedeira.....	44
Figura 7 -	Resposta imune contra <i>Toxoplasma gondii</i>	49
Figura 8 -	Cinética da resposta de anticorpos na infecção por <i>Toxoplasma gondii</i>	53

CAPÍTULO II

Figura 1 -	Níveis de anticorpos IgG, IgM e IgA anti- <i>Toxoplasma gondii</i> em 173 amostras pareadas de mães com suspeita de toxoplasmose primária adquirida durante a gestação e seus respectivos recém-nascidos (RN), provenientes do HC-UFU durante o período de 2006 a 2014.....	98
Figura 2 -	Correlação entre os níveis de anticorpos IgG (A), IgM (B) e IgA (C) anti- <i>Toxoplasma gondii</i> de 173 amostras pareadas de mães com suspeita de toxoplasmose primária adquirida durante a gestação e seus respectivos recém-nascidos (RN), provenientes do HC-UFU durante o período de 2006 a 2014.....	102
Figura 3 -	Correlação entre os isotipos de anticorpos IgG, IgM e IgA anti- <i>Toxoplasma gondii</i> em 173 amostras pareadas de mães com suspeita de toxoplasmose primária adquirida durante a gestação (A, B e C) e seus respectivos recém-nascidos (RN) (D, E e F), provenientes do HC-UFU durante o período de 2006 a 2014.....	106
Figura 4 -	Porcentagem de amostras de soros de recém-nascidos (RN) com sorologia positiva para IgM e/ou IgA anti- <i>Toxoplasma gondii</i> , procedentes de mães soropositivas para IgM e/ou IgA anti- <i>T. gondii</i> (n = 146), as quais foram tratadas (n = 108) ou não tratadas (n = 38) durante a gestação com drogas específicas para o tratamento da toxoplasmose.....	108

CAPÍTULO III

- Figura 1 -** Distribuição das amostras pareadas de soros de mães e recém-nascidos (RNs) em dois grupos, de acordo com os resultados obtidos a partir de ELISA indireto para detecção de anticorpos IgG e do ELISA de captura para detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii*..... 128
- Figura 2 -** Perfil proteico (A) e antigênico (B) do antígeno solúvel de taquizoítas de *T. gondii* (STAg) e suas frações obtidas por precipitação em concentrações crescentes de sulfato de amônio..... 136
- Figura 3 -** Frequência (%) e perfil das bandas antigênicas de STAg total e suas frações obtidas por precipitação em concentrações crescentes de sulfato de amônio e reconhecidas por anticorpos IgG presentes em amostras pareadas de soros de mães (M) e recém-nascidos (RN) dos grupos (A-G) GI, em que as mães apresentavam sorologia sugestiva de infecção recente ($IgG^+ IgM^+$) e os RNs de infecção congênita ($IgG^+ IgM^+$) por *T. gondii* (n = 4 pares), e (H-N) GII, em que as mães apresentavam sorologia sugestiva de infecção recente ($IgG^+ IgM^+$) e os RNs de ausência de infecção congênita ($IgG^+ IgM^-$) por *T. gondii* (n = 4 pares)..... 138
- Figura 4 -** Frequência (%) e perfil das bandas antigênicas de STAg total e da fração STAg 30-40% reconhecidas por anticorpos IgG1 presentes em amostras pareadas de soros de mães (M) e recém-nascidos (RN) dos grupos (A-B) GI, em que as mães apresentavam sorologia sugestiva de infecção recente ($IgG^+ IgM^+$) e os RNs de infecção congênita ($IgG^+ IgM^+$) por *T. gondii* (n = 12 pares), e (C-D) GII, em que as mães apresentavam sorologia sugestiva de infecção recente ($IgG^+ IgM^+$) e os RNs de ausência de infecção congênita ($IgG^+ IgM^-$) por *T. gondii* (n = 16 pares)..... 143
- Figura 5 -** Frequência (%) e perfil das bandas antigênicas de STAg total e da fração STAg 30-40% reconhecidas por anticorpos IgG2 presentes em amostras pareadas de soros de mães (M) e recém-nascidos (RN) dos grupos (A-B) GI, em que as mães apresentavam sorologia sugestiva de infecção recente ($IgG^+ IgM^+$) e os RNs de infecção congênita ($IgG^+ IgM^+$) por *T. gondii* (n = 12 pares), e (C-D) GII, em que as mães apresentavam sorologia sugestiva de infecção recente ($IgG^+ IgM^+$) e os RNs de ausência de infecção congênita ($IgG^+ IgM^-$) por *T. gondii* (n = 16 pares)..... 146
- Figura 6 -** Frequência (%) e perfil das bandas antigênicas de STAg total e da fração STAg 30-40% reconhecidas por anticorpos IgG3 presentes em amostras pareadas de soros de mães (M) e recém-nascidos (RN) dos grupos (A-B) GI, em que as mães apresentavam sorologia sugestiva de infecção recente ($IgG^+ IgM^+$) e os RNs de infecção congênita ($IgG^+ IgM^+$) por *T. gondii* (n = 12 pares), e (C-D) GII, em que as mães apresentavam sorologia sugestiva de infecção recente ($IgG^+ IgM^+$) e os RNs de ausência de infecção congênita ($IgG^+ IgM^-$) por *T. gondii* (n = 16 pares)..... 148

Figura 7 -	Frequência (%) e perfil das bandas antigênicas de STAg total e da fração STAg 30-40% reconhecidas por anticorpos IgG4 presentes em amostras pareadas de soros de mães (M) e recém-nascidos (RN) dos grupos (A-B) GI, em que as mães apresentavam sorologia sugestiva de infecção recente ($\text{IgG}^+ \text{IgM}^+$) e os RNs de infecção congênita ($\text{IgG}^+ \text{IgM}^+$) por <i>T. gondii</i> (n = 12 pares), e (C-D) GII, em que as mães apresentavam sorologia sugestiva de infecção recente ($\text{IgG}^+ \text{IgM}^+$) e os RNs de ausência de infecção congênita ($\text{IgG}^+ \text{IgM}^-$) por <i>T. gondii</i> (n = 16 pares).....	150
-------------------	---	-----

CAPÍTULO IV

Figure 1 -	Prediction of B cell linear epitopes within immunodominant antigens of <i>Toxoplasma gondii</i>	179
Figure 2 -	Distribution of the 84 human sera in two groups according to the results obtained from indirect ELISA-IgG and capture ELISA-IgM for the detection of antibodies to soluble antigen of <i>Toxoplasma gondii</i> (STAg)....	181
Figure 3 -	Reactivity and positivity of IgG antibodies to 22 synthetic peptides representative of predicted B cell epitopes from 16 immunodominant antigens of <i>Toxoplasma gondii</i> determined by indirect ELISA in human sera of acute (G1, n = 42) and chronic (G2, n = 42) phases of infection.....	182
Figure 4 -	Comparison of the reactivity of IgG antibodies to 22 synthetic peptides, representative of predicted B cell epitopes of antigens of <i>T. gondii</i> , grouped according to parasite immunodominant antigenic families in human sera of acute (G1, n = 42) and chronic (G2, n = 42) phases of infection.....	183

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1 -	Níveis de anticorpos IgG, IgM e IgA anti- <i>Toxoplasma gondii</i> em 173 amostras pareadas de mães com suspeita de toxoplasmose primária adquirida durante a gestação e seus respectivos recém-nascidos (RN), provenientes do HC-UFU durante o período de 2006 a 2014.....	98
Tabela 2 -	Correlação entre os níveis de anticorpos IgG (A), IgM (B) e IgA (C) anti- <i>Toxoplasma gondii</i> de 173 amostras pareadas de mães com suspeita de toxoplasmose primária adquirida durante a gestação e seus respectivos recém-nascidos (RN), provenientes do HC-UFU durante o período de 2006 a 2014.....	110

CAPÍTULO IV

Table 1 -	Amino acid sequences from synthetic peptides representative of predicted B cell epitopes from immunodominant antigens of <i>Toxoplasma gondii</i>	178
------------------	---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

aa	Aminoácido
ABS	Absorbância
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis-3-etil-benzotiazolina sulfônico
AIDS	Síndrome da deficiência imunológica adquirida
AMA1	Antígeno de membrana apical 1
BSA	Albumina sérica bovina
CEP	Comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos
cm	Centímetro
DAB	3,3'-diaminobenzidina
DAT	Teste de aglutinação direta
DL100	Dose letal de 100%
DL50	Dose letal de 50%
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
EI	Índice ELISA (do inglês, <i>ELISA index</i>)
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EMSCOT	Estudo Multicêntrico Europeu em Toxoplasmose Congênita (do inglês <i>European Multicenter Study on Congenital Toxoplasmosis</i>)
ESA	Antígenos secretados e/ou excretados de <i>Toxoplasma gondii</i>
Fc	Fração cristalizável de imunoglobulina
g	Grama
g	Força relativa da gravidade
GBP	Proteínas ligantes de guanilato
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GRA	Proteína de grânulo denso
HC-UFU	Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, <i>High-performance liquid chromatography</i>)
HSP70	Proteína de choque térmico 70
Hz	Hertz
IA	Índice de avidez
IDO	Indoleamina 2,3-dioxigenase
IE	Índice ELISA
IEDB	<i>Immune Epitope Database and Analysis Resource</i>
IFAT	Teste indireto do anticorpo fluorescente
IFN	Interferon
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IHAT	Teste de hemaglutinação indireta
IHC	Imuno-histoquímica
IL	Interleucina
IMC	Complexo interno de membranas
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IRG	GTPases relacionadas à imunidade

ISAGA	Ensaio de aglutinação por imunoabsorção de IgM
kDa	KiloDalton
LAT	Teste de aglutinação em látex
LIP	Laboratório de Imunoparasitologia
LXA₄	Lipoxina A ₄
M	Molar
mA	MiliAmpère
MAC	Complexo de ataque à membrana
MAT	Teste de aglutinação direta modificada
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MIC	Proteína de micronema
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	MiliMolar
mm	Milímetro
Mr	Massa molecular relativa
MVP	Membrana do vacúolo parasitóforo
MYD88	Fator de diferenciação mieloide 88
MW	Massa molecular
M2AP	Proteína associada a MIC2
NF-κB	Fator nuclear κB
NK	Célula <i>natural killer</i>
NKT	Célula T <i>natural killer</i>
nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
pb	Pares de bases
PBS	Solução salina tamponada com fosfato a 0,01M
PBS-T	PBS acrescido de Tween 20 a 0,05%
PBS-TM	PBS-T acrescido de leite desnatado
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Pep	Peptídeo (no caso, peptídeo sintético)
pH	Potencial hidrogeniônico
PPM	Padrão de peso molecular
RN	Recém-nascido
RNA	Ácido ribonucleico
RNI	Reativos intermediários de nitrogênio
RON	Proteína da região do "pescoço" das roptrias (região anterior)
ROP	Proteína de roptria (região posterior ou bulbo das roptrias)
ROS	Espécies reativas do oxigênio
r_s	Coefficiente de correlação
SAG	Antígeno de superfície de <i>Toxoplasma gondii</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
SRS	Superfamília de sequências relacionadas à SAG1
STAg	Antígeno solúvel de taquizoítas de <i>Toxoplasma gondii</i>
SYROCOT	Grupo de Revisão Sistemática em Toxoplasmose Congênita (do inglês <i>Systematic Review on Congenital Toxoplasmosis</i>)
TGF	Fator transformador de crescimento
Th	Resposta imune T <i>helper</i>
TLR	Receptor semelhante ao Toll.

TNF	Fator de necrose tumoral
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano.
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
VP	Vacúolo parasitóforo
v/v	Volume a volume
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	MicroMolar
µm	Micrômetro (10 ⁻⁶ metros)
°C	Grau Celsius (ou Centígrados)

LISTA DE ABREVIATURAS DE AMINOÁCIDOS

A -	Alanina	M -	Metionina
C -	Cisteína	N -	Asparagina
D -	Aspartato	P -	Prolina
E -	Glutamato	Q -	Glutamina
F -	Fenilalanina	R -	Arginina
G -	Glicina	S -	Serina
H -	Histidina	T -	Treonina
I -	Isoleucina	V -	Valina
K -	Lisina	W -	Triptofano
L -	Leucina	Y -	Tirosina

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	22
CAPÍTULO I - Fundamentação teórica.....	25
1 <i>Toxoplasma gondii</i>.....	26
1.1 Hospedeiros.....	27
1.2 Estágios infecciosos - Características morfológicas e ultraestruturais.....	27
1.3 Ciclo biológico.....	31
1.4 Formas de transmissão.....	33
1.5 Prevalência.....	39
1.6 Diversidade genética e estrutura populacional.....	40
1.7 Invasão da célula-hospedeira.....	42
1.8 Resposta imune.....	46
1.8.1 <i>Reconhecimento imune inato</i>.....	46
1.8.2 <i>Mecanismos da imunidade inata</i>.....	48
1.8.3 <i>Imunidade celular</i>.....	48
1.8.4 <i>Imunidade humoral</i>.....	52
1.9 Manifestações clínicas.....	55
1.10 Diagnóstico.....	57
1.10.1 <i>Métodos diretos</i>.....	57
1.10.1.1 <i>Reação em cadeia da polimerase</i>.....	58
1.10.1.2 <i>Imuno-histoquímica</i>.....	59
1.10.1.3 <i>Isolamento em animais ou cultura celular</i>.....	59
1.10.2 <i>Métodos indiretos</i>.....	60
1.10.2.1 <i>Teste do corante de Sabin-Feldman</i>.....	60
1.10.2.2 <i>Testes de aglutinação</i>.....	61
1.10.2.3 <i>Teste de imunofluorescência indireta</i>.....	62
1.10.2.4 <i>Reações de Immunoblotting</i>.....	63
1.10.2.5 <i>Ensaio imunoenzimático</i>.....	64
1.11 Perfis sorológicos na infecção humana por <i>Toxoplasma gondii</i>.....	66
1.12 Prevenção.....	67

1.13	Tratamento.....	68
2	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

CAPÍTULO II - Triagem sorológica pré-natal e neonatal para toxoplasmose: relevância na identificação de gestantes com infecção primária e recém-nascidos com toxoplasmose congênita e consequente indicação de tratamento.....		85
--	--	----

	RESUMO.....	86
	ABSTRACT.....	87
1	INTRODUÇÃO.....	88
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	93
2.1	Pacientes e amostras de soro.....	93
2.2	Manutenção e obtenção de parasitas.....	93
2.3	Preparação de antígeno solúvel de <i>T. gondii</i>	94
2.4	Ensaio imunoenzimático (ELISA).....	94
2.4.1	ELISA indireto.....	95
2.4.2	ELISA de captura IgM e IgA.....	95
2.5	Análises de prontuários clínicos.....	96
2.6	Análises estatísticas.....	97
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	98
3.1	Deteção de anticorpos IgG, IgM e IgA anti- <i>T. gondii</i> em amostras pareadas de soros de mães e recém-nascidos.....	98
3.2	Correlação dos níveis de anticorpos IgG, IgM e IgA anti- <i>T. gondii</i> entre as amostras de soros de mães e recém-nascidos.....	102
3.3	Correlação entre os níveis de anticorpos IgG, IgM e IgA anti- <i>T. gondii</i> nas amostras de soros de mães e nas amostras de recém-nascidos.....	104
3.4	Recém-nascidos com sorologia sugestiva de toxoplasmose congênita.....	107
3.5	Dados clínicos de recém-nascidos com sorologia sugestiva de toxoplasmose congênita.....	109
3.6	Acompanhamento sorológico e ambulatorial dos recém-nascidos com suspeita de toxoplasmose congênita no HC-UFU.....	111
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116

CAPÍTULO III - Deteção de IgG total e subclasses específicas a antígenos de <i>Toxoplasma gondii</i> em amostras pareadas de soros de mães com toxoplasmose primária durante a gestação e recém-nascidos com suspeita de infecção congênita.....		121
--	--	-----

	RESUMO.....	122
	ABSTRACT.....	123
1	INTRODUÇÃO.....	124
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	127
2.1	Pacientes e amostras de soro.....	127
2.2	Manutenção e obtenção de parasitas.....	128
2.3	Preparação de antígeno solúvel de <i>T. gondii</i>.....	129
2.4	Ensaio imunoenzimático - ELISA indireto e ELISA de captura IgM.....	129
2.5	Análises de prontuários clínicos.....	129
2.6	Precipitação de STAg em gradiente de concentração crescente de sulfato de amônio.....	130
2.7	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).....	130
2.8	<i>Immunoblotting</i> para caracterização antigênica das frações de STAg obtidas a partir da precipitação em sulfato de amônio.....	131
2.9	<i>Immunoblotting</i> para detecção de subclasses de IgG anti-<i>T. gondii</i> em amostras pareadas de soros de mães e recém-nascidos.....	132
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	134
3.1	Perfil eletroforético do antígeno solúvel de taquizoítas de <i>T. gondii</i> (STAg) e suas frações obtidas por precipitação em concentrações crescentes de sulfato de amônio.....	134
3.2	Perfil antigênico do (STAg) e de suas frações obtidas por precipitação em concentrações crescentes de sulfato de amônio.....	135
3.3	Antígenos do STAg e suas frações precipitadas em sulfato de amônio reconhecidos por anticorpos IgG presentes em amostras pareadas de soros de mães e recém-nascidos.....	136
3.4	Detecção de subclasses de IgG em amostras pareadas de soros de mães e recém-nascidos usando STAg total e a fração STAg 30-40%.....	142
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	153

	CAPÍTULO IV - Utilização de peptídeos sintéticos derivados de antígenos imunodominantes de <i>Toxoplasma gondii</i> no sorodiagnóstico da toxoplasmose humana.....	157
--	---	------------

	APRESENTAÇÃO.....	158
	ABSTRACT.....	160
1	INTRODUCTION.....	161
2	MATERIALS AND METHODS.....	164

2.1	Patients and serum samples.....	164
2.2	Indirect ELISA-IgG and capture ELISA-IgM.....	164
2.3	B cell epitope prediction and peptide design.....	164
2.4	Synthetic peptides.....	165
2.5	IgG ELISA using synthetic peptides.....	165
2.6	Statistical analysis.....	166
3	RESULTS.....	167
4	DISCUSSION.....	169
	REFERENCES.....	172
	FIGURE LEGENDS.....	176
	TABLES AND FIGURES.....	178

APRESENTAÇÃO

A toxoplasmose é uma zoonose causada pelo parasita *Toxoplasma gondii*, um protozoário oportunista pertencente ao filo Apicomplexa que infecta virtualmente todas as espécies de aves e mamíferos, incluindo a espécie humana. Estimativas apontam que um terço da população mundial esteja infectada por este parasita que, em indivíduos imunocompetentes, geralmente causa uma infecção assintomática ou associada com sintomas inespecíficos e autolimitados. Por outro lado, a infecção por este parasita apresenta importância significativa para gestantes que adquirem a infecção primária durante a gestação, já que há o risco de transmissão congênita do parasita ao feto, podendo causar aborto espontâneo, morte fetal intrauterina ou o nascimento de crianças com anomalias associadas à infecção congênita, tais como hidrocefalia, calcificações cerebrais, retardo mental e coriorretinite, com graves sequelas visuais, incluindo cegueira.

O diagnóstico da infecção por *T. gondii* em gestantes que adquirem a infecção primária durante a gestação e em fetos e recém-nascidos que adquirem a infecção congênita é uma tarefa crítica e desafiadora, sendo que os ensaios sorológicos para avaliação qualitativa e quantitativa de anticorpos específicos presentes em amostras de soros de pacientes constituem as principais ferramentas para tal diagnóstico.

Porém, a sensibilidade e a especificidade dos ensaios sorológicos comumente utilizados no sorodiagnóstico da toxoplasmose humana são altamente dependentes do tipo de antígeno e da modalidade de teste utilizados, havendo demanda crescente para o desenvolvimento de marcadores diagnósticos mais precisos, que permitam distinguir infecção aguda daquela adquirida num passado recente, além de identificar precocemente recém-nascidos portadores de infecção congênita.

A presente tese de Doutorado foi desenvolvida no Laboratório de Imunoparasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia e teve como objetivos principais: (1) a avaliação da importância da triagem sorológica pré-natal de gestantes para a identificação de portadoras de infecção primária por *T. gondii* e consequente indicação de tratamento específico durante a gestação com vistas à prevenção da transmissão congênita, bem como da triagem sorológica neonatal para a identificação de recém-nascidos portadores de infecção congênita por *T. gondii* e consequente indicação de tratamento específico com vistas à minimização das consequências na criança portadora; e (2) a avaliação da aplicabilidade de novas preparações antigênicas derivadas de antígenos de *T. gondii* em protocolos experimentais para a detecção de anticorpos específicos em amostras pareadas de

soros de mães e recém-nascidos com suspeita de infecção congênita, bem como em amostras de pacientes com sorologia prévia sugestiva das fases recente e crônica da toxoplasmose.

Esta tese foi subdividida em 4 capítulos, conforme apresentado a seguir:

Capítulo I - Fundamentação teórica - Apresenta uma revisão de literatura atualizada sobre o protozoário parasita *Toxoplasma gondii*, abordando aspectos como: descoberta, classificação taxonômica, hospedeiros intermediários e definitivos, estágios morfológicos, ciclo biológico, formas de transmissão para a espécie humana, prevalência mundial da infecção, diversidade genética e estrutura populacional, mecanismo de invasão das células hospedeiras, resposta imune celular e humoral do hospedeiro, manifestações clínicas da toxoplasmose humana, métodos de diagnóstico da infecção, formas de prevenção e tratamento.

Capítulo II - Triagem sorológica pré-natal e neonatal para toxoplasmose: relevância na identificação de gestantes com infecção primária e recém-nascidos com toxoplasmose congênita e consequente indicação de tratamento - Apresenta os resultados de estudos envolvendo a avaliação clínica e sorológica de 173 pares de amostras de soros de mães com suspeita de toxoplasmose primária adquirida durante a gestação e seus respectivos recém-nascidos sob risco de transmissão congênita de *T. gondii*. Tais amostras de soros foram provenientes do Setor de Pediatria e Neonatologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU) e seus níveis de anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* foram detectados por meio de ELISA e seus dados clínicos foram avaliados a partir de consultas aos respectivos prontuários clínicos, buscando-se avaliar a importância da triagem sorológica pré-natal de gestantes na indicação de tratamento materno para a prevenção da transmissão congênita de *T. gondii*, e da triagem sorológica neonatal de recém-nascidos na indicação de tratamento específico em casos de suspeita de toxoplasmose congênita.

Capítulo III - Detecção de IgG total e subclasses específicas a antígenos de *Toxoplasma gondii* em amostras pareadas de soros de mães com toxoplasmose primária durante a gestação e recém-nascidos com suspeita de infecção congênita - Apresenta os resultados de estudos envolvendo a utilização do antígeno solúvel de taquizoítas de *T. gondii* (STAg) e de frações deste antígeno obtidas a partir de precipitações sequenciais em soluções de concentrações crescentes de sulfato de amônio em protocolos de diagnóstico da toxoplasmose primária em gestantes e da toxoplasmose congênita em recém-nascidos. Este estudo descreve

o processo de fracionamento do STAg total usando precipitação por sulfato de amônio, bem como a caracterização dos perfis proteico e antigênico das frações obtidas. Além disso, são apresentados os resultados da utilização de STAg total e de uma de suas frações obtidas por precipitação em sulfato de amônio, denominada fração STAg 30-40%, na detecção de anticorpos IgG total e suas subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) em amostras pareadas de soros de mães com suspeita de toxoplasmose primária adquirida durante a gestação e seus respectivos recém-nascidos sob risco de transmissão congênita de *T. gondii* por meio da técnica de *immunoblotting*.

Capítulo IV - Utilização de peptídeos sintéticos derivados de antígenos imunodominantes de *Toxoplasma gondii* no sorodiagnóstico da toxoplasmose humana -

Apresenta os resultados de estudos envolvendo a utilização de peptídeos sintéticos derivados de antígenos imunodominantes de *T. gondii* em protocolos de diagnóstico da toxoplasmose humana, com ênfase na diferenciação entre as fases recente (aguda) e crônica da infecção. Este estudo descreve o processo de identificação de epítomos de células B presentes na sequência de aminoácidos de antígenos imunodominantes de *T. gondii*, utilizando-se ferramentas virtuais de predição de epítomos lineares de células B. Um total de 22 sequências representativas de diversos antígenos do parasita e obtidas a partir desta pesquisa de bioinformática foram usadas para a síntese química de peptídeos de 15 aminoácidos, os quais foram conjugados à albumina sérica bovina (BSA). O estudo descreve ainda os resultados obtidos a partir da utilização destes peptídeos sintéticos como antígenos em ensaios ELISA para a detecção de anticorpos IgG em amostras de soros humanos representativos das fases recente (aguda) e crônica da toxoplasmose. Este capítulo está apresentado na forma de artigo científico redigido conforme as normas do periódico *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, para o qual será enviado para publicação.

CAPÍTULO I

Fundamentação teórica

1 *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii é um protozoário parasita intracelular obrigatório que infecta uma grande variedade de hospedeiros. Foi identificado pela primeira vez por Nicolle e Manceaux (1908) a partir de tecidos de um pequeno roedor do norte da África, semelhante ao hamster, popularmente chamado de gundi (*Ctenodactylus gundi*). Tal roedor estava sendo utilizado em pesquisas sobre a leishmaniose no Laboratório de Charles Nicolle, no Instituto Pasteur da Tunísia, em Túnis, de modo que o parasita identificado foi inicialmente confundido com *Leishmania*. Porém, os autores logo perceberam se tratar de um novo organismo e o deram o nome científico *Toxoplasma gondii*, em função de sua morfologia típica (do latim *toxon*, que significa arco, e do grego *plasma*, que significa vida ou forma) e de seu hospedeiro (gundi) (NICOLLE; MANCEAUX, 1909). O nome correto do parasito deveria ter sido *Toxoplasma gundii*, mas Nicolle e Manceaux haviam identificado incorretamente seu hospedeiro como *Ctenodactylus gundi* (DUBEY, 2008). Neste mesmo ano, Splendore (1908) isolou o mesmo parasita a partir de um coelho mantido no Instituto Biológico de São Paulo, Brasil, também o confundindo inicialmente com *Leishmania*, mas sem nomeá-lo posteriormente.

Após sua descoberta, o parasita foi identificado em diversos outros hospedeiros e recebeu diferentes nomes científicos, de acordo com o hospedeiro em que era isolado. Atualmente, apesar de apresentar uma distribuição mundial e uma ampla variedade de hospedeiros, o gênero *Toxoplasma* apresenta apenas uma espécie, *Toxoplasma gondii* (DUBEY, 2008; SABIN, 1939).

Taxonomicamente, este parasita é classificado como pertencente ao reino Protista, sub-reino Protozoa, filo Apicomplexa, classe Conoidasida, subclasse Coccidiasina, ordem Eucoccidiida (Coccidia), subordem Eimeriorina, família Sarcocystidae, subfamília Toxoplasmatinae, gênero *Toxoplasma* e espécie *Toxoplasma gondii*. Neste mesmo filo Apicomplexa estão incluídos diversos patógenos de importância médica e veterinária, como *Plasmodium* spp., agente etiológico da malária; *Cryptosporidium* spp., agente causador de diarreias graves em indivíduos imunocomprometidos; *Eimeria* spp., agente etiológico da coccidiose em aves; além de *Besnoitia* sp., *Babesia bovis* e *Theileria* spp., agentes causadores de importantes parasitoses em bovinos; e *Neospora caninum*, causador da neosporose em cães e bovinos (BLADER; SAEIJ, 2009; INNES, 2010).

1.1 Hospedeiros

Apesar de sua descoberta em 1908, o ciclo de vida de *T. gondii* somente começou a ser elucidado de forma completa em 1969, após 60 anos da sua identificação e classificação. Isto ocorreu quando foram demonstradas as fases assexuadas do parasita nos tecidos de seus hospedeiros intermediários e os oocistos eliminados nas fezes de gatos domésticos. Além disso, foram descobertas as formas sexuadas nas células intestinais de felídeos (ROBERT-GANGNEUX, 2014; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

T. gondii apresenta uma grande variedade de hospedeiros intermediários, nos quais ocorrem as fases assexuadas de seu ciclo reprodutivo, podendo infectar qualquer célula nucleada destes hospedeiros, mas com preferência por células nervosas e células musculares esqueléticas, especialmente na fase crônica da infecção. Virtualmente, qualquer animal homeotérmico, incluindo aves e mamíferos domésticos, silvestres, selvagens ou marinhos, além de seres humanos, pode ser hospedeiro intermediário deste parasita (DLUGONSKA, 2014; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Além disso, a presença deste protozoário ou de anticorpos específicos já foi demonstrada em seres pecilotérmicos, como peixes, anfíbios e répteis, embora não se conheça a viabilidade do parasita nestes animais nem a importância dos mesmos no seu ciclo de vida (al SADOON; el BAHRAWY, 1998; STONE; MANWELL, 1969; ZHANG et al., 2013).

Já os hospedeiros definitivos de *T. gondii*, nos quais ocorrem as fases sexuadas de seu ciclo de vida, são os mamíferos carnívoros pertencentes à família Felidae, dentre os quais estão os gatos domésticos e outras espécies de felinos selvagens, que liberam oocistos do parasita juntamente com suas fezes (HALONEN; WEISS, 2013; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). Resultados obtidos a partir principalmente da detecção sorológica de anticorpos específicos demonstraram a ocorrência de infecção por *T. gondii* em 31 das 39 espécies conhecidas de felinos, com taxas de soroprevalência muito elevadas nestes animais, as quais podem alcançar até 100% (DUBEY, 2010a).

1.2 Estágios infecciosos - Características morfológicas e ultraestruturais

Há três estágios infecciosos de *T. gondii*: os taquizoítas, os bradizoítas (presentes no interior de cistos teciduais) e os esporozoítas (presentes no interior de oocistos). Estes três estágios apresentam várias diferenças morfológicas quando analisados sob microscopia óptica, bem como diversas diferenças ultraestruturais, evidenciadas por análises de

microscopia eletrônica. Além destes estágios, outras formas mais transitórias podem ser reconhecidas durante as etapas de reprodução sexuada e assexuada do parasita no interior das células de seus hospedeiros definitivos e intermediários, respectivamente (HALONEN; WEISS, 2013).

Taquizoítas: apresentam forma de meia-lua e representam os estágios de multiplicação rápida do parasita durante a fase aguda da infecção. Constituem uma forma de disseminação pelo hospedeiro, pois são capazes de invadir e se multiplicar virtualmente em qualquer tipo celular nucleado de seus hospedeiros, onde se dividem rapidamente por meio do processo de endodiogenia no interior de vacúolos parasitóforos intracitoplasmáticos (Figura 1A). Apresentam dimensões aproximadas de 4 a 8 μm de comprimento e de 2 a 4 μm de largura, com uma extremidade apical afilada e uma extremidade posterior mais arredondada. São revestidos por uma membrana complexa, a película, formada por uma membrana externa contínua (plasmalema) e um conjunto de duas membranas internas incompletas, intimamente associadas ao citoesqueleto, que são interrompidas logo abaixo dos anéis polares do conoide (extremidade apical), no microporo e no poro posterior (SOUZA et al., 2010). Na extremidade anterior ou apical situa-se o conoide, uma estrutura de citoesqueleto envolvida na invasão celular, composto por anéis de microtúbulos (anéis apicais 1 e 2 e anéis polares 1 e 2). O citoesqueleto subpelicular é composto por 22 microtúbulos que se dispõem de maneira espiral sob o complexo da membrana interna e se estendem do anel polar até a extremidade posterior do parasita, conferindo-lhe a capacidade de se movimentar ativamente pelo processo conhecido como *gliding* (HALONEN; WEISS, 2013). Como membros do filo Apicomplexa, taquizoítas de *T. gondii* apresentam um complexo apical, formado pelo conoide e por diversas organelas secretórias, como as roptrias, os micronemas e os grânulos densos. São encontradas cerca de 4 a 10 roptrias localizadas na região anterior ao núcleo, enquanto os micronemas são mais numerosos e concentrados na região anterior do parasita. Já os grânulos densos são encontrados dispersos por todo o citoplasma, concentrando-se na extremidade anterior. Na região central da película localiza-se o microporo, que é considerado como um sítio ativo de captura de macromoléculas por endocitose. Além disso, são encontradas diversas outras organelas e inclusões citoplasmáticas típicas de células eucarióticas e características de parasitas apicomplexas, tais como mitocôndrias, retículo endoplasmático, complexo golgiense, grânulos de amilopectina, corpos lipídicos e o núcleo, normalmente organizado na porção mais central da célula (Figura 2) (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; SOUZA et al., 2010; SPEER et al., 1999).

Uma organela intrigante, de função pouco conhecida e aparentemente essencial para a sobrevivência de *T. gondii* e da maioria dos demais integrantes do filo Apicomplexa é o apicoplasto. Trata-se de uma organela aparentemente derivada do cloroplasto, provavelmente adquirida a partir de uma endossimbiose secundária com uma alga vermelha, mas sem capacidade fotossintética, portadora de genoma próprio, muito similar ao genoma de seres procariontes, e apresentando genes que codificam uma enzima RNA polimerase e componentes ribossomais. Sua função primária parece ser a síntese de ácidos graxos e isoprenoides (KIM; WEISS, 2004; ROOS et al., 1999).

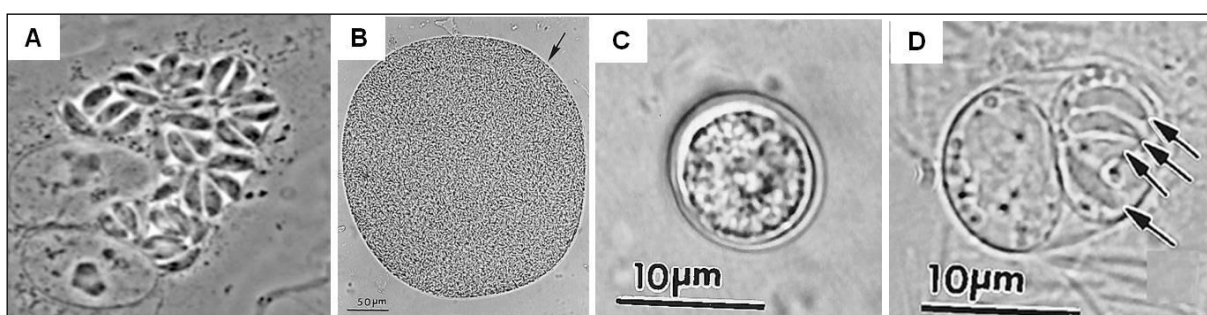


Figura 1 – Estágios infecciosos de *Toxoplasma gondii*. (A) Taquizoítas da cepa RH no interior de células HeLa em cultura após ciclo de multiplicação por endodiogenia e prontos para o egresso destas células; (B) Cisto tecidual obtido a partir de homogenato de cérebro de rato após 14 meses de infecção com a cepa VEG, contendo milhares de bradizoítas em seu interior. A seta aponta para a parede do cisto; (C) Oocisto não esporulado liberado nas fezes de gato experimentalmente infectado, mostrando massa central ocupando todo o espaço interno da estrutura; (D) Oocisto esporulado com dois esporocistos em seu interior, evidenciando a presença de quatro esporozoítas no interior de um deles (apontados pelas setas). No outro esporocisto, os esporozoítas não foram totalmente focalizados. **Fonte:** Adaptado a partir de Dubey, Lindsay e Speer (1998).

Bradizoítas: resultam da conversão de taquizoítas sob pressão imune do hospedeiro, sendo morfológicamente idênticos a estes, porém fisiologicamente diferentes, pois se multiplicam de forma bem mais lenta e expressam algumas moléculas de superfície diferentes daquelas expressas pelos taquizoítas. As principais diferenças ultraestruturais observadas entre as duas formas estão relacionadas à posição do núcleo (próximo à extremidade posterior nos bradizoítas e mais centralizado nos taquizoítas), maior número de roptrias nos taquizoítas, predominância de grânulos de amilopectina nos bradizoítas e maior resistência destes à ação de enzimas proteolíticas, como a pepsina (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998). Têm dimensões aproximadas de 7,5 μm de comprimento e 2,5 μm de largura, apresentando roptrias, micronemas e grânulos densos concentrados preferencialmente na sua porção anterior (Figura 2) (SOUZA et al., 2010; SPEER et al., 1999).

Bradizoítas estão presentes no interior de cistos teciduais, os quais podem ser encontrados em diversos tecidos, mas com localização preferencial nas células nervosas e musculares esqueléticas. O formato dos cistos varia de acordo com a localização, sendo esferoidais nas células nervosas e alongados nas células musculares, e seu tamanho é muito variável, dependendo do número de bradizoítas no seu interior, de sua forma e do tecido onde se encontram. Geralmente, cistos mais jovens apresentam 10 μm de comprimento e contêm apenas dois bradizoítas em seu interior, enquanto cistos mais velhos podem ter até 100 μm de comprimento e conter centenas ou até milhares de bradizoítas (Figura 1B). O interior do cisto não se encontra separado em compartimentos por meio de septos e sua parede é fina e lisa, consistindo de uma membrana com numerosas invaginações e uma camada de material granular, que protege os bradizoítas dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro (SPEER et al., 1999). Cistos representam estágios infecciosos tanto para os hospedeiros intermediários quanto para os hospedeiros definitivos e, no seu interior, os bradizoítas persistem por toda a vida de seus hospedeiros. Porém, a morte da célula hospedeira pode desencadear a ruptura da parede do cisto e a liberação dos bradizoítas, que poderão invadir outras células. Em situações de imunossupressão do hospedeiro, os bradizoítas também podem ser liberados dos cistos, convertendo-se novamente em taquizoítas e determinando a reativação da infecção no hospedeiro (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

Esporozoítas: são estágios morfologicamente semelhantes aos taquizoítas, porém apresentam micronemas, roptrias e grânulos de amilopectina mais abundantes e estão contidos em esporocistos no interior dos oocistos esporulados (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998). Os oocistos são estruturas envolvidas por uma parede extremamente resistente, que protege o parasita contra danos provocados por agentes físicos e químicos, e são formados no interior das células epiteliais intestinais dos hospedeiros definitivos e liberadas na forma não esporulada juntamente com suas fezes (Figura 1C). A esporulação ocorre no ambiente em torno de 2 a 5 dias após sua liberação nas fezes de felídeos infectados, e os oocistos esporulados são estruturas subesféricas, medindo aproximadamente 13 μm de comprimento e 11 μm de largura, que contêm dois esporocistos elipsoides, cada um medindo 8 μm x 6 μm , e cada esporocisto contém quatro esporozoítas em seu interior (Figura 1D) (JONES; DUBEY, 2010, 2012; SPEER et al., 1999). Durante a fase aguda, um gato doméstico com infecção primária pelo parasita pode liberar até 100 milhões de oocistos durante um período de até 28 dias (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

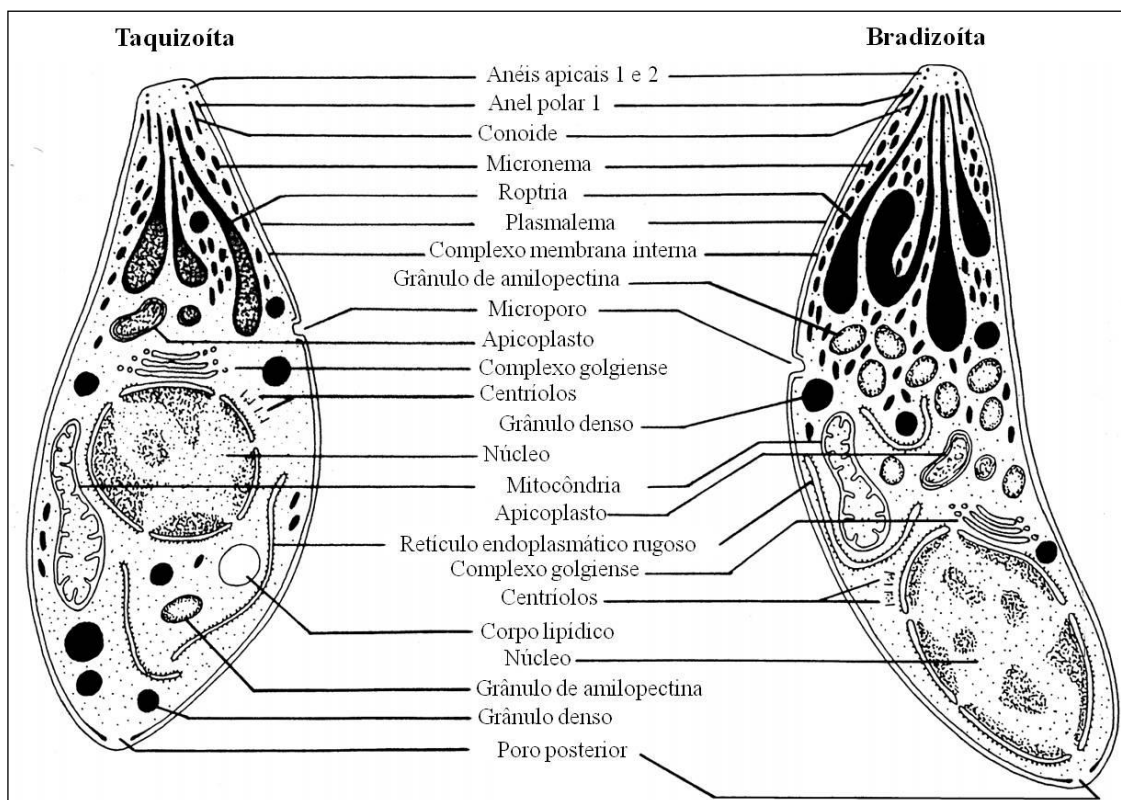


Figura 2 – Representação esquemática das formas taquizoíta e bradizoíta de *Toxoplasma gondii*. Este esquema apresenta a morfologia, bem como as principais organelas e estruturas celulares presentes nos estágios taquizoíta (esquerda) e bradizoíta (direita) de *T. gondii*, conforme observações em microscopia eletrônica de transmissão. As diferenças morfológicas e ultraestruturais entre estes dois estágios e a forma esporozoíta são descritas no texto.

Fonte: Adaptado a partir de Dubey, Lindsay e Speer (1998).

1.3 Ciclo biológico

O ciclo biológico de *T. gondii* é do tipo heteroxeno, alternando entre fases de reprodução assexuada em seus hospedeiros intermediários e fases de reprodução sexuada em seus hospedeiros definitivos, e envolve as três formas infecciosas: taquizoítas, bradizoítas e esporozoítas (HALONEN; WEISS, 2013).

A reprodução sexual do parasita ocorre apenas no interior das células epiteliais intestinais de felídeos (gatos domésticos e felinos selvagens). Tais animais se tornam infectados a partir da ingestão de cistos teciduais contendo bradizoítas presentes nos tecidos dos hospedeiros intermediários predados. Após a ingestão, a parede do cisto é destruída pela ação das enzimas digestivas do hospedeiro e os bradizoítas são liberados, invadindo ativamente as células epiteliais intestinais e multiplicando-se algumas vezes de forma assexuada por um processo de esquizogonia, que leva à formação de merozoítas (Figura 3). Tais merozoítas rompem as células onde foram formados e invadem novas células, onde se

diferenciam em gametas masculino e feminino pelo processo de gamogonia. Após a fertilização, são formados oocistos no interior das células intestinais, os quais são liberados pela ruptura destas células e excretados na forma não esporulada para o ambiente juntamente com as fezes dos felídeos. A liberação destes oocistos não esporulados nas fezes de gatos infectados começa 3 a 7 dias após a ingestão dos cistos teciduais. A conversão de oocistos não esporulados em oocistos esporulados ocorre de 2 a 5 dias após sua liberação no ambiente, em condições adequadas de temperatura, umidade e oxigenação, por meio do processo de esporogonia, que se caracteriza por uma divisão meiótica e por mudanças morfológicas, que levam à formação de um oocisto esporulado contendo dois esporocistos, cada um destes com quatro esporozoítas haploides em seu interior (Figura 3) (DUBEY, 2010a; JONES; DUBEY, 2010, 2012). Tais oocistos esporulados contaminam o solo e a água, podendo permanecer viáveis por longos períodos de tempo, constituindo formas infecciosas para os hospedeiros intermediários e, eventualmente, para os próprios hospedeiros definitivos, apesar da menor eficiência (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000; TORREY; YOLKEN, 2013).

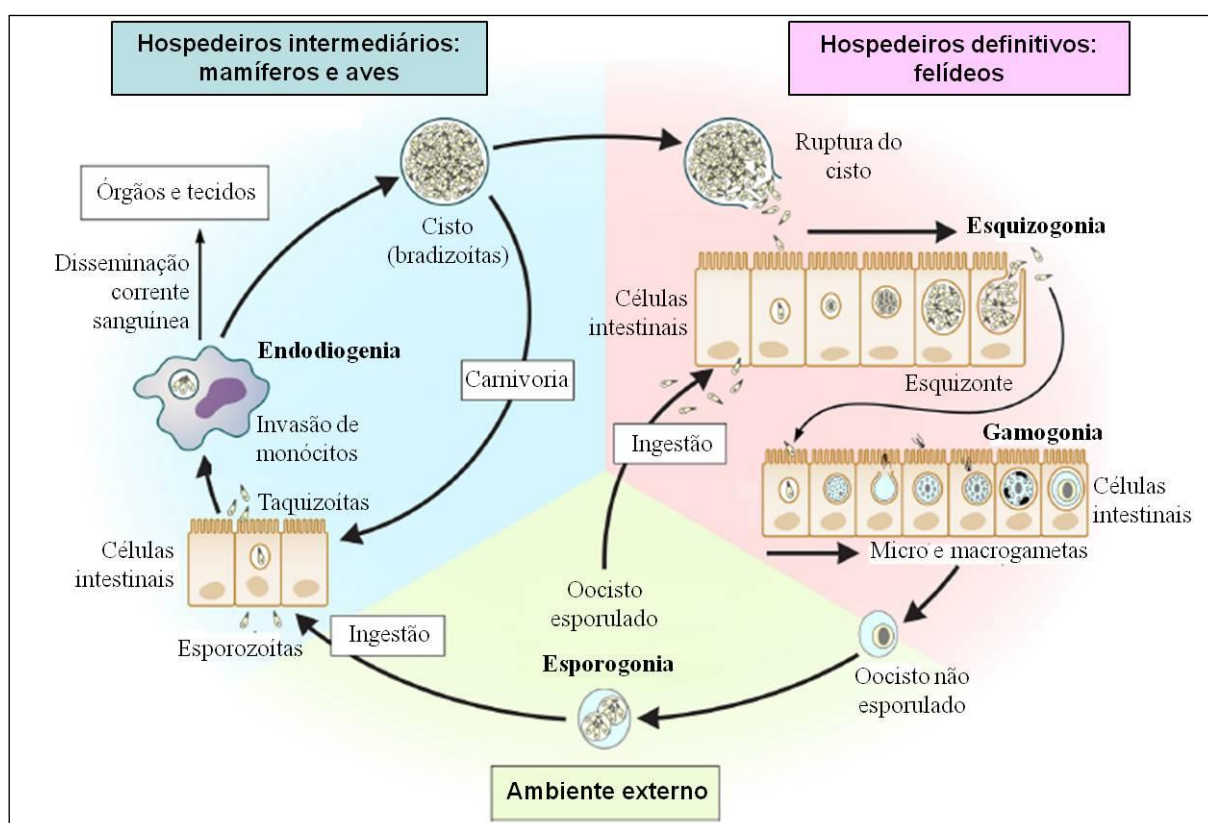


Figura 3 – Ciclo reprodutivo de *Toxoplasma gondii*. Esquema representativo do ciclo reprodutivo de *T. gondii*, evidenciando os principais eventos e as principais etapas de reprodução deste parasita em seus hospedeiros intermediários e definitivos, bem como as formas com que estes hospedeiros se tornam infectados.

Fonte: Adaptado a partir de Robert-Gangneux e Dardé (2012).

Já os hospedeiros intermediários abrigam apenas as formas de reprodução assexuada do parasita, podendo se tornar infectados pela ingestão de cistos teciduais contendo bradizoítas, por meio do carnivorismo, ou pela ingestão de oocistos contendo esporozoítas, presentes na água ou nos alimentos. Após a ingestão de oocistos por estes hospedeiros, sua parede também é destruída pelas enzimas gástricas e os esporozoítas são liberados, de modo a invadir as células epiteliais intestinais de seus hospedeiros, onde se multiplicam assexuadamente por endodiogenia e se diferenciam em taquizoítas. Após este ciclo inicial de multiplicação, os taquizoítas são liberados pelo rompimento da membrana das células epiteliais intestinais e invadem qualquer tipo de célula nucleada de seus hospedeiros, onde se multiplicam novamente por endodiogenia. Estes ciclos de reprodução levam à formação de vários outros taquizoítas, que se disseminam por todos os tecidos do hospedeiro (Figura 3) (JONES; DUBEY, 2010, 2012). Durante esta fase da infecção (fase aguda), os taquizoítas podem estimular o desenvolvimento de forte resposta inflamatória pelo hospedeiro, a qual pode pressionar a conversão de taquizoítas em bradizoítas, que ficam confinados no interior de cistos teciduais intracelulares, principalmente nas células do sistema nervoso central, dos olhos e dos músculos estriados esquelético e cardíaco, onde podem permanecer por toda a vida do hospedeiro (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; SULLIVAN Jr.; JEFFERS, 2012).

Por outro lado, quando cistos teciduais são ingeridos por um hospedeiro intermediário, estes se rompem no intestino, também por ação das enzimas digestivas, liberando bradizoítas, que invadem as células epiteliais intestinais e se diferenciam novamente em taquizoítas. Estes se multiplicam por endodiogenia e disseminam pelos tecidos deste hospedeiro, conforme discutido anteriormente, até se diferenciarem novamente em bradizoítas sob pressão da resposta imune, formando cistos teciduais (Figura 3) (JONES; DUBEY, 2010, 2012; MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

1.4 Formas de transmissão

A espécie humana pode se tornar infectada pelos três estágios infecciosos de *T. gondii* a partir de diferentes vias de transmissão, conforme esquematizado na Figura 4. Assim, as principais formas de transmissão deste parasita em humanos são apresentadas a seguir.

(1) - Ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cistos teciduais com a forma bradizoíta. A rota oral de infecção por *T. gondii* parece ser a mais importante para a espécie humana e o risco de infecção associado com a ingestão de determinados tipos de carne varia muito entre diferentes regiões, em função dos hábitos culturais, alimentares e de higiene das

populações humanas de diferentes localizações geográficas, e de acordo com a prevalência da infecção nos animais produtores de carne, o que leva a diferenças significativas na soroprevalência mundial deste parasita. Um estudo europeu apontou que o consumo de carne pode ser responsável por 30 a 63% dos casos de infecção por *T. gondii* naquele continente (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

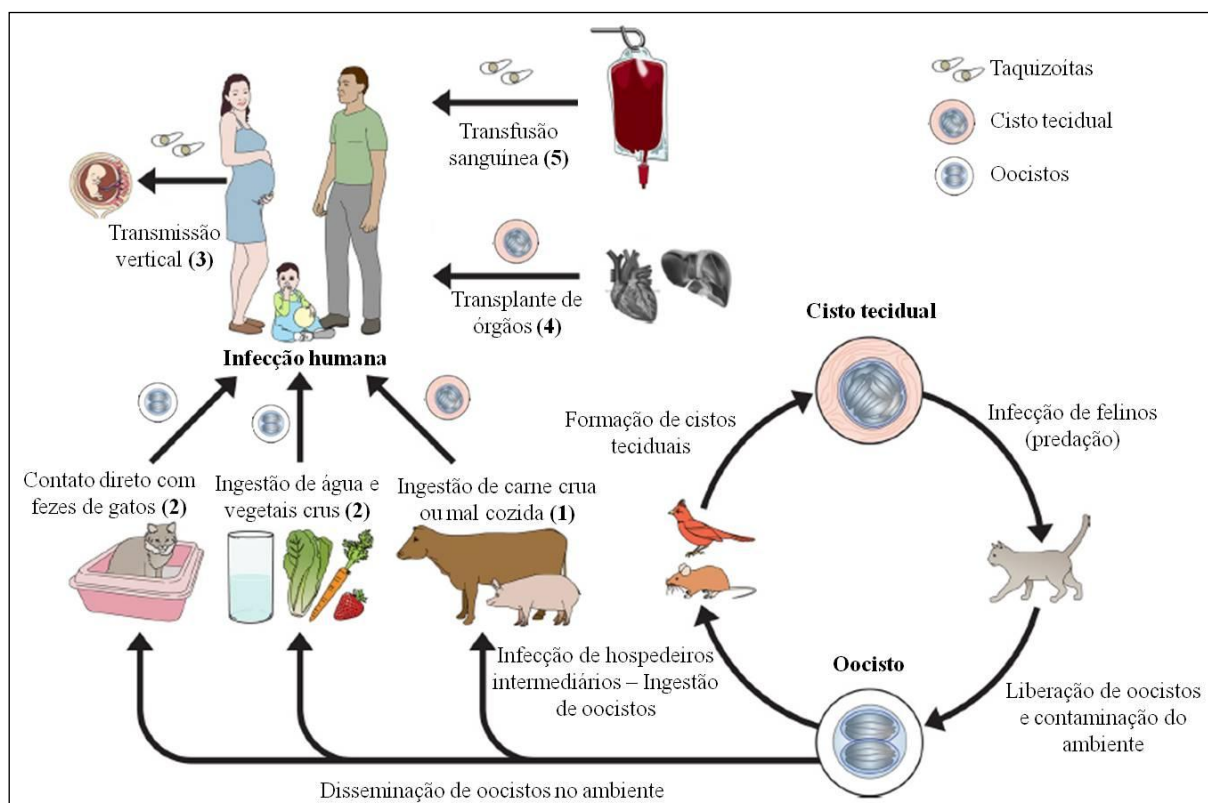


Figura 4 – Formas de transmissão de *Toxoplasma gondii* para a espécie humana. Esquema representativo das formas de transmissão do parasita *T. gondii* para os humanos. Os números (1-5) indicados entre parênteses após cada forma de transmissão corresponde à ordem de descrição no texto. **Fonte:** Adaptado a partir de Esch e Petersen (2013) e de Robert-Gangneux (2014).

As principais fontes de infecção por cistos teciduais para os humanos são as carnes de suínos, ovinos, caprinos e frangos (principalmente frangos criados livremente - galinhas "caipiras") (Figura 4) (DUBEY et al., 2012; JONES; DUBEY, 2012). No caso das carnes de suínos e frangos, as técnicas intensivas de criação destes animais destinados ao consumo humano, que são mantidos em ambientes fechados e recebendo água e alimentação controlada, com boas condições sanitárias, reduziram as possibilidades de infecção destes animais e, conseqüentemente, de transmissão para as pessoas (DUBEY et al., 2005). No entanto, a demanda atual por carnes "orgânicas", provenientes de animais criados livremente, tem aumentado a prevalência de infecção nestes animais, por facilitar seu contato com

alimentos e água contaminados com fezes de gatos, aumentando também os riscos de transmissão para as pessoas por meio da ingestão de sua carne (DUBEY, 2010b; DUBEY et al., 2012; KIJLSTRA et al., 2004).

O consumo de carne bovina ou produtos lácteos não é considerado importante na epidemiologia de *T. gondii*, pois os bovinos não são hospedeiros preferenciais para o parasita, apresentando baixas soroprevalências. Porém, alguns estudos tem relacionado a infecção por *T. gondii* com a ingestão de carne bovina crua ou mal cozida, ou com a manipulação destas carnes (DUBEY, 2010a). O hábito de ingerir alguns tipos de carnes cruas, procedentes de animais criados sem controle sanitário adequado ou provenientes de abates clandestinos está relacionado com uma maior taxa de transmissão por meio da ingestão de bradizoítas presentes em cistos teciduais (COOK et al., 2000). Porém, os processos de tratamento e processamento de carnes, tais como cozimento a temperaturas superiores a 67°C, o salgamento e a defumação podem reduzir a viabilidade de cistos teciduais, reduzindo suas possibilidades de transmissão para as pessoas (HILL et al., 2006; JONES; DUBEY, 2012).

(2) - Ingestão de água e alimentos contaminados com oocistos excretados nas fezes de felídeos infectados, principalmente gatos domésticos. A infecção por meio da ingestão de oocistos eliminados nas fezes de gatos infectados também é alta em algumas regiões, indicando um importante papel destes animais na propagação do parasita entre seres humanos e outros animais domésticos e selvagens, uma vez que a carga ambiental de oocistos pode ser muito alta (TORREY; YOLKEN, 2013). O contato direto com gatos não é considerado um fator de risco muito relevante para a aquisição do parasita, mas sim o contato com suas fezes. Isto porque gatos infectados geralmente eliminam oocistos nas fezes apenas uma vez na vida, por um período curto, em torno de 1 a 2 semanas após a infecção primária, e tais oocistos são excretados na forma não esporulada, necessitando de um período de 2 a 3 dias em condições ambientais favoráveis para esporular e se tornar infecciosos (Figura 4) (JONES et al., 2009; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

No entanto, a contaminação ambiental por oocistos apresenta grande importância epidemiológica, já que estas estruturas podem permanecer viáveis no solo e na água por períodos superiores a 1 ano, principalmente em regiões tropicais, que são quentes e úmidas (GOMEZ-MARIN et al., 2011). Oocistos podem contaminar fontes e reservatórios de água de abastecimento e, por serem resistentes aos métodos físicos e químicos tradicionalmente utilizados no tratamento da água de consumo (como a cloração), podem permanecer viáveis e serem transmitidos às pessoas (DUMÈTRE et al., 2008). A transmissão de *T. gondii* por

ingestão de água proveniente de reservatórios contaminados com oocistos já foi associada a vários surtos de toxoplasmose em seres humanos em diferentes regiões do mundo (ARAMINI et al., 1999; BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003; BALASUNDARAM et al., 2010; MOURA et al., 2006). Neste sentido, o consumo de água fervida e/ou filtrada constitui-se em importante medida preventiva contra a infecção por esta via. Oocistos também podem ser carregados para ambientes marinhos e permanecer viáveis na água do mar por longos períodos, acarretando a infecção de animais destes ambientes (JONES; DUBEY, 2010). Mariscos, ostras, mexilhões e outros animais filtradores podem concentrar oocistos presentes na água, de modo que o consumo destes frutos do mar pode ser um fator de risco para a aquisição de infecção por *T. gondii* (ESMERINI; GENNARI; PENA, 2010; MILLER et al., 2008; PUTIGNANI et al., 2011).

O contato com o solo durante atividades de cultivo, jardinagem ou recreação foi identificado como um forte fator de risco para toxoplasmose em um estudo europeu, que demonstrou que 6 a 17% das infecções primárias em humanos são devidas a este fator naquele continente (COOK et al., 2000). O risco de aquisição de oocistos de *T. gondii* após contato com o solo ou pela ingestão de partículas de solo é particularmente elevado para crianças, e um estudo brasileiro relatou o isolamento de oocistos a partir da areia de aproximadamente 32% dos parquinhos recreativos escolares analisados em uma região do interior do estado de São Paulo (SANTOS et al., 2010). A água e o solo contaminados podem agir como veículos para a transferência de oocistos para frutas e vegetais, de modo que o consumo destes alimentos crus e mal higienizados pode ser um importante fator de risco para toxoplasmose, apesar de haver poucos dados que confirmem esta possibilidade, além de nenhum relato de detecção de *T. gondii* em frutas e vegetais sob condições não experimentais (BERGER et al., 2009; KNIEL et al., 2002; LIU et al., 2009).

A transmissão mecânica de oocistos por outros animais também já foi relatada e pode constituir uma fonte de infecção para seres humanos. Alguns animais, como cães, pombos, baratas, moscas e besouros podem veicular oocistos de um local para outro, facilitando sua disseminação. Além disso, cães de estimação, devido ao hábito de “rolar” no solo, podem adquirir oocistos e retê-los nos pelos, podendo transmiti-los para pessoas por meio de contato direto (DUBEY, 2004; SCHARES et al., 2005).

(3) - Transmissão congênita, por meio da transferência de taquizoítas da mãe para o feto através da placenta (transmissão vertical), principalmente na fase aguda da infecção. A transmissão por via placentária da mãe para o filho é a forma de transmissão que mais merece

a atenção das autoridades de saúde, pois resulta na toxoplasmose congênita, forma mais grave da infecção, que pode levar a diversas consequências negativas para o feto e/ou recém-nascido. A transmissão congênita normalmente ocorre quando formas taquizoítas colonizam os tecidos placentários durante a disseminação do parasita na infecção aguda, podendo atravessar a placenta e alcançar o compartimento fetal. Isto normalmente ocorre durante uma infecção materna primária adquirida durante a gestação e constitui a transmissão transplacentária exógena (Figura 4) (ROBERT-GANGNEUX, 2014).

A transmissão congênita durante a fase crônica da infecção, ou seja, quando a infecção materna é adquirida antes da gestação, é menos comum, mas pode ocorrer em algumas situações, como em gestantes portadoras de doenças imunossupressoras, como a AIDS (Síndrome da deficiência imunológica adquirida), ou sob uso de drogas imunossupressoras, tais como corticosteroides ou outras drogas usadas por portadores de doenças autoimunes ou por receptores de transplantes de órgãos, ou quimioterápicos usados por portadores de doenças tumorais. Tais situações podem levar à reativação de uma infecção crônica, com a conversão de bradizoítas presentes em cistos teciduais em taquizoítas, que atravessam a placenta e infectam o feto (CAMPOS et al., 2014). Esta forma de transmissão caracterizada pela reativação de uma infecção crônica tem sido denominada atualmente como transmissão transplacentária endógena (TREES; WILLIAMS, 2005). Há trabalhos relatando a transmissão transplacentária de *T. gondii* em mulheres imunocompetentes após reinfecção materna durante a gestação (GAVINET et al., 1997; KODJIKIAN et al., 2004; VALDÉS et al., 2011), bem como a transmissão transplacentária em uma mulher imunocompetente infectada antes da gestação, mas com reativação de toxoplasmose ocular durante a gestação (ANDRADE et al., 2010).

A transmissão de *T. gondii* da mãe para o filho por meio da amamentação, apesar de ser comum em algumas espécies animais, como os roedores, ainda não foi relatada na espécie humana (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

(4) - Transplante de órgãos contendo cistos de *T. gondii* de um doador infectado para um receptor soronegativo. Apesar de cistos poderem estar presentes em virtualmente qualquer órgão de um indivíduo infectado, certos órgãos são mais prováveis de abrigar cistos persistentes, como os músculos e o cérebro. Assim, pacientes submetidos a transplantes de coração estão sob maior risco de adquirir toxoplasmose relacionada ao órgão, quando comparados a pacientes submetidos a transplantes de fígado, rim ou pulmão (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Em um estudo retrospectivo multicêntrico incluindo 22

pacientes transplantados com toxoplasmose adquirida e diagnosticada num período médio de 92 dias pós-transplante, 12 pacientes haviam recebido transplante de coração (FERNÁNDEZ-SABÉ et al., 2012). Isto evidencia a importância da determinação da presença de infecção prévia no doador e a necessidade de tratamento e quimioprofilaxia no receptor de um órgão proveniente de doador infectado. Outro problema mais comum relacionado à toxoplasmose e ao transplante de órgãos consiste na reativação após o transplante de uma infecção crônica presente no receptor, em virtude do tratamento com drogas imunossupressoras utilizadas após o transplante, as quais reduzem a pressão imune sobre as formas bradizoítas, promovendo sua conversão em taquizoítas (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

(5) - Transfusão sanguínea de doadores infectados para receptores soronegativos. O risco de transmissão da infecção por transfusão sanguínea ou por transplante de medula óssea é teoricamente possível se o doador tiver sido infectado pouco tempo antes da doação e, no momento da coleta da amostra de sangue, apresentar parasitemia, ou seja, taquizoítas circulantes no plasma ou no interior de células sanguíneas (como os leucócitos). Porém, a duração da parasitemia na infecção humana é desconhecida e pode depender da linhagem do parasita e da resposta imune do hospedeiro (GUY; JOYNSON, 1995; KRAVETZ; FEDERMAN, 2005). Não há relatos na literatura de associação de infecção humana por *T. gondii* adquirida a partir de transfusão de sangue ou hemoderivados.

(6) - Acidentes laboratoriais ou entre profissionais de saúde com objetos perfurocortantes contaminados com taquizoítas viáveis presentes em sangue ou secreções, ou acidentes laboratoriais envolvendo suspensões parasitárias ou fluidos corporais de animais infectados. Em 14 casos descritos na literatura de contaminação laboratorial com *T. gondii*, a maioria envolvia acidentes com agulhas contaminadas com a cepa RH do parasita (HERWALDT, 2001).

Como as formas taquizoítas de *T. gondii* são muito frágeis fora de seus hospedeiros, sendo muito sensíveis às condições ambientais e facilmente destruídas por enzimas digestivas, a transmissão horizontal destas formas do parasita é muito rara e pouco importante do ponto de vista epidemiológico. No entanto, há trabalhos relacionando raros casos de infecção por *T. gondii* adquirida após o consumo de leite de cabra não pasteurizado contaminado com taquizoítas, sugerindo que estas formas do parasita podem penetrar os tecidos de mucosa antes da destruição pelas enzimas digestivas (JONES et al., 2009; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

Em trabalhos recentes de infecção experimental por *T. gondii* em cães e em ovelhas, verificou-se a presença do parasita no sêmen dos animais infectados e sua transmissão por via sexual para fêmeas soronegativas, comprovando uma nova via de transmissão nestes animais (ARANTES et al., 2009; LOPES et al., 2013). Resultados de trabalhos atuais apontam que *T. gondii* pode ser transmitido de machos para fêmeas por meio do sêmen contaminado em diversas espécies de animais (DASS et al., 2011). Esta observação levanta a possibilidade de que uma importante fonte de infecção para mulheres, e não para os homens, possa ser a transmissão sexual por meio de relações sexuais desprotegidas, o que poderia explicar a alta incidência da infecção entre mulheres jovens (FLEGR, 2013; PETERSEN et al., 2010).

1.5 Prevalência

Estimativas baseadas principalmente em inquéritos sorológicos indicam que cerca de 25 a 30% da população humana mundial seja infectada por *T. gondii* (ROBERT-GANGNEUX, 2014). A prevalência varia largamente entre os diferentes países (de 10 a 80%), entre diferentes regiões de um mesmo país e, mesmo, entre diferentes comunidades vivendo em uma mesma região. Em geral, baixa soroprevalência (entre 10 e 30%) é observada na América do Norte, no Sudeste Asiático, no norte da Europa e nos países africanos da região do Deserto do Saara. Prevalência moderada (entre 30 e 40%) é encontrada em países do sul e da região central da Europa, enquanto alta prevalência é observada na América do Sul e nos países tropicais da África (Figura 5) (MAENZ et al., 2014; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

Diversos fatores estão relacionados com as diferenças nas taxas de soroprevalência de *T. gondii* nas diferentes regiões. Dentre estes fatores, destacam-se as condições climáticas de cada região, as quais afetam diretamente a viabilidade de oocistos no ambiente e a consequente transmissão para humanos e para animais utilizados na produção de carne para consumo humano. Porém, vários outros fatores podem estar relacionados com as variações na prevalência humana da infecção, tais como hábitos alimentares, nível socioeconômico, hábitos sociais e culturais, qualidade da água destinada ao consumo humano e condições de saneamento básico (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). No entanto, a soroprevalência tem diminuído nas últimas décadas na maioria dos países desenvolvidos e em desenvolvimento, provavelmente como resultado de múltiplos fatores, tais como melhoria nas condições socioeconômicas e nas medidas higiênicas,

mudanças nos sistemas de criação de animais para produção de carne, consumo de carne congelada e alimentação de gatos com comida esterilizada (DUBEY; JONES, 2008).

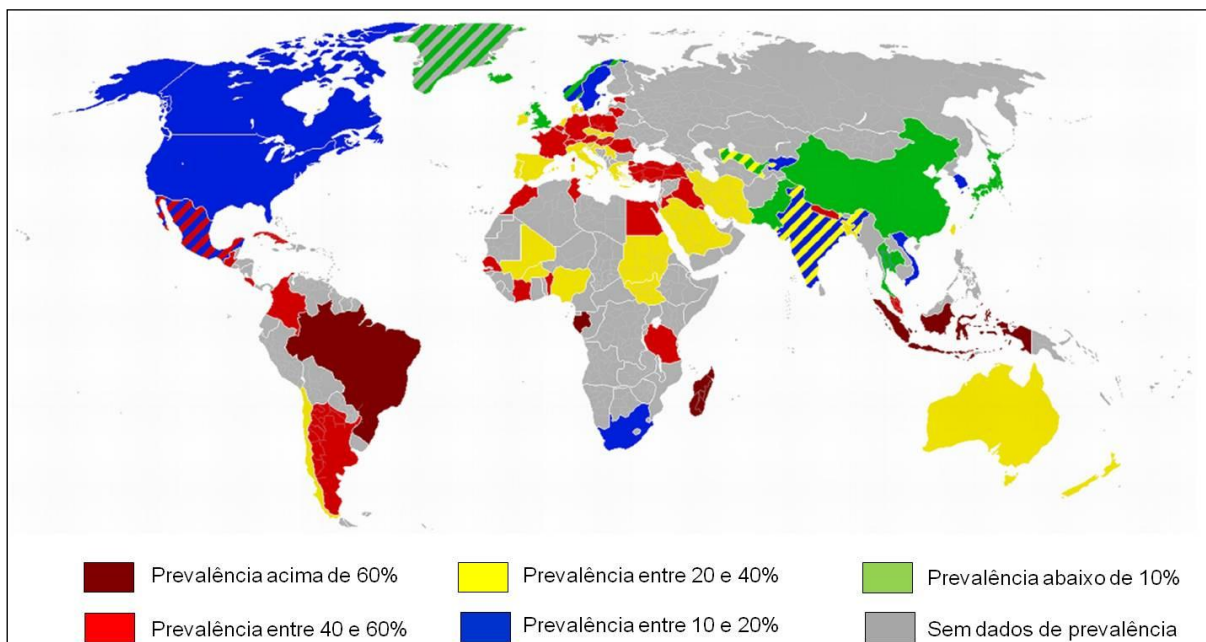


Figura 5 – Soroprevalência mundial da infecção por *Toxoplasma gondii* na espécie humana. Mapa mundi representando a distribuição da infecção por *T. gondii* em humanos nos diferentes países de cada continente a partir de estimativas das taxas de soroprevalência. Os países marcados com mais de uma cor (áreas estriadas) apresentam grandes variações regionais nas taxas de soroprevalência.
Fonte: Adaptado a partir de Maenz e colaboradores (2014) e de Robert-Gangneux (2014).

1.6 Diversidade genética e estrutura populacional

Apesar de apenas uma espécie de *T. gondii* ser responsável pela toxoplasmose em animais e humanos no mundo todo, desde os anos 1990 tem sido demonstrado que os isolados clínicos da América do Norte e da Europa poderiam ser divididos em três genótipos principais ou linhagens clonais, estáveis no tempo e no espaço, e que diferiam entre si em uma taxa de aproximadamente 1 a 2% de seus genes (BOOTHROYD, 2009; HOWE; SIBLEY, 1995).

As três linhagens clonais de *T. gondii* foram então designadas tipo I, tipo II e tipo III, as quais diferem na virulência e nos padrões epidemiológicos de ocorrência. Linhagens do tipo I são altamente virulentas para camundongos, de modo que apenas 1 parasita desta linhagem pode matar um camundongo na fase aguda. Em geral, o inóculo desta linhagem necessário para induzir uma taxa de letalidade de 100% (Dose Letal de 100% [DL100]) dos camundongos infectados é menor que 10 parasitas, enquanto as linhagens do tipo II e do tipo III são bem menos virulentas em camundongos, com uma DL50 (Dose Letal de 50%) em

torno de 10^3 (tipo II) e 10^5 parasitas (tipo III), sendo designadas como avirulentas ou pouco virulentas (SAEIJ; BOYLE; BOOTHROYD, 2005; YAROVINSKY, 2014).

Porém, nos anos 2000, estudos mais aprofundados de genotipagem de isolados provenientes de outros continentes revelaram uma estrutura populacional de *T. gondii* muito mais complexa, com uma diversidade genética muito maior, refletindo maior circulação entre os hospedeiros e maior taxa de recombinação genética durante o ciclo sexual do parasita nos hospedeiros definitivos (AJZENBERG et al., 2004). Isto levou à geração de isolados resultantes da recombinação entre as três linhagens (I/II, I/III ou II/III), mas também a novos haplogrupos clonais, sendo 12 deles descritos atualmente, incluindo os três genótipos iniciais (ROBERT-GANGNEUX, 2014).

Em algumas regiões geográficas, particularmente na América do Sul, esta maior recombinação levou à geração de genótipos atípicos, com muitos polimorfismos únicos, que não podem ser agrupados em nenhum dos 12 haplogrupos descritos. No Brasil, por exemplo, apesar de linhagens clonais adicionais, denominadas haplogrupos BrI a BrIV, serem comuns e endêmicas, recombinações genéticas frequentes tem gerado uma grande variedade de diferentes genótipos, de modo que 88 genótipos distintos já foram identificados em uma variedade de espécies animais, além de novos genótipos serem continuamente identificados (PENA et al., 2008, 2011).

Na Europa, linhagens do tipo II são predominantes entre humanos e animais e são isoladas em mais de 90% dos casos de infecção congênita na França. Outras linhagens clonais são ocasionalmente (tipo III) ou excepcionalmente (tipo I) descritas na Europa, sendo que, na França, o isolamento excepcional de cepas atípicas geralmente está relacionado a migrantes ou viajantes oriundos da América do Sul ou ao consumo de carne importada destas regiões. O quadro epidemiológico é relativamente similar na América do Norte, onde cepas do tipo II também predominam, apesar de dados recentes sugerirem uma prevalência maior de cepas atípicas na América do Norte, além da existência de um outro haplogrupo clonal recentemente identificado (haplogrupo 12) (ROBERT-GANGNEUX, 2014; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2014).

Por contraste, genótipos atípicos predominam largamente na América do Sul, onde isolados do tipo II são muito raros, enquanto na África linhagens clonais conhecidas como haplogrupos *Africa 1-3* coexistem com linhagens tipo II e III (MERCIER et al., 2010). Dados da Ásia são escassos, mas alguns estudos revelam uma diversidade genética mais limitada que a observada na América do Sul, com a presença de uma linhagem clonal amplamente disseminada na China (ZHOU et al., 2010).

As linhagens de *T. gondii* com alta virulência apresentam algumas características que podem explicar sua maior disseminação e a maior carga parasitária nos tecidos de camundongos e outros hospedeiros susceptíveis, tais como maior capacidade de migração através das camadas epiteliais ou da matriz extracelular e maiores taxas de penetração na lâmina própria e na submucosa intestinal, além de maiores taxas de crescimento e menor interconversão de taquizoítas para bradizoítas em cultura de células. Estas diferenças são indicativas de interações distintas destas linhagens com seus hospedeiros, de modo que cruzamentos experimentais entre cepas distintas levaram à identificação de alguns genes polimórficos que codificam fatores secretados pelo parasita e que estão associados com a sua virulência. Dentre estes fatores estão proteínas secretadas pelas organelas secretórias durante o processo de invasão da célula hospedeira, com destaque para as proteínas de roptrias ROP5, ROP16 e ROP18, que podem interagir de formas distintas com componentes da resposta imune do hospedeiro, modulando sua resposta ao parasita e determinando diferentes consequências da infecção (DUBREMETZ; LEBRUN, 2012; HUNTER; SIBLEY, 2012; KEMP; YAMAMOTO; SOLDATI-FAVRE, 2013; MELO; JENSEN; SAEIJ, 2011).

1.7 Invasão da célula-hospedeira

Um dos principais eventos da infecção por parasitas do filo Apicomplexa, como *T. gondii*, é o processo de invasão ativa da célula hospedeira. Tal processo é muito semelhante entre todos os integrantes deste filo e envolve a participação de receptores específicos presentes na superfície da membrana da célula hospedeira, bem como a secreção sequencial de diversas proteínas pelas organelas secretórias do parasita: micronemas, roptrias e grânulos densos (BUXTON; McALLISTER; DUBEY, 2002; WALKER et al., 2014).

O primeiro passo no processo de invasão corresponde à adesão inicial do parasita à célula hospedeira, a qual ocorre sem qualquer orientação especial e envolve inicialmente a participação de antígenos imunodominantes da superfície do parasita (KEELEY; SOLDATI, 2004). Os micronemas são as primeiras organelas secretórias a liberar seu conteúdo durante o processo de invasão, secretando uma série de adesinas de maneira cálcio-dependente, as quais reconhecem receptores específicos na superfície celular e promovem a adesão e a reorientação do parasita em relação à superfície da célula hospedeira (SHARMA; CHITNIS, 2013). Dentre estas proteínas secretadas pelos micronemas, destacam-se as proteínas da família MIC2, que são secretadas na extremidade apical do parasita e contêm diversos domínios de adesinas, ligando-se a alguns componentes da membrana da célula hospedeira, tais como

glicosaminoglicanas e ácido siálico (SIBLEY, 2011). Assim, estas adesinas ficam ligadas por sua extremidade extracelular aos receptores da membrana da célula hospedeira, enquanto se prendem pela sua extremidade citoplasmática a moléculas de actina localizadas entre a membrana interna e externa do complexo de membrana do parasita, promovendo uma associação íntima entre a extremidade apical do parasita e a membrana da célula hospedeira, a qual é conhecida como junção de movimento (Figura 6) (BLADER; SAEIJ, 2009; SIBLEY, 2011).

O estabelecimento da junção de movimento ao redor do parasita durante a invasão requer a distribuição por toda a sua membrana de uma proteína secretada pelos micronemas, conhecida como antígeno de membrana apical (AMA1), além da secreção de proteínas da região de "pescoço" das roptrias (RON), que são inseridas na membrana hospedeira. É o arranjo e interação entre todas estas proteínas secretadas por micronemas e pela região de "pescoço" das roptrias que permite a formação da junção de movimento e favorece a internalização do parasita na célula hospedeira (HUNTER; SIBLEY, 2012; TYLER; TREECK; BOOTHROYD, 2011).

Após esta forte adesão com a célula hospedeira, o parasita inicia a invasão ativa pelo processo conhecido como *gliding*, um organizado sistema de motilidade promovido por interações entre actina e miosina e rearranjos dinâmicos do citoesqueleto do parasita. O processo de movimentação por *gliding* se baseia na translocação das adesinas do polo anterior do parasita, onde elas são secretadas, em direção ao polo posterior, em um mecanismo semelhante ao de uma correia transportadora (SIBLEY, 2011). A força necessária a essa translocação é fornecida por um pequeno motor de miosina localizado no complexo de membrana interna do parasita, de modo que as moléculas de miosina desta região interagem com filamentos de actina que, por sua vez, estão ligados aos domínios citoplasmáticos das adesinas. A movimentação dos filamentos de miosina promove a movimentação helicoidal do parasita e a translocação das adesinas em direção ao seu polo posterior. Como as adesinas estão interagindo com a membrana da célula hospedeira, a junção de movimento formada se move da extremidade apical para a extremidade posterior do parasita e força sua entrada na célula hospedeira, produzindo uma invaginação da membrana da célula, na qual o parasita é internalizado, formando o vacúolo parasitóforo (Figura 6) (HUNTER; SIBLEY, 2012; SHARMA; CHITNIS, 2013; SIBLEY, 2011).

A penetração na célula hospedeira é um processo rápido e ativo, por meio do complexo de adesão-movimentação, sendo um processo diferente dos eventos endocíticos comuns, uma vez que ocorre a reorientação do parasita em direção à membrana da célula e o

rearranjo do seu citoesqueleto, sem a participação do citoesqueleto da célula hospedeira (HUNTER; SIBLEY, 2012; SIBLEY, 2004).

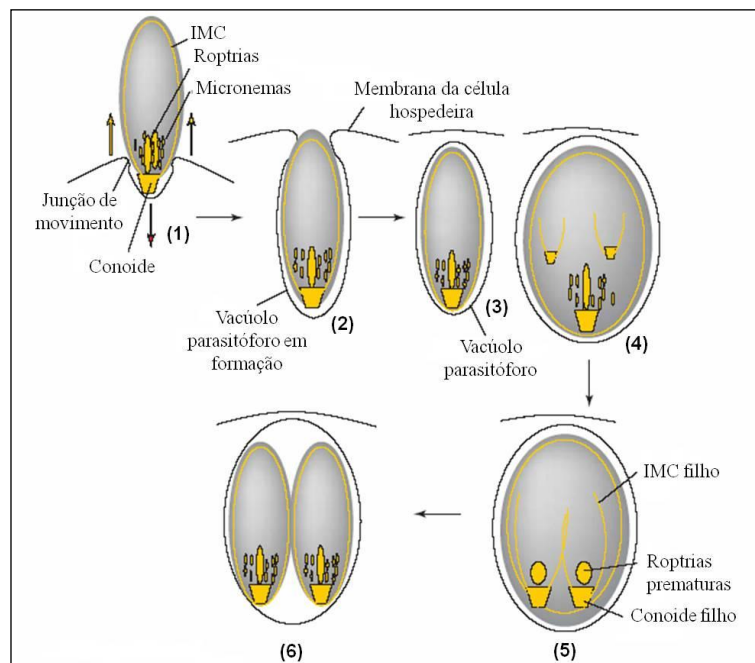


Figura 6 – Processo de invasão e multiplicação de *Toxoplasma gondii* no interior da célula hospedeira. Esquema representativo do processo ativo de invasão da célula hospedeira por *T. gondii*, mostrando as principais etapas deste processo: (1) Adesão do parasita à célula hospedeira, com consequente reorientação e formação da junção de movimento; (2) Invasão ativa da célula hospedeira pelo processo de *gliding* e formação do vacúolo parasitóforo; (3) Parasita intracelular no interior de vacúolo parasitóforo; (4) Início do processo de endodiogenia no interior do vacúolo parasitóforo, com o início da formação de duas células-filhas dentro da célula-mãe; (5) Processo avançado de formação de duas células-filhas no interior da célula-mãe, com a formação das organelas secretórias; (6) Final da divisão do parasita, com duas células-filhas no interior do vacúolo parasitóforo. IMC = Complexo interno de membranas. **Fonte:** Adaptado a partir de Keeley e Soldati (2004).

Após a penetração, o parasita é encontrado no interior do vacúolo parasitóforo, cuja membrana é lisa, denominada membrana do vacúolo parasitóforo (MVP), a qual é formada por cerca de 20% de membrana fornecida pelo parasita durante a invasão e 80% de membrana da célula hospedeira (KEELEY; SOLDATI, 2004). A formação e manutenção da MVP requer a secreção das proteínas da região posterior ou bulbo das roptrias (ROP) no local da invasão, as quais são secretadas ainda durante os passos iniciais do processo de invasão, logo após a formação da junção de movimento, provavelmente devido a pequenas quebras transitórias na integridade da membrana da célula hospedeira (SIBLEY, 2011). Estas proteínas são direcionadas principalmente para o citoplasma e para o núcleo da célula hospedeira, além do próprio vacúolo parasitóforo, e muitas delas têm atividade de enzimas quinases, cujos alvos são moléculas do hospedeiro (DLUGONSKA, 2008).

A função principal destas proteínas de roptrias é garantir a formação do vacúolo parasitóforo e a sobrevivência inicial do parasita em seu interior. Assim, um papel importante desempenhado por elas é a modulação de eventos da célula hospedeira, de modo a impedir a aquisição de marcadores das vias endocíticas pela membrana do vacúolo parasitóforo, ou mesmo eliminar tais marcadores, evitando a fusão do vacúolo com lisossomos ou qualquer outra vesícula endocítica, e a consequente destruição do seu conteúdo pelos mecanismos de digestão intracelular. Além disso, estas proteínas recrutam o retículo endoplasmático e as mitocôndrias da célula hospedeira para as proximidades do vacúolo parasitóforo, de modo a envolvê-lo e facilitar a aquisição de nutrientes e metabólitos pelos parasitas (HUNTER; SIBLEY, 2012; SHARMA; CHITNIS, 2013; SIBLEY, 2011). Já outras proteínas de roptrias tem o núcleo da célula hospedeira como alvo, podendo modificar a expressão gênica destas células, de modo a afetar principalmente a produção de mediadores imunológicos com o objetivo de facilitar a evasão das respostas imunes do hospedeiro (DLUGONSKA, 2008; HUNTER; SIBLEY, 2012).

Posteriormente, são secretadas as proteínas dos grânulos densos (GRA), cuja função principal é modificar a membrana do vacúolo parasitóforo, contribuindo para sua remodelação e maturação, de modo a garantir um ambiente propício para multiplicação do parasita (NAM, 2009). Assim, as proteínas de grânulos densos participam na manutenção do vacúolo não fusogênico e na formação de uma complexa rede de túbulos de membrana, que atravessam a membrana do vacúolo parasitóforo e conectam seu interior com o citoplasma e com as mitocôndrias da célula hospedeira, facilitando a obtenção de nutrientes e outros metabólitos pelos parasitas, bem como a exportação de proteínas ou outras moléculas para a membrana do vacúolo parasitóforo ou para o citosol da célula hospedeira (BLADER; SAEIJ, 2009; CANTON; KIMA, 2012; RAVINDRAN; BOOTHROYD, 2008).

No interior do vacúolo parasitóforo, os parasitas replicam de forma sincrônica pelo processo de endodiogenia, de modo que duas células-filhas são formadas no interior de cada célula-mãe. Este processo é marcado inicialmente pela formação de dois conoides-filhos, bem como a formação concomitante do complexo interno de membranas (IMC) das células-filhas no interior da célula-mãe após a duplicação e separação do material genético. Na sequência, as organelas secretórias são sintetizadas e posicionadas na extremidade apical de cada célula-filha em formação, seguidas pela distribuição das demais organelas e, finalmente pela citocinese, com a consequente separação entre as duas células-filhas (Figura 6) (FRANCIA; STRIEPEN, 2014).

Após alguns ciclos de multiplicação, quando cerca de 64 a 128 parasitas tenham se formado no interior do vacúolo parasitóforo em uma organização típica conhecida como roseta, ocorre o seu egresso da célula hospedeira. Este é um processo ativo dependente de cálcio intracelular, em que o parasita secreta moléculas que facilitam o rompimento da membrana do vacúolo parasitóforo, o que o deixa livre no citoplasma e, posteriormente, da membrana da célula hospedeira, permitindo sua liberação para o ambiente extracelular (BLACKMAN; CARRUTHERS, 2013; SIBLEY, 2010).

1.8 Resposta imune

A imunidade à infecção é uma batalha constante entre o patógeno invasor e os mecanismos de defesa do hospedeiro contra a invasão. Nesta batalha, o parasita utiliza diversas estratégias para evadir das defesas do hospedeiro e efetivar uma infecção duradoura, enquanto o hospedeiro tenta responder a todas estas estratégias para eliminar o patógeno, evitando que este se instale e lhe cause danos. A resposta imune contra *T. gondii* tem sido o foco de vários estudos realizados nas últimas décadas, de modo que a participação de diversas células e moléculas imunes já foi descrita no controle da infecção por este parasita (DUPONT; CHRISTIAN; HUNTER, 2012).

1.8.1 Reconhecimento imune inato

O reconhecimento inato de protozoários pelo sistema imune de mamíferos é uma tarefa complicada, pois a maioria das moléculas microbianas e virais reconhecidas pelos receptores imunes inatos não estão presentes em patógenos eucarióticos (TAKEUCHI; AKIRA, 2010). Neste sentido, o sistema imune pode reconhecer *T. gondii* diretamente por meio da detecção de moléculas específicas expressas apenas por protozoários parasitas, ou indiretamente, por meio da detecção de moléculas liberadas pelos tecidos em função do dano associado com a infecção pelo parasita (YAROVINSKY, 2014).

Múltiplos receptores do tipo Toll (TLR - do inglês *Toll-like receptors*) estão envolvidos no reconhecimento de *T. gondii* e o receptor endossomal TLR11 parece ser o principal sensor inato deste parasita em roedores, reconhecendo uma proteína ligante de actina chamada profilina, a qual é liberada pelo parasita e parece ser essencial na regulação de sua motilidade e na invasão da célula hospedeira (PLATTNER et al., 2008). Evidências experimentais apontam que a interação direta de TLR11 e a profilina de *T. gondii* no interior

de endolisossomos leva ao recrutamento da molécula adaptadora MYD88 e à ativação de cascatas de sinalização imune, mas este processo depende da associação com TLR12. Assim, o complexo heterodimérico formado por TLR11 e TLR12 corresponde ao principal sensor para o reconhecimento da profilina de *T. gondii* por células dendríticas murinas (ANDRADE et al., 2013; RAETZ et al., 2013). No entanto, seres humanos não expressam TLR11 e TLR12 em suas células, pois possuem apenas um pseudogene que não codifica a expressão de TLR11 funcional e não possuem o gene que codifica TLR12, de modo que os principais sensores responsáveis pela detecção de *T. gondii* pelas células imunes inatas humanas ainda não foram identificados (YAROVINSKY, 2014).

Outros receptores endossomais do tipo Toll parecem estar envolvidos no reconhecimento inato de *T. gondii*, tais como TLR7 e TLR9. TLR7 reconhece primariamente moléculas de RNA de fita simples presentes em certos vírus de RNA, mas parece ser ativado pela uridina e pela ribose presentes no RNA de outros organismos, como *T. gondii*, ainda que os mecanismos envolvidos neste reconhecimento não sejam bem elucidados para este parasita (PIFER; YAROVINSKY, 2011). Já TLR9 é um receptor envolvido primariamente no reconhecimento de sequências CpG não metiladas no DNA de bactérias e vírus. Assim, o DNA de *T. gondii*, por apresentar pequena metilação de citosina, tem o potencial de ativar este receptor, mas isto ainda carece de comprovação experimental consistente (ANDRADE et al., 2013).

Além dos TLRs endossomais, os receptores TLR2 e TLR4 presentes na superfície celular também estão envolvidos no reconhecimento de *T. gondii*. TLR2 é um receptor geral que reconhece as âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI) que recobrem a superfície celular de múltiplos protozoários parasitas, incluindo *T. gondii*. No entanto, durante a infecção por este parasita, TLR2 parece estar mais envolvido no reconhecimento de moléculas liberadas pelo hospedeiro em função do dano tecidual gerado pela infecção do que no reconhecimento direto do parasita (DEBIERRE-GROCKIEGO et al., 2007). Além de TLR2, TLR4 também pode ser ativado pelas âncoras GPI de *T. gondii*, além de ambos poderem ser ativados pela proteína de choque térmico HSP70 deste parasita (PIFER; YAROVINSKY, 2011).

Inflamassomas são sistemas intracelulares que cooperam com os TLRs no reconhecimento de patógenos, reconhecendo ligantes microbianos no compartimento citosólico e levando à ativação das caspases 1 e 11, que culmina na indução de morte celular por piroptose e no processamento das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18, envolvidas na defesa do hospedeiro contra o parasita. Estudos de associação genética mostraram que o sensor intracelular NLRP1 influencia a susceptibilidade ao desenvolvimento de toxoplasmose

congenita humana e que este receptor pode ser ativado em monócitos humanos infectados por *T. gondii* (WITOLA et al., 2011). Porém, os eventos associados com a ativação deste receptor por *T. gondii* ainda não são bem compreendidos e necessitam de mais investigação.

1.8.2 Mecanismos da imunidade inata

Após a ingestão de formas infecciosas de *T. gondii* e a invasão de células epiteliais intestinais do hospedeiro, onde ocorrem os primeiros ciclos de multiplicação do parasita, células infectadas secretam algumas quimiocinas que atraem células imunes inatas para o local (YAROVINSKY, 2014). Dentre estas células, estão os neutrófilos, que atuam na fagocitose de parasitas livres, diminuindo a carga parasitária local, enquanto trabalhos mais recentes também apontam este tipo celular como importante secretor das citocinas interferon- γ (IFN- γ), fator de necrose tumoral (TNF- α) e IL-1 β (STURGE; YAROVINSKY, 2014). Além disso, são atraídos monócitos e células dendríticas, os quais reconhecem e capturam parasitas, exercendo um papel crucial na ativação das respostas imunes inatas ao secretar a citocina IL-12 que, por sua vez, promove a ativação de células *natural killer* (NK) e NKT, estimulando-as a secretar a citocina IFN- γ (Figura 7A). A secreção de IFN- γ por estas células estimula células dendríticas e macrófagos a secretar mais IL-12, o que leva à ativação mútua destes tipos celulares e à amplificação da síntese de IL-12 e IFN- γ , respectivamente (DUNAY; SIBLEY, 2010; PIFER; YAROVINSKY, 2011).

Além disso, células dendríticas infectadas podem migrar para os linfonodos periféricos, onde atuam na apresentação de antígenos de *T. gondii* associados a moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II para células T CD4⁺, bem como ao MHC de classe I para células T CD8⁺. A partir desta apresentação antigênica via moléculas de MHC e moléculas coestimulatórias, ocorre a ativação e diferenciação de linfócitos T específicos, que migram para o tecido infectado (MUNOZ; LIESENFELD; HEIMESAAT, 2011).

1.8.3 Imunidade celular

Como um parasita intracelular obrigatório, a imunidade mediada por células é o mais importante mecanismo do hospedeiro no controle da infecção por *T. gondii* (CORREA et al., 2007). Durante a fase aguda da infecção, após a apresentação de antígenos de *T. gondii* associados a moléculas de MHC de classe II por células dendríticas produtoras de IL-12,

ocorre a diferenciação de células T CD4⁺ *naïve* em células da subpopulação Th1, que migram para os tecidos infectados, onde atuam na resposta imune adaptativa ao parasita, potencializando os mecanismos da imunidade inata a partir da secreção de altos níveis de IFN- γ (Figura 7A) (SANECKA; FRICKEL, 2012; YAROVINSKY, 2014).

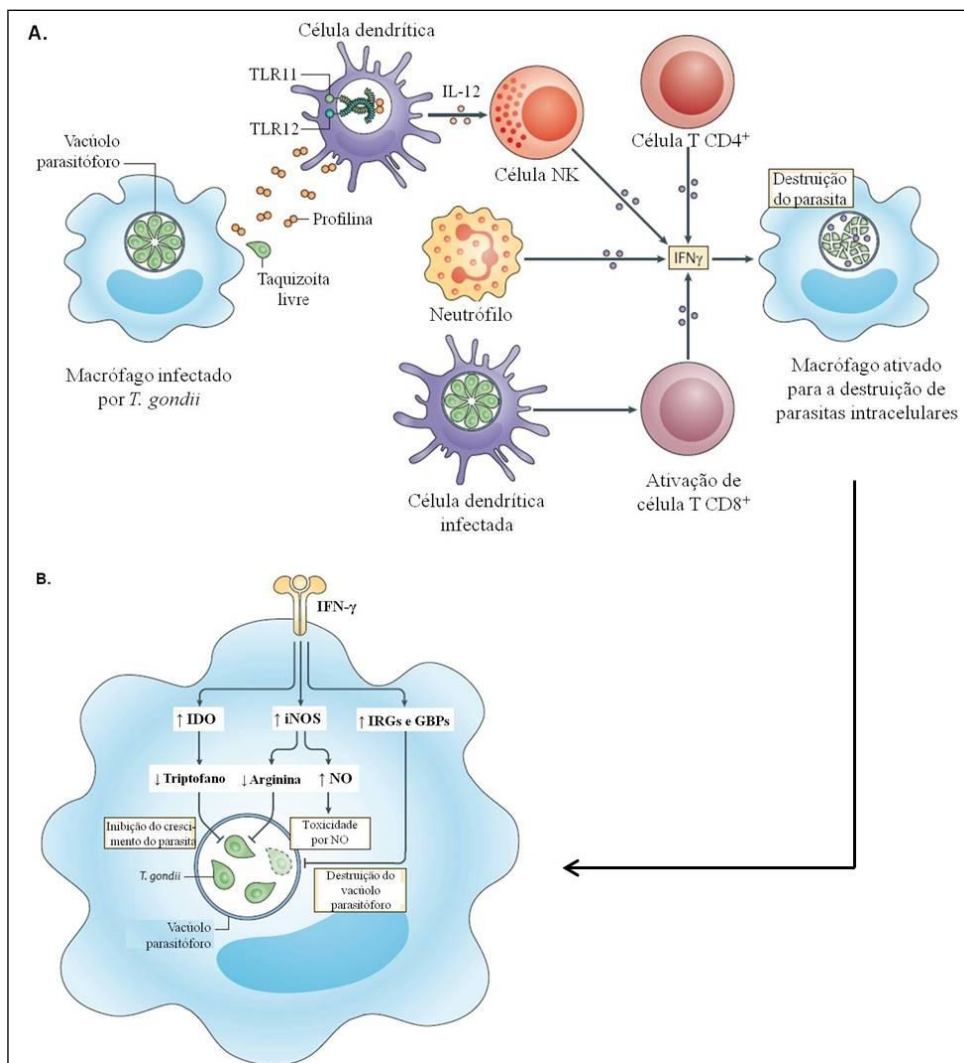


Figura 7 – Resposta imune contra *Toxoplasma gondii*. Esquema representativo da resposta imune desencadeada contra *T. gondii* em modelo murino de infecção. **(A)** Produção de IFN- γ por diferentes tipos de células imunes estimuladas pela citocina IL-12; **(B)** Mecanismos efetores de IFN- γ em macrófago infectado por *T. gondii*, levando à destruição do vacúolo parasitóforo e à morte do parasita em seu interior. **Fonte:** Adaptado a partir de Yarovinsky (2014).

A citocina IFN- γ secretada por linfócitos T, células NK, células NKT e neutrófilos representa o principal mediador de resistência a *T. gondii*, atuando principalmente na ativação de macrófagos, de modo a potencializar seus mecanismos de resposta, o que leva à inibição da replicação do parasita no interior do vacúolo parasitóforo e à destruição de parasitas intracelulares (Figura 7B) (DENKERS et al., 2012; STURGE; YAROVINSKY, 2014). Um

dos efeitos de IFN- γ é a indução da expressão da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), que degrada o aminoácido triptofano, diminuindo sua disponibilidade para parasitas em multiplicação. Como *T. gondii* é um parasita auxotrófico para este aminoácido, sua deficiência nas células inibe a multiplicação parasitária (MILLER et al., 2009; YAROVINSKY, 2014).

Outro efeito de IFN- γ é a indução da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) pelas células infectadas, a qual atua na produção de reativos intermediários de nitrogênio (RNI), principalmente óxido nítrico (NO), a partir do aminoácido L-arginina. A primeira consequência desta via é a produção de NO, um intermediário reativo com efeitos microbicidas, que migra para o vacúolo parasitóforo e se combina com uma série de proteínas do parasita, modificando sua função e levando à inibição de importantes enzimas metabólicas (MILLER et al., 2009). Outra consequência desta via refere-se à diminuição da disponibilidade do aminoácido arginina e, como *T. gondii* também é auxotrófico para este aminoácido, sua degradação impede ou limita a multiplicação intracelular do parasita (YAROVINSKY, 2014).

IFN- γ também atua na estimulação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como radical superóxido, peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila, que são moléculas instáveis extremamente reativas, que danificam diversos componentes celulares, eliminando parasitas no interior do vacúolo parasitóforo (MUNOZ; LIESENFELD; HEIMESAAT, 2011). Finalmente, IFN- γ também estimula a expressão de GTPases relacionadas à imunidade (IRGs) e de proteínas ligantes de guanilato (GBPs), que são proteínas induzíveis por IFN- γ que se organizam no vacúolo parasitóforo, levando à desestruturação de sua membrana, à sua ruptura e à eliminação do parasita pela degradação mediada por lisossomos (Figura 7B) (MILLER et al., 2009; YAROVINSKY, 2014).

Além disso, macrófagos ativados por IFN- γ secretam altos níveis de TNF- α , que também estimula outras atividades microbicidas, sinergizando com IFN- γ em diversos mecanismos de controle do parasita (ALIBERTI, 2005).

Células T CD8⁺ ativadas por IL-12 também contribuem significativamente para o controle da infecção aguda por meio da secreção de IFN- γ (Figura 7A). Além disso, estas células, em função de sua atividade citotóxica, destroem células infectadas, eliminando parasitas ou liberando taquizoítas para o meio extracelular, os quais ficam acessíveis a vários outros mecanismos imunológicos, tais como a ação de anticorpos, do sistema complemento e de macrófagos ativados (ALIBERTI, 2005; DENKERS; GAZZINELLI, 1998; DUPONT; CHRISTIAN; HUNTER, 2012).

Os efeitos da forte atividade pró-inflamatória mediada por IFN- γ podem ser tóxicos para o hospedeiro, levando a sérios danos teciduais no local da infecção, o que pode levar à morte de um hospedeiro susceptível, como observado em alguns modelos de ileíte por *T. gondii* em camundongos susceptíveis da linhagem C57BL/6 (EGAN; COHEN; DENKERS, 2012). O efeito deletério de uma forte resposta imune do tipo Th1 também pode ser observado na resposta à infecção primária por *T. gondii* adquirida durante a gestação, a qual pode resultar em perda fetal, uma vez que IFN- γ desestabiliza o microambiente Th2 necessário para a tolerância materno-fetal e para a manutenção da gestação (PFAFF et al., 2007; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

Desta forma, alguns mecanismos imunomodulatórios devem entrar em ação, de modo a controlar a resposta pró-inflamatória e, com isso, evitar danos teciduais mais sérios ao hospedeiro. Um papel importante na regulação da resposta inflamatória a *T. gondii* é exercido pelas citocinas IL-10 e fator transformador do crescimento (TGF- β), que são produzidas por alguns tipos celulares em locais com alta carga parasitária. IL-10 apresenta efeitos inibitórios sobre a atividade microbicida de macrófagos ativados por IFN- γ , sobre a diferenciação de clones Th1 de células T, sobre a produção de IFN- γ por células NK e linfócitos T e sobre a produção de IL-12 por macrófagos e células dendríticas. Camundongos deficientes de IL-10 não conseguem controlar as respostas inflamatórias induzidas pela infecção e morrem durante a fase aguda, devido ao grande infiltrado leucocitário e à necrose tecidual no fígado e no intestino delgado, em virtude da produção descontrolada de TNF- α e IFN- γ (BUTLER; HARRIS; BLADER, 2013; DUPONT; CHRISTIAN; HUNTER, 2012; GAZZINELLI et al., 1996).

Durante a fase crônica da infecção, as respostas do hospedeiro continuam pelas mesmas vias descritas para a infecção aguda, o que faz com que o parasita permaneça no interior dos cistos teciduais com uma baixa taxa de replicação. Porém, para evitar danos teciduais durante a fase crônica, as respostas inflamatórias do hospedeiro são controladas pela expressão de IL-10 e por outros mecanismos, dentre eles, a produção de lipoxina A₄ (LXA₄), a qual limita a produção de citocinas pró-inflamatórias por células imunes. Estes mecanismos previnem a resposta exacerbada do hospedeiro, principalmente no sistema nervoso central, mas garantem a continuidade da atividade microbicida de macrófagos no controle da reativação da infecção (ALIBERTI, 2005; MUNOZ; LIESENFELD; HEIMESAAT, 2011).

Alguns mecanismos podem ser usados por *T. gondii* para evadir da resposta imune do hospedeiro e garantir uma infecção bem sucedida. Um mecanismo inicial que garante a sobrevivência de *T. gondii* após a infecção é a prevenção da união do vacúolo parasitóforo

com lisossomos da célula hospedeira, evitando sua digestão intracelular (RAVINDRAN; BOOTHROYD, 2008; SHARMA; CHITNIS, 2013). Outros fatores secretados por *T. gondii* podem interferir em vias de sinalização da resposta imune, principalmente por meio da fosforilação dos fatores de transcrição STAT3 e STAT6, levando à diminuição na secreção de IL-12 e, conseqüentemente, de IFN- γ . Além disso, o parasita também pode inibir mecanismos apoptóticos da célula hospedeira, garantindo sua sobrevivência por mais tempo, além de interferir na via de sinalização do fator de transcrição NF- κ B (BUZONI-GATEL; WERTS, 2006; HUNTER; SIBLEY, 2012; KEMP; YAMAMOTO; SOLDATI-FAVRE, 2013).

Por outro lado, como macrófagos são as principais células efectoras na eliminação dos parasitas, outro mecanismo de evasão é a invasão ativa dos próprios macrófagos, fazendo com que escapem do *burst* respiratório, processo microbicida que se segue normalmente após a fagocitose de patógenos por fagócitos (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003). Ao invadir células dendríticas, *T. gondii* pode manipular seu funcionamento, por meio da secreção de fatores de virulência, limitando sua capacidade de apresentação antigênica e alterando seu fenótipo de motilidade. Assim, estas células são usadas pelo parasita como "cavalos de Troia", facilitando sua disseminação para outros tecidos, inclusive órgãos imunoprivilegiados (FEUSTEL; MEISSNER; LIESENFELD, 2012; SANECKA; FRICKEL, 2012).

1.8.4 Imunidade humoral

A imunidade humoral induzida por *T. gondii* é direcionada principalmente contra as formas extracelulares do parasita, sejam as formas taquizoítas, logo após o egresso de uma célula infectada após um ciclo replicativo e antes da invasão ativa de outra célula, sejam as formas bradizoítas eventualmente liberadas após o rompimento de um cisto tecidual (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). A estimulação da produção de anticorpos específicos é feita a partir da ativação de células B por células T CD4⁺ ativadas nas zonas de células B dos órgãos linfoides secundários (CORREA et al., 2007).

Anticorpos podem mediar seus efeitos protetores na infecção por *T. gondii* de diversas maneiras distintas. Uma delas é por meio dos anticorpos neutralizantes, que se ligam na superfície do parasita e impedem sua ligação aos receptores da membrana da célula hospedeira, impedindo a adesão do parasita e sua posterior invasão ativa. Outro papel dos anticorpos é na opsonização de parasitas, facilitando sua fagocitose por células fagocitárias, com conseqüente destruição pelos mecanismos de degradação intracelular. Além disso, anticorpos ligados à superfície do parasita ativam a via clássica do sistema complemento, o

que pode culminar com a lise do parasita pela formação do complexo de ataque à membrana (MAC), ou com a sua opsonização por fragmentos de proteínas deste sistema, facilitando a fagocitose do parasita (DUPONT; CHRISTIAN; HUNTER, 2012).

Todas as classes de imunoglobulinas (Ig) parecem participar da resposta imune humoral contra *T. gondii*, mas a participação dos anticorpos IgG, IgM e IgA é melhor descrita e reconhecida, principalmente pela sua aplicação em testes para o diagnóstico da toxoplasmose. A seguir, é apresentada uma breve descrição da cinética de produção de cada uma destas imunoglobulinas no curso da infecção por *T. gondii* (Figura 8) (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

IgG: corresponde à principal classe de anticorpos envolvida na resposta humoral contra *T. gondii*. Em seres humanos infectados, anticorpos IgG específicos a antígenos de *T. gondii* aparecem após 1 ou 2 semanas de infecção e seus níveis aumentam muito lentamente até atingir um valor máximo por volta de 4 a 6 meses após a infecção, com uma ligeira queda após este período. Porém, níveis residuais de IgG podem permanecer circulantes indefinidamente, geralmente por toda a vida do indivíduo (Figura 8) (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Além disso, anticorpos IgG maternos podem ser transferidos ao feto por meio de passagem transplacentária (PALMEIRA et al., 2012).

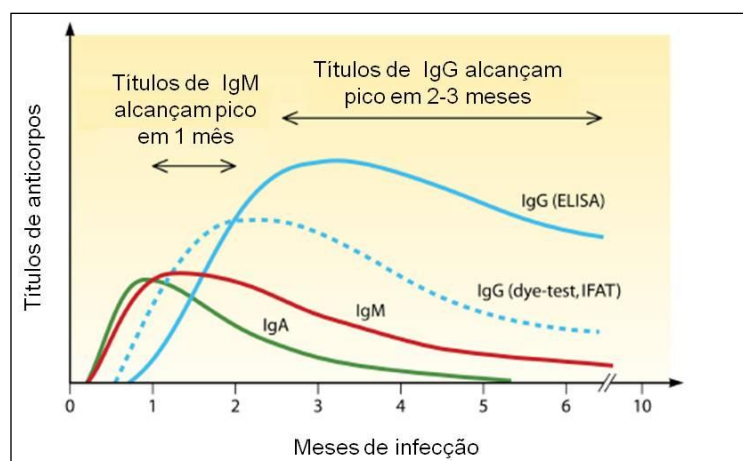


Figura 8 – Cinética da resposta de anticorpos na infecção por *Toxoplasma gondii*. Gráfico representativo dos níveis de anticorpos dos isotipos IgG, IgM e IgA em função do tempo de infecção com *T. gondii*. Esta cinética pode apresentar variações entre pacientes e de acordo com a técnica de detecção de anticorpos utilizada. **Fonte:** Adaptado a partir de Robert-Gangneux e Dardé (2012).

IgM: anticorpos IgM específicos a antígenos de *T. gondii* são sintetizados precocemente após uma infecção primária pelo parasita, constituindo-se em marcadores sorológicos de fase

aguda da infecção. Em seres humanos, estes anticorpos podem ser detectados logo ao final dos primeiros 7 dias de infecção, aumentando gradualmente até atingir um pico cerca de 1 ou 2 meses depois, mas diminuem gradativamente até níveis indetectáveis por volta de 8 meses após a infecção (Figura 8). Porém, em muitos casos, níveis detectáveis deste isotipo podem permanecer circulantes por muitos meses ou até anos após a infecção, tornando problemática sua utilização como marcador de infecção recentemente adquirida (CORREA et al., 2007; GRAS et al., 2004; REMINGTON; THULLIEZ; MONTOYA, 2004).

IgA: esta classe de anticorpos é produzida principalmente durante a fase digestiva do parasita, quando linfócitos sensibilizados circulam pela lâmina própria do trato digestivo do hospedeiro. Tais linfócitos sensibilizados podem circular por outros locais, podendo produzir anticorpos IgA em outros sítios ativos de infecção, além da região intestinal (MONTOYA; LIESENFELD, 2004). Anticorpos IgA também constituem importantes marcadores sorológicos de infecção recente, pois são produzidos apenas durante a fase aguda de uma infecção primária, antes de qualquer subclasse de anticorpos IgG, e não são observados durante a infecção crônica. São secretados 7 a 8 dias após uma infecção primária, alcançando níveis máximos cerca de 1 mês depois, mas declinam rapidamente após este período, até se tornarem indetectáveis (Figura 8). Ocasionalmente, podem persistir circulantes no sangue por cerca de 8 a 9 meses após a infecção, mas em geral seus níveis diminuem de forma anterior aos anticorpos IgM, de modo que níveis persistentes de anticorpos IgM na ausência de anticorpos IgA indicam uma imunidade já estabelecida de uma infecção mais tardia, caracterizando um período de transição no perfil sorológico de resposta à infecção. Apesar de ser secretada no colostro e ser transferida ao lactante por meio do aleitamento materno, IgA não atravessa a barreira placentária (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003; NASCIMENTO; SUZUKI; ROSSI, 2008).

Além destas classes principais, anticorpos IgE também são observados após a infecção por *T. gondii*. São produzidos precocemente e detectáveis até por volta do quarto mês de infecção, quando desaparecem, podendo constituir excelentes marcadores de infecção recente. Além disso, estes anticorpos também são produzidos por alguns recém-nascidos portadores de toxoplasmose congênita (CORREA et al., 2007; FOUDRINIER et al., 2003). Porém, poucos estudos têm explorado a importância desta imunoglobulina na resposta humoral contra *T. gondii*, bem como seu valor no diagnóstico e na determinação da fase da infecção, devido à falta de testes padronizados para sua detecção em amostras biológicas (MONTOYA, 2002).

1.9 Manifestações clínicas

Clinicamente, a infecção por *T. gondii* pode ser assintomática ou apresentar alguns sinais e sintomas que variam enormemente, dependendo do estado imunológico do hospedeiro, da linhagem do parasita envolvida na infecção (virulência), da rota de transmissão e da carga parasitária adquirida. Deste modo, o quadro clínico da toxoplasmose pode variar de acordo com alguns grupos de pacientes (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

Toxoplasmose em adultos e crianças imunocompetentes. Em geral, a fase aguda da infecção primária por *T. gondii* em adultos e crianças imunocompetentes é assintomática na maioria dos pacientes, causando uma infecção autolimitada, normalmente despercebida. Por outro lado, em alguns pacientes podem ocorrer sintomas inespecíficos, que raramente demandam tratamento, os quais podem ser confundidos com um quadro gripal ou com outra patologia de etiologia viral, como a mononucleose infecciosa. A manifestação clínica mais típica neste grupo de pacientes é uma linfadenopatia cervical ou occipital discreta e isolada, na qual os linfonodos podem permanecer aumentados e doloridos por até 6 semanas, acompanhada de outros sintomas inespecíficos, tais como febre, mialgia, astenia e dores de cabeça. Em casos muito raros, já foram relatadas miocardite, polimiosite, pneumonia, hepatite e encefalite em indivíduos imunocompetentes durante infecção primária, além de sintomas psiquiátricos transitórios (FLEGR, 2013; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

Em pacientes imunocompetentes, a infecção aguda evolui para uma fase latente, caracterizada pela presença de cistos teciduais contendo bradizoítas em diversos tecidos corporais. Nesta fase, a infecção é tida como assintomática, mas trabalhos recentes sugerem que os bradizoítas presentes no interior destes cistos secretam diversas moléculas, que podem interferir no metabolismo do hospedeiro e estar associadas com alterações neuropsiquiátricas e comportamentais (FLEGR, 2013; HSU; GROER; BECKIE, 2014; HURLEY; TABER, 2012; McCONKEY et al., 2013).

Toxoplasmose ocular. Coriorretinite toxoplásmica é uma manifestação muito comum da infecção por *T. gondii* entre recém-nascidos e crianças portadoras de toxoplasmose congênita, principalmente quando adquirida no terceiro trimestre de gestação. Os principais sinais desta manifestação ocular são lesões focais brancas visíveis, com uma intensa reação inflamatória associada, que pode evoluir para comprometimento visual grave, inclusive cegueira (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003; MAENZ et al., 2014). Em adultos, esta manifestação normalmente era associada à reativação local de uma infecção latente. Porém,

alguns estudos têm mostrado a ocorrência de coriorretinite grave durante a infecção primária em adultos imunocompetentes na América do Sul e na África, onde circulam linhagens atípicas e mais virulentas do parasita (GILBERT et al., 2008; GOMEZ-MARIN et al., 2011).

Toxoplasmose em pacientes imunocomprometidos. Apesar de causar uma infecção assintomática na maioria dos indivíduos imunocompetentes, *T. gondii* pode causar doença grave, muitas vezes fatal, em indivíduos imunocomprometidos, como aqueles portadores de AIDS ou sob tratamento com drogas imunossupressoras. Nestes indivíduos, o quadro clínico geralmente resulta da reativação de uma infecção crônica e afeta preferencialmente o sistema nervoso central, levando ao quadro típico de encefalite toxoplásmica, cujas manifestações mais comuns são: confusão mental, déficits motores focais, distúrbios dos nervos cranianos, anormalidades sensoriais, desordens dos movimentos e sinais neuropsiquiátricos. Nestes casos, os achados neurológicos mais típicos são a hemiparesia e os distúrbios da fala, podendo os sinais evoluir rapidamente, levando à morte, caso o diagnóstico não seja feito precocemente e o tratamento adequado não seja iniciado. O diagnóstico diferencial das lesões da encefalite toxoplásmica deve ser feito para excluir a possibilidade de outras patologias com quadro clínico semelhante, tais como encefalite causada por citomegalovírus ou lesões cerebrais causadas por *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* sp., *Mycobacterium tuberculosis* e *Nocardia* sp. Além disso, a toxoplasmose em indivíduos imunocomprometidos também pode se apresentar com coriorretinite, pneumonia e envolvimento de múltiplos órgãos (MAENZ et al., 2014; MONTOYA; LIESENFELD, 2004; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

Toxoplasmose congênita. A toxoplasmose congênita ocorre em função da transmissão vertical de *T. gondii* quando a mulher adquire a infecção primária pelo parasita durante a gestação. As manifestações clínicas da infecção congênita variam enormemente, principalmente em função da fase da gestação em que ocorre a transmissão do parasita para o feto, de modo que a gravidade da infecção fetal é maior quando a transmissão ocorre no primeiro trimestre e menor quando ocorre no terceiro trimestre, quando a maioria dos recém-nascidos infectados são assintomáticos. Assim, quando a transmissão ocorre no primeiro trimestre, as consequências mais comuns são o aborto espontâneo, a morte fetal intra-útero ou o desenvolvimento de anomalias graves no sistema nervoso central e nos olhos, em função da forte resposta inflamatória nestes locais (FLEGR, 2013; MONTOYA; ROSSO, 2005).

Dentre as principais sequelas da infecção congênita, destacam-se hidrocefalia, microcefalia, calcificações cerebrais e retardamento mental e motor, além das sequelas oculares (microftalmia, catarata, estrabismo, neurite óptica, aumento da pressão intraocular e necrose da retina), que podem levar à cegueira, quando atingem a mácula. Os principais sinais manifestados ao nascimento incluem epilepsia, convulsões neonatais, trombocitopenia, anemia, coriorretinite, pneumonite, desordens hepáticas e hepatoesplenomegalia. Nenhum dos sinais descritos anteriormente em recém-nascidos com doença congênita é patognomônico para toxoplasmose, uma vez que pode ocorrer com outras infecções congênicas, como citomegalovírus, vírus herpes simples, rubéola e sífilis (CARLIER et al., 2012; MONTOYA; LIESENFELD, 2004).

1.10 Diagnóstico

Há quatro grupos de indivíduos em que o diagnóstico da infecção por *T. gondii* é mais crítico: mulheres grávidas que adquirem a infecção primária durante a gestação, fetos e recém-nascidos que adquirem infecção congênita, indivíduos imunocomprometidos e indivíduos que apresentam coriorretinite (MONTOYA, 2002; REMINGTON et al., 2006; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

Deste modo, diversas técnicas tem sido desenvolvidas nas últimas décadas com o objetivo de se obter um diagnóstico mais preciso da infecção, bem como a determinação da fase da infecção. Estas técnicas de diagnóstico podem se basear na detecção do próprio parasita ou de algumas de suas moléculas específicas (métodos diretos) ou na detecção de anticorpos específicos ao parasita presentes no soro ou em outros fluidos biológicos de indivíduos infectados (métodos indiretos ou sorológicos).

1.10.1 Métodos diretos

Estes métodos baseiam-se na demonstração direta do parasita em amostras biológicas, tais como sangue, líquido cefalorraquidiano, saliva, humor aquoso e fragmentos de órgãos e tecidos colhidos por biópsia ou necropsia, por meio das técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) e imuno-histoquímica (IHC), ou ainda pelo isolamento dos parasitas a partir da inoculação de amostras biológicas em animais de laboratório (bioensaio) ou em cultura de células.

1.10.1.1 Reação em cadeia da polimerase

Na técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), um fragmento específico do genoma do parasita é amplificado e o produto da amplificação é visualizado em gel de agarose ou de poliacrilamida após coloração específica, ou diretamente visualizado por meio da PCR em tempo real (*real time* PCR). A detecção de sequências específicas do genoma do parasita pode ser feita em amostras de líquido amniótico, sangue, líquido cefalorraquidiano, urina, humor vítreo, humor aquoso, lavado broncoalveolar, fluidos pleural e peritoneal, fragmentos de placenta e fragmentos de tecidos diversos (BOURDIN et al., 2014; REMINGTON; THULLIEZ; MONTOYA, 2004; SWITAJ et al., 2005).

A sensibilidade e a especificidade da PCR são geralmente altas, mas dependem de vários fatores, tais como as técnicas usadas para a extração do material genético da amostra biológica, as condições de manipulação e armazenamento das amostras, as características da sequência de DNA escolhida para a amplificação (*primer*) e os parâmetros da reação de amplificação (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012; SWITAJ et al., 2005).

A primeira etapa da técnica envolve a hibridização de um *primer* específico a uma sequência do genoma do parasita, a qual é escolhida preferencialmente com base na existência de várias cópias no DNA do parasita. Para a detecção de *T. gondii*, a sequência mais amplamente utilizada há mais de 20 anos, com alta especificidade, é o gene B1, que apresenta 35 cópias genômicas (BURG et al., 1989). No entanto, Homan e colaboradores (2000) descreveram outra sequência genômica de 529 pb, denominada AF146527, que apresenta cerca de 200 a 300 cópias no DNA de *T. gondii*, a qual passou a ser muito utilizada em alguns laboratórios europeus, em função de sua maior sensibilidade em relação ao gene B1, principalmente quando utilizada em protocolos de PCR em tempo real (FALLAHI et al., 2014; WALLON et al., 2010). Em laboratórios de pesquisa, algumas sequências que apresentam apenas uma cópia no genoma do parasita também são utilizadas como *primers* de PCR, principalmente em protocolos de genotipagem de isolados de *T. gondii* (BIRADAR et al., 2014).

O uso mais comum da PCR ocorre no diagnóstico pré-natal da infecção congênita usando amostras de líquido amniótico coletadas por amniocentese. Quando a coleta da amostra é realizada com 18 semanas de gestação, a técnica é mais sensível, mais rápida e mais segura que as técnicas convencionais usando amostras de sangue fetal. Este método é indicado para todas as mulheres grávidas com resultados confirmados ou sugestivos de infecção aguda adquirida durante a gestação ou quando há evidência de danos fetais

observados pelo exame de ultrassonografia fetal (hidrocefalia e/ou calcificações cerebrais) (HOHLFELD et al., 1994; WALLON et al., 2010).

A principal vantagem da PCR, além da alta especificidade e sensibilidade, é a rapidez na obtenção dos resultados, principalmente pela técnica de PCR em tempo real (menos de 4 horas), e sua principal desvantagem continua sendo os altos custos dos equipamentos e reagentes utilizados (SWITAJ et al., 2005). Outra desvantagem da PCR é o fato de seus resultados não permitirem estabelecer uma relação com a fase da infecção (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

1.10.1.2 Imuno-histoquímica

A demonstração de taquizoítas de *T. gondii* em seções teciduais ou em esfregaços de fluidos corporais, tais como líquido cefalorraquidiano, líquido amniótico e lavado broncoalveolar, estabelece o diagnóstico de uma infecção aguda. Porém, a detecção de taquizoítas em material corado pelas técnicas histológicas convencionais é muito difícil e pouco confiável, de modo que técnicas de imuno-histoquímica (IHC) utilizando anticorpos conjugados (principalmente com a enzima peroxidase) são particularmente utilizadas, apresentando maior sensibilidade e especificidade (CASARTELLI-ALVES et al., 2014; MONTROYA, 2002). Esta técnica tem sido utilizada para demonstrar a presença do parasita no sistema nervoso central de pacientes com AIDS e em cortes de tecido placentário, como uma técnica auxiliar no diagnóstico da transmissão congênita do parasita (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

1.10.1.3 Isolamento em animais ou cultura celular

O isolamento do parasita em animais de laboratório (ou bioensaio) é uma técnica utilizada com o objetivo não só de demonstrar a sua presença em uma amostra biológica, mas também para isolar e determinar a cepa envolvida na infecção. Assim, amostras de diferentes materiais biológicos extraídos de pacientes com suspeita de infecção, como fluidos corporais ou macerados teciduais, são inoculados em camundongos ou outros animais de laboratório. Antes da inoculação do material, o animal é submetido à sangria prévia para avaliar seu estado sorológico (controle negativo) e, 21 a 30 dias após a inoculação, nova sangria é realizada para verificar a soroconversão do animal. Além disso, podem ser coletados tecidos dos animais inoculados e que apresentaram soroconversão, tais como cérebro, coração,

fígado, pulmão, baço, rins e músculos esqueléticos, os quais podem ser analisados quanto à presença de cistos teciduais. Desta forma, o isolamento do parasita pode ser feito em cultura celular, permitindo a genotipagem da linhagem de *T. gondii* presente na infecção (MONTTOYA; LIESENFELD, 2004; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

A principal desvantagem das técnicas de isolamento é a necessidade da presença de parasitas viáveis na amostra, o que compromete sua sensibilidade, além da necessidade de manutenção de animais no laboratório, o que limita sua realização a laboratórios de pesquisa ou laboratórios de referência. Logo, este método é pouco utilizado no diagnóstico da infecção, mas tem grande aplicação em protocolos de pesquisa para isolamento de parasitas a partir de diversos tipos de amostras (FEITOSA et al., 2014; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

1.10.2 Métodos indiretos

Os métodos sorológicos são os mais comumente utilizados para o diagnóstico da infecção por *T. gondii* e são baseados, principalmente, na detecção de anticorpos do isotipo IgG. No entanto, a presença de anticorpos detectados por estes testes indica somente o contato prévio ou a exposição ao parasita. Para definir uma infecção recente ou ativa por análises sorológicas, é necessária a demonstração de títulos elevados e crescentes de anticorpos IgG específicos em amostras pareadas de soro com intervalos de 2 a 4 semanas ou a demonstração de anticorpos IgM específicos em uma única amostra de soro (SENSINI, 2006).

1.10.2.1 Teste do corante de Sabin-Feldman

O teste do corante de Sabin-Feldman (*Sabin-Feldman dye test*) foi o primeiro teste a ser utilizado como referência para sorologia de *T. gondii*, permanecendo como um método sorológico de referência para o diagnóstico da toxoplasmose até os tempos atuais (SABIN; FELDMAN, 1948). Este método avalia a presença de anticorpos IgG específicos em amostras de soro e se baseia na lise celular de taquizoítas vivos incubados na presença de proteínas do complemento e da amostra sorológica. Assim, se anticorpos IgG específicos estiverem presentes na amostra testada, estes se ligam à superfície do parasita, ativando a cascata do sistema complemento, que culmina com a lise do parasita, de modo que este não se cora posteriormente com a adição do corante azul de metileno. Por outro lado, na ausência de anticorpos IgG específicos na amostra testada, não há fixação de complemento nem lise do parasita, de modo que este fica corado a partir da adição do corante (TEKKESIN, 2012).

Embora apresente boa reprodutibilidade e alta sensibilidade e especificidade, alguns inconvenientes na execução deste método o tornam pouco utilizado na rotina laboratorial, tais como a necessidade de parasitas vivos e de soro fresco normal contendo as frações do sistema complemento. Contudo, este teste ainda é utilizado em inquéritos soroepidemiológicos em diversas espécies animais, pois não necessita de anticorpos secundários ou conjugados imunoenzimáticos espécie-específicos (CHEMOH et al., 2013; UDONSOM; BUDDHIRON-GAWATR; SUKTHANA, 2010).

1.10.2.2 Testes de aglutinação

Diversas técnicas de aglutinação já foram desenvolvidas para a detecção sorológica de *T. gondii*, com destaque para o teste de aglutinação direta (*direct agglutination test* – DAT), o teste de aglutinação direta modificada (*modified agglutination test* – MAT), o teste de aglutinação em látex (*latex agglutination test* – LAT) e o teste de hemaglutinação indireta (*indirect hemagglutination test* – IHAT). São largamente utilizados em inquéritos soroepidemiológicos em diferentes espécies de animais domésticos e silvestres e em humanos, com a principal vantagem de não utilizar anticorpos secundários espécie-específicos nem imunoconjugados (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

DAT utiliza taquizoítas tratados com formalina, que aglutinam na presença de anticorpos específicos, e sua utilização no diagnóstico de *T. gondii* foi descrita por Fulton e Turk (1959). Posteriormente, esta técnica foi modificada (MAT) com a utilização do agente redutor 2-mercaptoetanol, que destrói anticorpos IgM presentes na amostra, de forma a permitir a detecção apenas de anticorpos IgG anti-*T. gondii* (DESMONTS; REMINGTON, 1980). Estes métodos apresentam sensibilidade e especificidade relativamente elevadas, além de simplicidade e versatilidade, podendo ser utilizados para diagnóstico em várias espécies animais, incluindo humanos.

Já o IHAT baseia-se na aglutinação passiva de hemácias, previamente sensibilizadas com antígenos solúveis de *T. gondii*, na presença de anticorpos específicos presentes no soro do paciente (JACOBS; LANDE, 1957). Pode ser realizado com amostras de soro tratadas e não tratadas com 2-mercaptoetanol, permitindo assim a possibilidade de detecção de anticorpos IgM específicos e o diagnóstico de infecção recente. Entretanto, apesar da simplicidade e versatilidade, apresenta baixa sensibilidade em relação aos outros testes. Princípio semelhante é observado com o LAT, que utiliza partículas de látex em substituição

às hemácias para adsorver antígenos solúveis do parasita em sua superfície (TEKKESIN, 2012).

Uma variação do teste de aglutinação ainda utilizada por alguns laboratórios no diagnóstico de infecção aguda em gestantes e de infecção congênita em recém-nascidos é o teste de aglutinação por imunoabsorção (*Immunoglobulin M-immunosorbent agglutination assay* - ISAGA), descrito inicialmente por Desmonts, Naot e Remington (1981). Este método pode ser utilizado para a detecção de anticorpos IgM ou IgA e, atualmente, baseia-se na utilização de anticorpos monoclonais específicos para a captura destas classes de anticorpos presentes em amostra de soro e posterior incubação com taquizoítas de *T. gondii* para a avaliação da aglutinação (GÓMEZ-MARIN et al., 2011; MONTTOYA; LIESENFELD, 2004).

Outra estratégia baseada no teste de aglutinação e utilizada no diagnóstico de infecção recente, principalmente em gestantes, é o teste de aglutinação diferencial descrito por Danneman e colaboradores (1990), também conhecido como teste AC/HS. Este método baseia-se nos títulos diferenciais obtidos a partir da aglutinação de dois tipos de preparação antigênica: taquizoítas fixados em formalina (antígeno HS) e taquizoítas fixados em acetona ou metanol (antígeno AC). O antígeno AC preserva regiões antigênicas reconhecidas por anticorpos IgG produzidos mais precocemente na infecção, apresentando maior aglutinação com soros de fase aguda. Porém, este teste deve sempre ser utilizado em conjunto com outros testes para melhor interpretação e confiabilidade dos resultados (MONTTOYA; REMINGTON, 2008).

1.10.2.3 Teste de imunofluorescência indireta

O teste de imunofluorescência indireta (*indirect fluorescent antibody test* – IFAT) é amplamente utilizado para o diagnóstico da toxoplasmose em animais e humanos. O antígeno utilizado nesta técnica é constituído por taquizoítas intactos fixados em formalina e imobilizados em lâminas de vidro para microscopia, os quais revelam uma fluorescência periférica e brilhante após incubação com amostras de soro (anticorpos primários) e anticorpos secundários espécie-específicos marcados com fluorocromos (conjugados fluorescentes) (CAMARGO, 1964). IFAT apresenta alta especificidade para a detecção de anticorpos IgG, pois detecta principalmente antígenos de superfície em detrimento aos antígenos intracelulares, apresentando baixa reatividade cruzada com outros parasitas relacionados. Este teste já foi adaptado para a detecção de anticorpos IgM, mas pode apresentar resultados falso-positivos, em função da interferência de fator reumatoide, e

resultados falso-negativos, em função da interferência de altos títulos de anticorpos IgG presentes na amostra, os quais competem com a IgM pela ligação à superfície dos taquizoítas (McLEOD et al., 2009; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012; SENSINI, 2006)

As principais desvantagens deste teste são a necessidade de um microscópio de fluorescência, a presença de técnicos treinados e experientes na leitura das lâminas e na obtenção dos resultados, a subjetividade na interpretação dos resultados e as dificuldades de utilização em grandes inquéritos soroepidemiológicos (MONTROYA; REMINGTON, 2008).

1.10.2.4 Reações de Immunoblotting

Na técnica de *immunoblotting*, antígenos de *T. gondii* são separados por eletroforese em gel de poliacrilamida, de acordo com a massa molecular, e depois transferidos para membranas de nitrocelulose. Posteriormente, estas membranas são incubadas com amostras de soro e com conjugados imunoenzimáticos espécie-específicos (anticorpo secundário) e a reação é revelada pela adição do substrato enzimático apropriado e de um cromógeno. Como resultado, bandas antigênicas referentes aos antígenos imunodominantes do parasita, que são reconhecidos pelos anticorpos presentes na amostra testada, aparecem coradas e evidenciadas nas membranas. Esta técnica pode ser utilizada para a detecção de anticorpos dos isotipos IgG, IgM e IgA específicos a *T. gondii*, mas é mais amplamente utilizada para a detecção de IgG (MARCOLINO et al., 2000; REMINGTON; THULLIEZ; MONTROYA, 2004).

Por meio da técnica de *immunoblotting* é possível avaliar não só a presença ou ausência de anticorpos específicos na amostra testada, mas se pode determinar também quais antígenos do parasita são preferencialmente reconhecidos por estes anticorpos. Deste modo, vários antígenos de *T. gondii* têm sido definidos e caracterizados por anticorpos policlonais e monoclonais em reações de *immunoblotting*. A maioria destes antígenos pertence à família de antígenos de superfície do parasita (SRS - Sequências relacionadas à SAG1) ou às proteínas presentes nas organelas secretórias, como os micronemas (MIC), as roptrias (ROP) e os grânulos densos (GRA) (MARCOLINO et al., 2000; TRIDAPALLI et al., 2008).

A técnica de *immunoblotting* tem sido utilizada como método auxiliar no diagnóstico da infecção congênita para a detecção de anticorpos IgG e IgM em amostras pareadas de soros de mães e de recém-nascidos. Por este método, o reconhecimento de uma ou mais bandas antigênicas apenas pelo soro do recém-nascido, sem o respectivo reconhecimento pelos anticorpos maternos, é indicativo da ocorrência de transmissão congênita, excluindo a possibilidade de transferência placentária ou contaminação com anticorpos de origem materna

(MACHADO et al., 2010; MAGI; MIGLIORINI, 2011; REMINGTON; THULLIEZ; MONTOYA, 2004).

1.10.2.5 Ensaios imunoenzimáticos

Os ensaios imunoenzimáticos (*enzyme linked immunosorbent assay* – ELISA) são atualmente os mais utilizados no diagnóstico sorológico de diversos agentes infecciosos, inclusive *T. gondii*. Foram introduzidos por Voller e colaboradores (1976) e são baseados na reação de anticorpos presentes em amostra biológica com antígenos imobilizados em placas de microtitulação de poliestireno. O anticorpo específico presente na amostra testada liga-se ao antígeno imobilizado nos poços das placas e esta interação é demonstrada pela adição sequencial de um conjugado imunoenzimático (anti-imunoglobulina espécie-específica marcada com enzima), o substrato enzimático e um cromógeno. A coloração gerada pelo cromógeno a partir da reação da enzima com o seu respectivo substrato pode ser mensurada (densidade óptica) por meio de leitura em espectrofotômetro de placas e comparada com a coloração desenvolvida por uma amostra usada como controle negativo (MINEO; CAMARGO; FERREIRA, 1980; MURAT et al., 2013).

As principais vantagens desta técnica são a obtenção de resultados mais objetivos, com boa especificidade e sensibilidade, o custo relativamente baixo e a possibilidade de testar grandes quantidades de amostras num intervalo de tempo curto, tendo larga aplicação em inquéritos soroepidemiológicos e em laboratórios de rotina com grande demanda de análises. Por meio dos ensaios imunoenzimáticos, anticorpos específicos dos isotipos IgG, IgM, IgA e IgE podem ser detectados no soro de pacientes, mas também em diversos outros tipos de amostras biológicas, tais como saliva, leite (colostro), líquido cefalorraquidiano e líquido amniótico (REMINGTON; THULLIEZ; MONTOYA, 2004).

Há diversas técnicas distintas de ELISA disponíveis para o diagnóstico sorológico da infecção por *T. gondii*, com pequenas variações no protocolo de realização, o que torna cada uma delas padronizada para a detecção de um isotipo distinto de imunoglobulina, com resultados adequados para cada situação clínica a que se destina. A seguir, há uma breve descrição das técnicas de ELISA mais utilizadas no diagnóstico sorológico da toxoplasmose.

- **ELISA indireto:** trata-se do método mais simples, em que as placas são sensibilizadas com antígenos de *T. gondii* e reagem diretamente com anticorpos específicos presentes na amostra adicionada na sequência. Este ensaio é largamente utilizado na detecção de anticorpos IgG específicos, apresentando sensibilidade e especificidade elevadas na detecção

desta classe de imunoglobulinas, o que o torna muito utilizado no diagnóstico de rotina e em inquéritos soropidemiológicos. Porém, a simples detecção de anticorpos IgG permite concluir apenas que o paciente teve exposição prévia ao parasita, mas não permite determinar o tempo de infecção (recente ou tardia) (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

Por outro lado, esta técnica não apresenta resultados satisfatórios na detecção de anticorpos IgM e IgA, uma vez que gera muitos resultados falso-positivos na detecção de IgM, devido à reatividade cruzada com fator reumatoide, e muitos resultados falso-negativos na detecção de IgA, principalmente em amostras com altos títulos de IgG, os quais competem com a IgA (encontrada em menor quantidade na amostra) pela ligação ao antígeno imobilizado na placa de microtitulação (MONTROYA; REMINGTON, 2008).

- **ELISA de captura ou ELISA sanduíche:** esta técnica é uma modificação do método de ELISA indireto, apresentando maior sensibilidade que este na detecção de anticorpos IgM e IgA específicos. Nesta técnica, as placas são sensibilizadas com anticorpos monoclonais que capturam a porção Fc de anticorpos IgM (cadeia μ) ou de anticorpos IgA (cadeia α) presentes no soro testado, e aqueles específicos a *T. gondii* são selecionados mediante a adição subsequente de antígenos do parasita, seguidos de anticorpos anti-*T. gondii* conjugados com enzima (CAMARGO et al., 1978; MINEO et al., 1986).

Como anticorpos IgM são sintetizados apenas nas fases iniciais da infecção, um resultado negativo para este anticorpo pode descartar a possibilidade de infecção recente. Porém, como sua taxa de decaimento é muito variável, podendo persistir por muitos meses ou até anos em níveis detectáveis no soro, um resultado positivo nem sempre pode ser interpretado como indicativo de uma infecção recente (MONTROYA; ROSSO, 2005; SENSINI, 2006). Neste sentido, a detecção de IgA específica no soro pode ser usada para a confirmação de resultados, uma vez que geralmente é detectada em níveis mais elevados durante uma infecção recente, com decaimento total no soro anterior ao da IgM. Porém, como o declínio sorológico de IgA também ocorre em níveis muito variáveis, um resultado positivo nem sempre significa infecção recente, enquanto um resultado negativo nem sempre pode excluir uma infecção recente (SENSINI, 2006).

- **ELISA-avidez de IgG:** trata-se de teste desenvolvido para a avaliação da avidez de anticorpos IgG específicos, podendo auxiliar na discriminação entre infecção recente e infecção tardia. Em infecções recentes, a força de ligação da IgG aos seus respectivos epítomos antigênicos (avidez de IgG) é mais baixa e, à medida que a infecção avança, ocorre a maturação da resposta imune e estes anticorpos passam a apresentar avidez crescente pelos seus antígenos. Deste modo, em infecções de maior duração, encontra-se um predomínio de

anticorpos IgG de alta avidéz (CAMARGO et al., 1991). Altos títulos de IgG de baixa avidéz não identificam uma infecção adquirida recentemente, mas altos níveis de IgG de alta avidéz podem excluir infecções adquiridas recentemente (LEITE et al., 2008; REMINGTON; THULLIEZ; MONTOYA, 2004; VILLARD et al., 2013).

No teste ELISA-avidéz, agentes desnaturantes de proteínas, tais como ureia, são usados para dissociar a ligação dos complexos antígeno-anticorpo, de modo que apenas os anticorpos com maior afinidade (mais ávidos) permanecem ligados aos antígenos. A comparação entre os resultados obtidos com amostras tratadas e não tratadas com ureia permite determinar o índice de avidéz (IA) dos anticorpos IgG, em termos da porcentagem dos anticorpos que permaneceram ligados aos antígenos após o tratamento com a ureia (BEGHETTO et al., 2003).

A detecção de anticorpos IgE tem sido proposta para a diferenciação do estágio da infecção, uma vez que são detectados apenas durante a infecção aguda e a duração de sua soropositividade é menor que a de IgM e IgA. Porém, a demonstração de que pode ser detectada em casos de reativação de infecção crônica, bem como a ausência de testes padronizados para sua detecção torna sua pesquisa pouco utilizada no diagnóstico rotineiro da toxoplasmose, ficando restrita apenas a alguns laboratórios de referência, como um método adicional na definição da fase da infecção (FOUDRINIER et al., 2003; MONTOYA; ROSSO, 2005; SENSINI, 2006).

1.11 Perfis sorológicos na infecção humana por *Toxoplasma gondii*

Devido às características peculiares da resposta imune à infecção por *T. gondii*, em especial a resposta sorológica, foram propostos três perfis sorológicos distintos para a avaliação das diferentes fases da infecção por este parasita. Estes perfis sorológicos foram inicialmente propostos por Camargo e Leser (1976) e por Camargo e colaboradores (1978) e, à medida que novos testes sorológicos foram se tornando disponíveis e novas informações foram agregadas ao conhecimento da resposta sorológica aos antígenos de *T. gondii*, estes critérios foram ampliados (CAMARGO; MOURA; LESER, 1989; CAMARGO et al., 1991).

De acordo com o perfil de anticorpos detectados por métodos sorológicos clássicos, tais como os testes de hemaglutinação indireta, imunofluorescência e ELISA (indireto, captura e avidéz de IgG), os seguintes perfis sorológicos são reconhecidos na infecção por *T. gondii*:

(1) Perfil I - Infecção recente ou aguda: perfil definido pela presença de anticorpos IgM e IgA específicos associados à presença de anticorpos IgG em títulos crescentes e de baixa avidéz ($IA < 40\%$).

(2) Perfil II – Fase de transição: perfil definido pela presença de altos títulos de anticorpos IgG, com avidéz intermediária pelos seus antígenos ($40\% < IA < 70\%$), ausência de anticorpos IgA, e ausência ou baixos títulos decrescentes de anticorpos IgM.

(3) Perfil III – Infecção crônica: perfil definido pela presença de anticorpos IgG de alta avidéz ($IA > 70\%$), e total ausência de anticorpos IgA e IgM específicos.

A definição correta e mais precisa destes perfis sorológicos e o correto diagnóstico da infecção devem ser feitos com base na combinação de diferentes métodos para a pesquisa de diferentes classes de imunoglobulinas, a fim de se evitar a definição equivocada da fase da infecção, em função das limitações apresentadas pelos testes sorológicos, conforme descrito anteriormente (MONTTOYA; REMINGTON, 2008; MONTTOYA; ROSSO, 2005).

1.12 Prevenção

A infecção por *T. gondii* pode ser prevenida por meio da adoção de diversas medidas. Basicamente, a transmissão por meio de cistos teciduais pode ser evitada a partir da adoção de medidas como: (1) consumo de carnes bem cozidas, submetidas a temperaturas superiores a 67°C ou previamente congeladas a temperaturas inferiores a -13°C ; (2) evitar o consumo de alimentos preparados com carnes cruas ou mal cozidas; (3) evitar o contato de alimentos a serem ingeridos crus com superfícies ou utensílios que tenham entrado em contato prévio com carne crua; e (4) lavar bem as mãos, superfícies e utensílios utilizados no preparo de carnes (BOJAR; SZYMANSKA, 2010; JONES; DUBEY, 2012; ROBERT-GANGNEUX, 2014).

A transmissão por meio de oocistos pode ser evitada por meio da adoção das seguintes medidas: (1) lavar bem com água filtrada os alimentos a serem ingeridos crus, tais como frutas e outros vegetais, especialmente aqueles que entram em contato direto com o solo; (2) quando aplicável, descascar frutas e outros vegetais antes do consumo; (3) ingerir apenas água filtrada ou água mineral proveniente de fonte confiável; (4) evitar o consumo de água de fontes não confiáveis, especialmente de lagos, rios e represas, inclusive durante atividades de recreação nestes ambientes aquáticos e em piscinas; (5) evitar o consumo de frutos do mar crus, tais como ostras e mariscos; (6) evitar contato com fezes de gatos, especialmente em caixas de areia com excreções de gatos, as quais devem ser trocadas periodicamente, ou lavadas com água quente; (7) evitar o acesso de gatos a reservatórios de água ou plantações de

hortaliças; (8) evitar o contato direto das mãos com o solo, usando-se luvas durante procedimentos de jardinagem ou quando houver necessidade de contato com o solo; (9) lavar bem as mãos após contato com o solo ou com animais, que podem ter oocistos presos aos pelos; (10) e conscientizar e informar as pessoas em geral, especialmente gestantes, quanto aos riscos de transmissão do parasita (BOJAR; SZYMANSKA, 2010; JONES; DUBEY, 2012; ROBERT-GANGNEUX, 2014; SUKTHANA, 2006; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

Além disso, gestantes devem participar de acompanhamento pré-natal, com triagem sorológica específica para *T. gondii*, especialmente em países com alta soroprevalência para toxoplasmose. Caso sejam soronegativas, devem intensificar as medidas preventivas anteriormente propostas e fazer o acompanhamento sorológico até o parto, e caso apresentem soroconversão durante a gestação, devem receber tratamento adequado para evitar a transmissão para o feto (MONTTOYA; LIESENFELD, 2004; MONTTOYA; REMINGTON, 2008; ROBERT-GANGNEUX, 2014).

Uma vacina efetiva para a prevenção da toxoplasmose em humanos e outros animais ainda não foi desenvolvida, existindo apenas uma vacina preparada a partir de taquizoítas vivos atenuados, disponível comercialmente para a vacinação de ovelhas, prevenindo a ocorrência de abortos induzidos por *T. gondii* nestes animais (INNES, 2010).

1.13 Tratamento

A escolha do tratamento a ser adotado na toxoplasmose humana deve ser feita levando-se em consideração o grupo ao qual pertence o paciente (indivíduo imunocomprometido, indivíduo imunocompetente, gestante ou recém-nascido com infecção congênita), o estágio da infecção e as manifestações clínicas (MONTTOYA, LIESENFELD, 2004).

O tratamento da toxoplasmose pode ser feito com o uso de drogas do grupo dos antagonistas de folato (reduzem a proliferação do parasita por meio da inibição de enzimas envolvidas na síntese de folato), macrolídeos (apresentam efeito tóxico ao parasita), hidroxinaftoquinonas (apresentam efeito tóxico ao parasita, pois inibem moléculas envolvidas na cadeia respiratória) e fluoroquinolonas (impedem a proliferação do parasita, pois inibem enzimas envolvidas na replicação de seu DNA) (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003). Todas estas drogas agem contra o estágio taquizoíta, sendo usadas no tratamento da fase aguda da

infecção, e apresentam efeito muito limitado sobre a forma bradizoíta presente no interior de cistos teciduais. Além disso, tais drogas não levam à cura da infecção (INNES, 2010).

Com relação ao tratamento de gestantes com toxoplasmose primária, a droga mais utilizada é a espiramicina, um antibiótico do grupo dos macrolídeos. É utilizada com o objetivo de reduzir a parasitemia materna e, como alcança elevadas concentrações placentárias, visa evitar a colonização da placenta pelas formas taquizoítas, reduzindo, portanto, a transmissão vertical. Sua eficácia parece ser mais pronunciada no primeiro trimestre de gestação, diminuindo a partir do final do segundo trimestre, mas deve ser administrada até o parto, mesmo em casos de ausência de evidência de transmissão vertical. Porém, por não atravessar a barreira placentária eficientemente, em casos de infecção fetal suspeita ou confirmada, deve ser substituída por outras drogas (INNES, 2010; MONTOYA; ROSSO, 2005; ROBERT-GANGNEUX, 2014).

A combinação de pirimetamina, sulfadiazina e ácido folínico (tratamento tríplice) é indicada em substituição à espiramicina para gestantes com infecção aguda adquirida a partir do final do segundo trimestre de gestação ou naquelas em que a infecção fetal tenha sido confirmada ou altamente suspeita, a partir de um resultado positivo de PCR de líquido amniótico ou pela presença de anomalias fetais compatíveis com toxoplasmose congênita visualizadas por ultrassonografia fetal. Como pirimetamina é um forte inibidor das vias de folato, apresenta efeito significativo na inibição da proliferação celular, podendo apresentar efeitos teratogênicos. Deste modo, seu uso é contraindicado no primeiro trimestre de gestação. Além disso, pode ocasionar depressão de medula óssea, com redução das contagens de células sanguíneas, sendo administrada sempre em associação com ácido folínico, para redução e prevenção de alterações hematológicas (MONTOYA; REMINGTON, 2008; MONTOYA; ROSSO, 2005; ROBERT-GANGNEUX, 2014).

O tratamento tríplice também é utilizado no tratamento da toxoplasmose congênita, podendo ser alternado com uso de espiramicina em algumas situações, com os devidos cuidados quanto à ocorrência de alterações hematológicas. Em casos de processos inflamatórios ativos, principalmente nos olhos, deve ser associado com corticosteroides (MONTOYA; REMINGTON, 2008; MONTOYA; ROSSO, 2005; ROBERT-GANGNEUX, 2014).

Já a doença ocular pode ainda ser tratada com atovaquona, uma droga usada contra infecções causadas por protozoários, além de corticosteroides para reduzir o processo inflamatório intraocular e os danos teciduais dele resultantes (INNES, 2010).

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJZENBERG, D.; BAÑULS, A. L.; SU, C.; DUMÈTRE, A.; DEMAR, M.; CARME, B.; DARDÉ, M. L. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 10, p. 1185-1196, 2004.

ALIBERTI, J. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. **Nature Reviews**, London, v. 5, n. 2, p. 162-170, 2005.

ANDRADE, W. A.; SOUZA, M. C.; RAMOS-MARTINEZ, E.; NAGPAL, K.; DUTRA, M. S.; MELO, M. B.; BARTHOLOMEU, D. C.; GHOSH, S.; GOLENBOCK, D. T.; GAZZINELLI, R. T. Combined action of nucleic acid-sensing Toll-like receptors and TLR11/TLR12 heterodimers imparts resistance to *Toxoplasma gondii* in mice. **Cell Host & Microbe**, v. 13, n. 1, p. 42-53, 2013.

ANDRADE, G. M.; VASCONCELOS-SANTOS, D. V.; CARELLOS, E. V.; ROMANELLI, R. M.; VÍTOR, R. W.; CARNEIRO, A. C.; JANUÁRIO, J. N. Congenital toxoplasmosis from a chronically infected woman with reactivation of retinochoroiditis during pregnancy. **Jornal de Pediatria**, v. 86, n. 1, p. 85-88, 2010.

ARAMINI, J. J.; STEPHEN, C.; DUBEY, J. P.; ENGELSTOFT, C.; SCHWANTJE, H.; RIBBLE, C. S. Potential contamination of drinking water with *Toxoplasma gondii* oocysts. **Epidemiology and Infection**, v. 122, p. 305-315, 1999.

ARANTES, T. P.; LOPES, W. D.; FERREIRA, R. M.; PIERONI, J. S.; PINTO, V. M.; SAKAMOTO, C. A.; COSTA, A. J. *Toxoplasma gondii*: evidence for the transmission by semen in dogs. **Experimental Parasitology**, Chicago, v. 123, n. 2, p. 190-194, 2009.

BAHIA-OLIVEIRA, L. M.; JONES, J. L.; AZEVEDO-SILVA, J.; ALVES, C. C.; OREFICE, F.; ADDISS, D. G. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 9, n. 1, p. 55-62, 2003.

BALASUNDARAM, M. B.; ANDAVAR, R.; PALANISWAMY, M.; VENKATAPATHY, N. Outbreak of acquired ocular toxoplasmosis involving 248 patients. **Archives of Ophthalmology**, v. 128, p. 28-32, 2010.

BEGHETTO, E.; BUFFOLANO, W.; SPADONI, A.; DEL PEZZO, M.; DI CRISTINA, M.; MINENKOVA, O.; PETERSEN, E.; FELICI, F.; GARGANO, N. Use of an immunoglobulin G avidity assay based on recombinant antigens for diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 41, n. 12, p. 5414-5418, 2003.

BERGER, F.; GOULET, V.; LE STRAT, Y.; DESENCLOS, J. C. Toxoplasmosis among pregnant women in France: risk factors and change of prevalence between 1995 and 2003. **Revue d'Epidémiologie et de Santé Publique**, v. 57, p. 241-248, 2009.

BIRADAR, S. S.; SARAVANAN, B. C.; TEWARI, A. K.; SREEKUMAR, C.; SANKAR, M.; SUDHAKAR, N. R. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from

chickens in India by GRA6 gene sequence analysis. **Acta Parasitologica**, v. 59, n. 4, p. 666-674, 2014.

BLACKMAN, M. J.; CARRUTHERS, V. B. Recent insights into apicomplexan parasite egress provide new views to a kill. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 459-464, 2013.

BLADER, I. J.; SAEIJ, J. P. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. **APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 117, n. 5-6, p. 458-476, 2009.

BOJAR, I.; SZYMANSKA, J. Environmental exposure of pregnant women to infection with *Toxoplasma gondii* – state of the art. **AAEM: Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 17, p. 209-214, 2010.

BOOTHROYD, J. C. Expansion of host range as a driving force in the evolution of *Toxoplasma*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 2, p. 179-184, 2009.

BOURDIN, C.; BUSSE, A.; KOUAMOU, E.; TOUAFÉK, F.; BODAGHI, B.; LE HOANG, P.; MAZIER, D.; PARIS, L.; FEKKAR, A. PCR detection of *Toxoplasma gondii* DNA in blood and ocular samples for the diagnosis of ocular toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, [in press], 2014.

BURG, J. L.; GROVIER, C. M.; POULETTY, P.; BOOTHROYD, J. C. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 27, n. 8, p. 1787-1792, 1989.

BUTLER, N. S.; HARRIS, T. H.; BLADER, I. J. Regulation of immunopathogenesis during *Plasmodium* and *Toxoplasma* infections: more parallels than distinctions? **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 12, p. 593-602, 2013.

BUXTON, D.; McALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P. The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 18, n. 12, p. 546-552, 2002.

BUZONI-GATEL, D.; WERTS, C. *Toxoplasma gondii* and subversion of the immune system. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 10, p. 448-452, 2006.

CAMARGO, M. E. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 12, p. 117-118, 1964.

CAMARGO, M. E.; FERREIRA, A. W.; MINEO, J. R.; TAKIGUTI, C. K.; NAKAHARA, O. S. Immunoglobulin G and immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays and defined toxoplasmosis serological patterns. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 21, n. 1, p. 55-58, 1978.

CAMARGO, M. E.; LESER, P. G. Diagnostic information from serological tests in human toxoplasmosis. II. Evolutive study of antibodies and serological patterns in acquired toxoplasmosis as detected by hemagglutination, complement fixation, IgG- and IgM

immunofluorescence tests. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 18, p. 227-238, 1976.

CAMARGO, M. E.; MOURA, M. E. G.; LESER, P. G. Toxoplasmosis serology: an efficient hemagglutination procedure to detect IgG and IgM antibodies. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 279-285, 1989.

CAMARGO, M. E.; SILVA, S. M.; LESER, P. G.; GRANATO, C. H. Avidéz de anticorpos IgG específicos como marcadores de infecção primária recente pelo *Toxoplasma gondii*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 213-218, 1991.

CAMPOS, F. A.; ANDRADE, G. M.; LANNA, A. P. S.; LAGE, B. F.; ASSUMPCÃO, M. V.; PINTO, J. A. Incidence of congenital toxoplasmosis among infants born to HIV-coinfected mothers: case series and literature review. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 18, n. 6, p. 609-617, 2014.

CANTON, J.; KIMA, P. E. Interactions of pathogen-containing compartments with the secretory pathway. **Cellular Microbiology**, v. 14, n. 11, p. 1676-1686, 2012.

CARLIER, Y.; TRUYENS, C.; DELORON, P.; PEYRON, F. Congenital parasitic infections: a review. **Acta Tropica**, v. 121, n. 2, p. 55-70, 2012.

CASARTELLI-ALVES, L.; BOECHAT, V. C.; MACEDO-COUTO, R.; FERREIRA, L. C.; NICOLAU, J. L.; NEVES, L. B.; MILLAR, P. R.; VICENTE, R. T.; OLIVEIRA, R. V.; MUNIZ, A. G.; BONNA, I. C.; AMENDOEIRA, M. R.; SILVA, R. C.; LANGONI, H.; SCHUBACH, T. M.; MENEZES, R. C. Sensitivity and specificity of serological tests, histopathology and immunohistochemistry for detection of *Toxoplasma gondii* infection in domestic chickens. **Veterinary Parasitology**, v. 204, n. 3-4, p. 346-351, 2014.

CHEMOH, W.; SAWANGJAROEN, N.; NISSAPATORN, V.; SUWANRATH, C.; CHANDEYING, V.; HORTIWAKUL, T.; ANDIAPPAN, H.; SERMWITTAYAWONG, N.; CHAROENMAK, B.; SIRIPAITOON, P.; LEKKLA, A.; SUKTHANA, Y. *Toxoplasma gondii* infection: what is the real situation? **Experimental Parasitology**, v. 135, n. 4, p. 685-689, 2013.

COOK, A. J.; GILBERT, R. E.; BUFFOLANO, W.; ZUFFEREY, J.; PETERSEN, E.; JENUM, P. A.; FOULON, W.; SEMPRINI, A. E.; DUNN, D. T. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European research network on congenital toxoplasmosis. **BMJ**, London, v. 321, n. 7254, p. 142-147, 2000.

CORREA, D.; CAÑEDO-SOLARES, I.; ORTIZ-ALEGRÍA, L. B.; CABALLERO-ORTEGA, H.; RICO-TORRES, C. P. Congenital and acquired toxoplasmosis: diversity and role of antibodies in different compartments of the host. **Parasite Immunology**, Malden, v. 29, p. 651-660, 2007.

DANNEMAN, B.; VAUGHN, W.; THULLIEZ, P.; REMINGTON, J. S. Differential agglutination test for diagnosis of recently acquired infection with *Toxoplasma gondii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 9, p. 1928-1933, 1990.

DASS, S. A.; VASUDEVAN, A.; DUTTA, D.; SOH, L. J.; SAPOLSKY, R. M.; VYAS, A. Protozoan parasite *Toxoplasma gondii* manipulates mate choice in rats by enhancing attractiveness of males. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, p. e27229, 2011.

DEBIERRE-GROCKIEGO, F.; CAMPOS, M. A.; AZZOUZ, N.; SCHMIDT, J.; BIEKER, U.; RESENDE, M. G.; MANSUR, D. S.; WEINGART, R.; SCHMIDT, R. R.; GOLENBOCK, D. T.; GAZZINELLI, R. T.; SCHWARZ, R. T. Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**, v. 179, n. 2, p. 1129-1137, 2007.

DENKERS, E. Y.; GAZZINELLI, R. T. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington DC, v. 11, n. 4, p. 569-588, 1998.

DENKERS, E. Y.; SCHNEIDER, A. G.; COHEN, S. B.; BUTCHER, B. A. Phagocyte responses to protozoan infection and how *Toxoplasma gondii* meets the challenge. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 8, p. 1-4, 2012.

DESMONTS, G.; NAOT, Y.; REMINGTON, J. S. Immunoglobulin M-immunosorbent agglutination assay for diagnosis of infectious diseases: diagnosis of acute congenital and acquired *Toxoplasma* infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 486-491, 1981.

DESMONTS, G.; REMINGTON, J. S. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 11, n. 6, p. 562-568, 1980.

DLUGONSKA, H. *Toxoplasma* rhoptries: unique secretory organelles and source of promising vaccine proteins for immunoprevention of toxoplasmosis. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2008, p. 1-7, 2008.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 126, n. 1-2, p. 57-72, 2004.

_____. The history of *Toxoplasma gondii* – the first 100 years. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 467-475, 2008.

_____. **Toxoplasmosis of animals and humans**. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 2010a.

_____. *Toxoplasma gondii* infections in chickens (*Gallus domesticus*): prevalence, clinical disease, diagnosis, and public health significance. **Zoonoses and Public Health**, v. 57, p. 60-73, 2010b.

_____. *Toxoplasma gondii* and the host cells. **Annals of Parasitology**, v. 60, n. 2, p. 83-88, 2014.

DUBEY, J. P.; HILL, D. E.; JONES, J. L.; HIGHTOWER, A. W.; KIRKLAND, E.; ROBERTS, J. M.; MARCET, P. L.; LEHMANN, T.; VIANNA, M. C.; MISKA, K.; SREEKUMAR, C.; KWOK, O. C.; SHEN, S. K.; GAMBLE, H. R. Prevalence of viable

Toxoplasma gondii in beef, chicken, and pork from retail meat stores in the United States: risk assessment to consumers. **The Journal of Parasitology**, v. 91, p. 1082–1093, 2005.

DUBEY, J. P.; HILL, D. E.; ROZENBOOM, D.; RAJENDRAN, C.; CHOUDHARY, S.; FERREIRA, L. H.; KWOK, O. C.; SU, C. High prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from organic pigs in northern USA. **Veterinary Parasitology**, v. 188, n. 1-2, p. 14-18, 2012.

DUBEY, J. P.; JONES, J. L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 11, p. 1257-1278, 2008.

DUBEY, J. P.; LAGO, E. G.; GENNARI, S. M.; SU, C.; JONES, J. L. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, v. 139, n. 11, p. 1375-1424, 2012.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington DC, v.11, n. 2, p. 267-299, 1998.

DUBREMETZ, J. F.; LEBRUN, M. Virulence factors of *Toxoplasma gondii*. **Microbes and Infection**, v. 14, p. 1403-1410, 2012.

DUMÈTRE, A.; LE BRAS, C.; BAFFET, M.; MENECEUR, P.; DUBEY, J. P.; DEROUIN, F.; DUGUET, J. P.; JOYEUX, M.; MOULIN, L. Effects of ozone and ultraviolet radiation treatments on the infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts. **Veterinary Parasitology**, v. 153, p. 209-213, 2008.

DUNAY, I. R.; SIBLEY, L. D. Monocytes mediate mucosal immunity to *Toxoplasma gondii*. **Current Opinion in Immunology**, v. 22, n. 4, p. 461-466, 2010.

DUPONT, C. D.; CHRISTIAN, D. A.; HUNTER, C. A. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. **Seminars in Immunopathology**, v. 34, n. 6, p. 793-813, 2012.

EGAN, C. E.; COHEN, S. B.; DENKERS, E. Y. Insights into inflammatory bowel disease using *Toxoplasma gondii* as an infectious trigger. **Immunology and Cell Biology**, v. 90, p. 668-675, 2012.

ESCH, K. J.; PETERSEN, C. A. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 1, p. 58-85, 2013.

ESMERINI, P. O.; GENNARI, S. M.; PENA, H. F. Analysis of marine bivalve shellfish from the fish market in Santos city, São Paulo state, Brazil, for *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, v. 170, p. 8-13, 2010.

FALLAHI, S. H.; KAZEMI, B.; SEYYED-TABAEI, S. J.; BANDEHPUR, M.; LASJERDI, Z.; TAGHIPOUR, N.; ZEBARDAST, N.; NIKMANESH, B.; OMRANI, V. F.; EBRAHIMZADEH, F. Comparison of the RE and B1 gene for detection of *Toxoplasma gondii* infection in children with cancer. *Parasitology International*, v. 63, n. 1, p. 37-41, 2014.

FEITOSA, T. F.; VILELA, V. L.; MELO, L. R.; ALMEIDA-NETO, J. L.; SOUTO, D. V.; MORAIS, D. F.; ATHAYDE, A. C.; AZEVEDO, S. S.; PENA, H. F. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in slaughtered pigs from Northeast, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 202, n. 3-4, p. 305-309, 2014.

FERNÁNDEZ-SABÉ, N.; CERVERA, C.; FARIÑAS, M. C.; BODRO, M.; MUÑOZ, P.; GURGUÍ, M.; TORRE-CISNEROS, J.; MARTÍN-DÁVILA, P.; NOBLEJAS, A.; LEN, O.; GARCÍA-REYNE, A.; DELL POZO, J. L.; CARRATALÀ, J. Risk factors, clinical features, and outcomes of toxoplasmosis in solid-organ transplant recipients: a matched case-control study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 3, p. 355-361, 2012.

FEUSTEL, S. M.; MEISSNER, M.; LIESENFELD, O. *Toxoplasma gondii* and the blood-brain barrier. **Virulence**, v. 3, n. 2, p. 182-192, 2012.

FLEGR, J. How and why *Toxoplasma* makes us crazy. **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 4, p. 156-163, 2013.

FOUDRINIER, F.; VILLENA, I.; JAUSSAUD, R.; AUBERT, D.; CHEMLA, C.; MARTINOT, F.; PINON, J. M. Clinical value of specific immunoglobulin E detection by enzyme-linked immunosorbent assay in cases of acquired and congenital toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 41, n. 4, p. 1681-1686, 2003.

FRANCIA, M. E.; STRIEPEN, B. Cell division in apicomplexan parasites. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 2, p. 125-136, 2014.

FRICKER-HIDALGO, H.; BRENIER-PINCHART, M. P.; SCHAAL, J. P.; EQUY, V.; BOST-BRU, C.; PELLOUX, H. 2007. Value of *Toxoplasma gondii* detection in one hundred thirty-three placentas for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 26, n. 9, p. 845-846, 2007.

FULTON, J. D.; TURK, J. L. Direct agglutination test for *Toxoplasma gondii*. **Lancet**, London, v. 2, p. 1068-1069, 1959.

GAVINET, M. F.; ROBERT, F.; FIRTION, G.; DELOUVRIER, E.; HENNEQUIN, C.; MAURIN, J. R.; TOURTE-SCHAEFER, C.; DUPOUY-CAMET, J. Congenital toxoplasmosis due to maternal reinfection during pregnancy. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 35, n. 5, p. 1276-1277, 1997.

GAZZINELLI, R. T.; WYSOCKA, M.; HIENY, S.; SCHARTON-KERSTEN, T.; CHEEVER, A.; KUHN, R.; MULLER, W.; TRINCHIERI, G.; SHER, A. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4⁺ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 157, n. 2, p. 798-805, 1996.

GILBERT, R. E.; FREEMAN, K.; LAGO, E. G.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M.; TAN, H. K.; WALLON, M.; BUFFOLANO, W.; STANFORD, M. R.; PETERSEN, E.; EUROPEAN MULTICENTRE STUDY ON CONGENITAL TOXOPLASMOSIS (EMSCOT). Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 8, p. e277, 2008.

GÓMEZ-MARIN, J. E.; DE-LA-TORRE, A.; ANGEL-MULLER, E.; RUBIO, J.; ARENAS, J.; OSORIO, E.; NUÑEZ, L.; PINZON, L.; MENDEZ-CORDOBA, L. C.; BUSTOS, A.; DE-LA-HOZ, I.; SILVA, P.; BELTRAN, M.; CHACON, L.; MARRUGO, M.; MANJARRES, C.; BAQUERO, H.; LORA, F.; TORRES, E.; ZULUAGA, O. E.; ESTRADA, M.; MOSCOTE, L.; SILVA, M. T.; RIVERA, R.; MOLINA, A.; NAJERA, S.; SANABRIA, A.; RAMIREZ, M. L.; ALARCON, C.; RESTREPO, N.; FALLA, A.; RODRIGUEZ, T.; CASTAÑO, G. First colombian multicentric newborn screening for congenital toxoplasmosis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, p. e1195, 2011.

GRAS, L.; GILBERT, R. E.; WALLON, M.; PEYRON, F.; CORTINA-BORJA, M. Duration of the IgM response in women acquiring *Toxoplasma gondii* during pregnancy: implications for clinical practice and cross-sectional incidence studies. **Epidemiology and Infection**, v. 132, n. 3, p. 541-548, 2004.

GUY, E. C.; JOYNSON, D. H. Potential of the polymerase chain reaction in the diagnosis of active *Toxoplasma* infection by detection of parasite in blood. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 172, n. 1, p. 319-322, 1995.

HALONEN, S. K.; WEISS, L. M. Toxoplasmosis. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 114, p. 125-145, 2013.

HEGAB, S. M.; AL-MUTAWA, S. A. Immunopathogenesis of toxoplasmosis. **Clinical and Experimental Medicine**, Verlag, v. 3, n. 2, p. 84-105, 2003.

HERWALDT, B. L. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 659-688, 2001.

HILL, D. E.; BENEDETTO, S. M.; COSS, C.; McCRARY, J. L.; FOURNET, V. M.; DUBEY, J. P. Effects of time and temperature on the viability of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in enhanced pork loin. **Journal of Food Protection**, v. 69, p. 1961-1965, 2006.

HOHLFELD, P.; DAFFOS, F.; COSTA, J. M.; THULLIEZ, P.; FORESTIER, F.; VIDAUD, M. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase-chain-reaction test on amniotic fluid. **The New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v. 331, n. 11, p. 695-699, 1994.

HOMAN, W. L.; VERCAMMEN, M.; De BRAEKELEER, J.; VERSCHUERN, H. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 30, n. 1, p. 69-75, 2000.

HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 172, n. 6, p. 1561-1566, 1995.

HSU, P. C.; GROER, M.; BECKIE, T. New findings: depression, suicide, and *Toxoplasma gondii* infection. **Journal of the American Association of Nurse Practitioners**, p. 1-9, 2014.

HUNTER, C. A.; SIBLEY, L. D. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 11, p. 766-778, 2012.

HURLEY, R. A.; TABER, K. H. Latent *Toxoplasmosis gondii*: emerging evidence for influences on neuropsychiatric disorders. **Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 24, n. 4, p. 376-383, 2012.

INNES, E. A. A brief history and overview of *Toxoplasma gondii*. **Zoonoses and Public Health**, v. 57, n. 1, p. 1-7, 2010.

JACOBS, L.; LANDE, M. N. A hemagglutination test for toxoplasmosis. **Journal for Parasitology**, New York, v. 43, n. 3, p. 308-314, 1957.

JONES, J. L.; DARGELAS, V.; ROBERTS, J.; PRESS, C.; REMINGTON, J. S.; MONTOYA, J. G. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, p. 878-884, 2009.

JONES, J. L.; DUBEY, J. P. Waterborne toxoplasmosis - recent developments. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 10-25, 2010.

_____. Foodborne toxoplasmosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 6, p. 845-51, 2012.

KEELEY, A.; SOLDATI, D. The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa. **Trends in Cell Biology**, Cambridge, v. 14, n. 10, p. 528-532, 2004.

KEMP, L. E.; YAMAMOTO, M.; SOLDATI-FAVRE, D. Subversion of host cellular functions by the apicomplexan parasites. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 4, p. 607-631, 2013.

KIJLSTRA, A.; EISSEN, O. A.; CORNELISSEN, J.; MUNNIKSMA, K.; EIJCK, I.; KORTBEEK, T. *Toxoplasma gondii* infection in animal-friendly pig production systems. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 45, p. 3165-3169, 2004.

KIM, K.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 34, n. 3, p. 423-432, 2004.

KNIEL, K. E.; LINDSAY, D. S.; SUMNER, S. S.; HACKNEY, C. R.; PIERSON, M. D.; DUBEY, J. P. Examination of attachment and survival of *Toxoplasma gondii* oocysts on raspberries and blueberries. **The Journal of Parasitology**, v. 88, n. 4, p. 790-793, 2002.

KODJIKIAN, L.; HOIGNE, I.; ADAM, O.; JACQUIER, P.; AEBI-OCHSNER, C.; AEBI, C.; GARWEG, J. G. Vertical transmission of toxoplasmosis from a chronically infected immunocompetent woman. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 23, n. 3, p. 272-274, 2004.

KRAVETZ, J. D.; FEDERMAN, D. G. Toxoplasmosis in pregnancy. **The American Journal of Medicine**, New York, v. 118, n. 3, p. 212-216, 2005.

LEITE, M.; SICILIANO, S.; ROCHA, L. S.; JUSTA, M. T.; CÉSAR, K. R.; GRANATO, C. F. Correlation between specific IgM levels and percentage IgG-class antibody avidity to

Toxoplasma gondii. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 50, n. 4, p. 237-242, 2008.

LIU, Q.; WEI, F.; GAO, S.; JIANG, L.; LIAN, H.; YUAN, B.; YUAN, Z.; XIA, Z.; LIU, B.; XU, X.; ZHU, X. Q. *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women in China. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 2; p. 162-166, 2009.

LOPES, W. D.; RODRIGUEZ, J. D.; SOUZA, F. A.; SANTOS, T. R.; SANTOS, R. S.; ROSANESE, W. M.; LOPES, W. R.; SAKAMOTO, C. A.; COSTA, A. J. Sexual transmission of *Toxoplasma gondii* in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 195, n. 1-2, p. 47-56, 2013.

MACHADO, A. S.; ANDRADE, G. M. Q.; JANUÁRIO, J. N.; FERNANDES, M. D.; CARNEIRO, A. C. A. V.; CARNEIRO, M.; CARELLOS, E. V. M.; ROMANELLI, R. M. C.; VASCONCELOS-SANTOS, D. V.; VITOR, R. W. A. IgG and IgM Western blot assay for diagnosis of congenital toxoplasmosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 6, p. 757-761, 2010.

MAENZ, M.; SCHLÜTER, D.; LIESENFELD, O.; SCHARES, G.; GROSS, U.; PLEYER, U. Ocular toxoplasmosis past, present and new aspects of an old disease. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 39, p. 77-106, 2014.

MAGI, B.; MIGLIORINI, L. Western blotting for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. **The New Microbiologica**, v. 34, n. 1, p. 93-95, 2011.

MARCOLINO, P. T.; SILVA, D. A. O.; LESER, P. G.; CAMARGO, M. E.; MINEO, J. R. Molecular markers in acute and chronic phases of human toxoplasmosis: determination of immunoglobulin G avidity by Western blotting. **Clinical Diagnostic and Laboratory Immunology**, Washington DC, v. 7, n. 3, p. 384-389, 2000.

McCONKEY, G. A.; MARTIN, H. L.; BRISTOW, G. C.; WEBSTER, J. P. *Toxoplasma gondii* infection and behavior – location, location, location? **Journal of Experimental Biology**, v. 216, p. 113-119, 2013.

McLEOD, R.; KIEFFER, F.; SAUTTER, M.; HOSTEN, T.; PELLOUX, H. Why prevent, diagnose and treat congenital toxoplasmosis? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 2, p. 320-344, 2009.

MELO, M. B.; JENSEN, K. D. C.; SAEIJ, J. P. J. *Toxoplasma gondii* effectors are master regulators of the inflammatory response. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 11, p. 487-495, 2011.

MERCIER, A.; DEVILLARD, S.; NGOUBANGOYE, B.; BONNABAU, H.; BAÑULS, A. L.; DURAND, P.; SALLE, B.; AJZENBERG, D.; DARDÉ, M. L. Additional haplogroups of *Toxoplasma gondii* out of Africa: population structure and mouse-virulence of strains from Gabon. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 11, p. e876, 2010.

MILLER, C. M.; BOULTER, N. R.; IKIN, R. J.; SMITH, N. C. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 1, p. 23-39, 2009.

MILLER, M. A.; MILLER, W. A.; CONRAD, P. A.; JAMES, E. R.; MELLI, A. C.; LEUTENEGGER, C. M.; DABRITZ, H. A.; PACKHAM, A. E.; PARADIES, D.; HARRIS, M.; AMES, J.; JESSUP, D. A.; WORCESTER, K.; GRIGG, M. E. Type X *Toxoplasma gondii* in a wild mussel and terrestrial carnivores from coastal California: new linkages between terrestrial mammals, runoff and toxoplasmosis of sea otters. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 1319-1328, 2008.

MINEO, J. R.; CAMARGO, M. E.; FERREIRA, A. W. Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Toxoplasma gondii* polysaccharides in human toxoplasmosis. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 27, n. 2, p. 283-287, 1980.

MINEO, J. R.; CAMARGO, M. E.; FERREIRA, A. W.; ALMEIDA, G. Research on IgM anti-*Toxoplasma gondii* antibodies by using a reverse immunoenzymatic technique. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 28, p. 6-11, 1986.

MONTOYA, J. G. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 185, suppl. 1, p. S73-82, 2002.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**, London, v. 363, n. 9425, p. 1965-1976, 2004.

MONTOYA J. G.; REMINGTON, J. S. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 47, p. 554-566, 2008.

MONTOYA, J. G.; ROSSO, F. Diagnosis and management of toxoplasmosis. **Clinics in Perinatology**, v. 32, p. 705-726, 2005.

MOURA, L.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M.; WADA, M. Y.; JONES, J. L.; TUBOI, S. H.; CARMO, E. H.; RAMALHO, W. M.; CAMARGO, N. J.; TREVISAN, R.; GRAÇA, R. M.; da SILVA, A. J.; MOURA, I.; DUBEY, J. P.; GARRETT, D. O. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, p. 326-329, 2006.

MUNOZ, M.; LIESENFELD, O.; HEIMESAAT, M. M. Immunology of *Toxoplasma gondii*. **Immunological Reviews**, v. 240, p. 269-285, 2011.

MURAT, J. B.; HIDALGO, H. F.; BRENIER-PINCHART, M. P.; PELLOUX, H. Human toxoplasmosis: which biological diagnostic tests are best suited to which clinical situations? **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 11, n. 9, p. 943-956, 2013.

NAM, H. W. GRA proteins of *Toxoplasma gondii*: maintenance of host-parasite interactions across the parasitophorous vacuolar membrane. **Korean Journal of Parasitology**, v. 47, p. S29-S37, 2009.

NASCIMENTO, F. S.; SUZUKI, L. A.; ROSSI, C. L. Assessment of the value of detecting specific IgA antibodies for the diagnosis of a recently acquired primary *Toxoplasma* infection. **Prenatal Diagnosis**, v. 28, n. 8, p. 749-752, 2008.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences**, v. 147, p. 763-766, 1908.

_____. Sur un protozoaire nouveau du gondi. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences**, v. 148, p. 369-372, 1909.

PALMEIRA, P.; QUINELLO, C.; SILVEIRA-LESSA, A. L.; ZAGO, C. A.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, p. 1-14, 2012.

PENA, H. F.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SU, C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 5, p. 561-569, 2008.

PENA, H. F.; MARVULO, M. F.; HORTA, M. C.; SILVA, M. A.; SILVA, J. C.; SIQUEIRA, D. B.; LIMA, P. A.; VITALIANO, S. N.; GENNARI, S. M. Isolation and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* from a red-handed howler monkey (*Alouatta belzebul*), a jaguarundi (*Puma yagouaroundi*), and a black-eared opossum (*Didelphis aurita*) from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 3-4, p. 377-381, 2011.

PETERSEN, E.; VESCO, G.; VILLARI, S.; BUFFOLANO, W. What do we know about risk factors for infection in humans with *Toxoplasma gondii* and how can we prevent infections? **Zoonoses and Public Health**, v. 57, n. 1, p. 8-17, 2010.

PFAFF, A. W.; ABOU-BACAR, A.; LETSCHER-BRU, V.; VILLARD, O.; SENEGAS, A.; LOUSLI, M.; CANDOLFI, E. 2007. Cellular and molecular physiopathology of congenital toxoplasmosis: the dual role of IFN-gamma. **Parasitology**, v. 134, n. 13, p. 1895-1902, 2007.

PIFER, R.; YAROVINSKY, F. Innate responses to *Toxoplasma gondii* in mice and humans. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 9, p. 388-393, 2011.

PLATTNER, F.; YAROVINSKY, F.; ROMERO, S.; DIDRY, D.; CARLIER, M. F.; SHER, A.; SOLDATI-FAVRE, D. *Toxoplasma* profilin is essential for host cell invasion and TLR11-dependent induction of an interleukin-12 response. **Cell Host & Microbe**, v. 3, n. 2, p. 77-87, 2008.

PUTIGNANI, L.; MANCINELLI, L.; DEL CHIERICO, F.; MENICHELLA, D.; ADLERSTEIN, D.; ANGELICI, M. C.; MARANGI, M.; BERRILLI, F.; CAFFARA, M.; di REGALBONO, D. A.; GIANGASPERO, A. Investigation of *Toxoplasma gondii* presence in farmed shellfish by nested-PCR and real-time PCR fluorescent amplicon generation assay (FLAG). **Experimental Parasitology**, v. 127, p. 409-417, 2011.

RAETZ, M.; KIBARDIN, A.; STURGE, C. R.; PIFER, R.; LI, H.; BURSTEIN, E.; OZATO, K.; LARIN, S.; YAROVINSKY, F. Cooperation of TLR12 and TLR11 in the IRF8-dependent IL-12 response to *Toxoplasma gondii* profilin. *Journal of Immunology*, v. 191, n. 9, p. 4818-4827, 2013.

RAVINDRAN, S.; BOOTHROYD, J. C. Secretion of proteins into host cells by apicomplexan parasites. **Traffic**, v. 9, n. 5, p. 647-656, 2008.

REMINGTON, J. S.; McLEOD, R.; THULLIEZ, P.; DESMONTS, G. Toxoplasmosis. In: Remington, J. S.; Klein, J.; Wilson, C.; Baker, C. (Eds.), **Infectious diseases of the fetus and newborn infant**. 6 ed., Philadelphia: W B Saunders, pp. 947-1091, 2006.

REMINGTON, J. S.; THULLIEZ, P.; MONTOYA, J. G. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 42, n. 3, p. 941-945, 2004.

ROBERT-GANGNEUX, F. It is not only the cat that did it: How to prevent and treat congenital toxoplasmosis. **Journal of Infection**, v. 68, p. S125-S133, 2014.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2, p. 264-296, 2012.

ROOS, D. S.; CRAWFORD, M. J.; DONALD, R. G.; KISSINGER, J. C.; KLIMCZAK, L. J.; STRIEPEN, B. Origin, targeting, and function of the apicomplexan plastid. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, p. 426-432, 1999.

SABIN, A. B. Biological and immunological identity of *Toxoplasma* of animal and human origin. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 41, p. 75-80, 1939.

SABIN, A.; FELDMAN, H. A. Dyes as microchemical indicators of anil immunity phenomenon affecting a protozoan parasitic (*Toxoplasma*). **Science**, Washington DC, v. 108, p. 660-663, 1948.

al SADOON, M. K.; el BAHRAWY, A. F. Blood parasites of five species of lizards trapped in Abha Province, Saudi Arabia. **Journal of Egyptian Society of Parasitology**, v. 28, n. 3, p. 899-905, 1998.

SAEIJ, J. P. J.; BOYLE, J. P.; BOOTHROYD, J. C. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 21, n. 10, p. 476-481, 2005.

SANECKA, A.; FRICKEL, E. M. Use and abuse of dendritic cells by *Toxoplasma gondii*. **Virulence**, v. 3, n. 7, p. 678-689, 2012.

SANTOS, T. R.; NUNES, C. M.; LUVIZOTTO, M. C.; MOURA, A. B.; LOPES, W. D.; COSTA, A. J.; BRESCIANI, K. D. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples from public schools. **Veterinary Parasitology**, v. 171, p. 53-57, 2010.

SCHARES, G.; PANTCHEV, N.; BARUTZKI, D.; HEYDORN, A. O.; BAUER, C.; CONRATHS, F. J. Oocysts of *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni*, *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* in faeces collected from dogs in Germany. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 35, n. 14, p. 1525-1537, 2005.

SENSINI, A. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy: opportunities and pitfalls of serological diagnosis. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 12, n. 6, p. 504-512, 2006.

SHARMA, P.; CHITNIS, C. E. Key molecular events during host cell invasion by Apicomplexan pathogens. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 432-437, 2013.

SIBLEY, L. D. Intracellular parasite invasion strategies. **Science**, Washington DC, v. 304, n. 5668, p. 248-253, 2004.

_____. How apicomplexan parasites move in and out of cells. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, n. 5, p. 592-598, 2010.

_____. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. **Immunological Reviews**, v. 240, p. 72-91, 2011.

SOUZA, W.; MARTINS-DUARTE, E. S.; LEMGRUBER, L.; ATTIAS, M.; VOMMARO, R. C. Organização estrutural do taquizoítio de *Toxoplasma gondii*. **Scientia Medica**, Porto Alegre, v. 20, n. 1, p. 131-143, 2010.

SPEER, C. A.; DUBEY, J. P.; McALLISTER, M. M.; BLIXT, J. A. Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 29, n. 10, p. 1509-1519, 1999.

SPLENDORE, A. Un nuovo protozoa parasita dei conigh. Incontrato nelle lesioni Anatomiche d'una malattia che Ricorda in molti punti il kala-azar dell'uomo. **Revista da Sociedade de Ciências de São Paulo**, São Paulo, v. 3, p. 109-112, 1908.

STONE, W. B.; MANWELL, R. D. Toxoplasmosis in cold-blooded hosts. **The Journal of Protozoology**, New York, v. 16, n. 1, p. 99-102, 1969.

STURGE, C. R.; YAROVINSKY, F. Complex immune cell interplay in the gamma interferon response during *Toxoplasma gondii* infection. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 8, p. 3090-3097, 2014.

SUKTHANA, Y. Toxoplasmosis: beyond animals to humans. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 22, n. 3, p. 137-142, 2006.

SULLIVAN Jr., W. J.; JEFFERS, V. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 3, p. 717-733, 2012.

SWITAJ, K.; MASTER, A.; SKRZYPCZAK, M.; ZABOROWSKI, P. Recent trends in molecular diagnostics for *Toxoplasma gondii* infections. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 11, n. 3, p. 170-176, 2005.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805-820, 2010.

TEKKESIN, N. Diagnosis of toxoplasmosis in pregnancy: a review. **HOAJ Biology**, v. 1, p. 1-8, 2012.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 30, n. 12-13, p. 1217-1258, 2000.

TORREY, E. F.; YOLKEN, R. H. *Toxoplasma* oocysts as a public health problem. **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 8, p. 380-384, 2013.

TREES, A. J.; WILLIAMS, D. J. L. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 21, n. 12, p. 558-561, 2005.

TRIDAPALLI, E.; CAPRETTI, M. G.; FARNETI, G.; MARANGONI, A.; CEVENINI, R.; FALDELLA, G. Congenital toxoplasmosis: the importance of the Western blot method to avoid unnecessary therapy in potentially infected newborns. **Acta Paediatrica**, v. 97, n. 9, p. 1298-1300, 2008.

TYLER, J. S.; TREECK, M.; BOOTHROYD, J. C. Focus on the ringleader: the role of AMA1 in apicomplexan invasion and replication. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 9, p. 410-420, 2011.

UDONSOM, R.; BUDDHIRONGAWATR, R.; SUKTHANA, Y. Is Sabin-Feldman dye test using *T. gondii* tachyzoites from animal inoculation still the best method for detecting *Toxoplasma gondii* antibodies? **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 41, n. 5, p. 1059-1064, 2010.

VALDÈS, V.; LEGAGNEUR, H.; WATRIN, V.; PARIS, L.; HASCOËT, J. M. Congenital toxoplasmosis due to maternal reinfection during pregnancy. **Archives de Pédiatrie**, v. 18, n. 7, p. 761-763, 2011.

VILLARD, O.; BREIT, L.; CIMON, B.; FRANCK, J.; FRICKER-HIDALGO, H.; GODINEAU, N.; HOUZE, S.; PARIS, L.; PELLOUX, H.; VILLENA, I.; CANDOLFI, E. Comparison of four commercially available avidity tests for *Toxoplasma gondii*-specific IgG antibodies. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 20, n. 2, p. 197-204, 2013.

VOLLER, A.; BIDWELL, D. E.; BARTLETT, A.; FLECK, D. G.; PERKINS, M.; OLADEHIN, B. A microplate enzyme-immunoassay for *Toxoplasma* antibody. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 29, n. 2, p. 150-153, 1976.

YAROVINSKY, F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 2, p. 109-121, 2014.

WALKER, D. M.; OGHUMU, S.; GUPTA, G.; McGWIRE, B. S.; DREW, M. E.; SATOSKAR, A. R. Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. **CMLS: Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 7, p. 1245-1263, 2014.

WALLON, M.; FRANCK, J.; THULLIEZ, P.; HUISSOUD, C.; PEYRON, F.; GARCIA-MERIC, P.; KIEFFER, F. Accuracy of real-time polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid. **Obstetrics and Gynecology**, v. 115, n. 4, p. 727-733, 2010.

WITOLA, W. H.; MUI, E.; HARGRAVE, A.; LIU, S.; HYPOLITE, M.; MONTPETIT, A.; CAVAILLES, P.; BISANZ, C.; CESBRON-DELAUW, M. F.; FOURNIÉ, G. J.; McLEOD, R. NALP1 influences susceptibility to human congenital toxoplasmosis, proinflammatory cytokine response, and fate of *Toxoplasma gondii*-infected monocytic cells. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 2, p. 756-766, 2011.

ZHANG, M.; YANG, Z.; WANG, S.; TAO, L.; XU, L.; YAN, R.; SONG, X.; LI, X. Detection of *Toxoplasma gondii* in shellfish and fish in parts of China. **Veterinary Parasitology**, v. 200, n. 1-2, p. 85-89, 2014.

ZHOU, P.; NIE, H.; ZHANG, L. X.; WANG, H. Y.; YIN, C. C.; SU, C.; ZHU, X. Q.; ZHAO, J. L. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs in China. **The Journal of Parasitology**, v. 96, n. 5, p. 1027-1029, 2010.

CAPÍTULO II

*Triagem sorológica pré-natal e neonatal para toxoplasmose:
relevância na identificação de gestantes com infecção primária e
recém-nascidos com toxoplasmose congênita e consequente
indicação de tratamento*

RESUMO

A toxoplasmose congênita corresponde a uma das manifestações mais graves da infecção por *Toxoplasma gondii* em humanos, podendo causar abortos ou perdas fetais, além de sequelas graves em recém-nascidos (RNs), principalmente oculares e/ou cerebrais. A triagem sorológica de gestantes e RNs, baseada principalmente na detecção de anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii* constitui-se em importante medida a ser adotada em programas de controle desta infecção, apesar das limitações na detecção dos anticorpos e na interpretação dos resultados. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo a avaliação dos anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* em amostras pareadas de soros de mães com suspeita de toxoplasmose primária na gestação e seus respectivos RNs, correlacionando estes resultados com dados clínicos dos pacientes. Um total de 173 pares de amostras de soros de mães e RNs provenientes do Setor de Pediatria e Neonatologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU) no período de 2006 a junho de 2014 foi analisado por ELISA indireto para detecção de IgG anti-*T. gondii* e por ELISA captura para detecção de IgM e IgA anti-*T. gondii*, enquanto dados clínicos foram obtidos a partir de pesquisa nos prontuários clínicos de cada paciente. Todas as amostras de mães e RNs (100%) foram positivas para IgG, com forte correlação positiva entre elas, enquanto 83,8% das mães e 17,1% dos RNs foram positivos para IgM, com moderada correlação positiva e a grande maioria das amostras (68,2%) com resultado positivo para IgM apenas no soro materno. Já para IgA, 24,3% das mães e 13,7% dos RNs foram positivos, com moderada correlação positiva entre elas e a grande maioria dos pares de amostras (72,2%) apresentando resultado duplo-negativo. Quando analisadas as correlações entre os níveis dos três isotipos de anticorpos nas amostras maternas e dos RNs, houve correlação significativa apenas entre os níveis de IgM e IgA para ambas as amostras, com maior correlação entre estes anticorpos nas amostras dos RNs, quando comparadas às amostras maternas. Das 173 amostras maternas testadas, 146 (84,4%) foram IgM⁺ e/ou IgA⁺, sendo 108 (74,0%) amostras de mães tratadas com drogas anti-*T. gondii* e 38 (26,0%) de mães não tratadas durante a gestação. Destas 146 mães, nasceram 32 RNs com sorologia sugestiva de toxoplasmose congênita (IgM⁺ e/ou IgA⁺), sendo 13 de mães tratadas e 19 de mães não tratadas. A análise de dados clínicos e de acompanhamento destes 32 RNs permitiu confirmar a ocorrência de toxoplasmose congênita em 22 deles (5 de mães tratadas e 17 de mães não tratadas), dos quais 18 apresentaram alterações oculares (4 de mães tratadas e 14 de mães não tratadas), 13 apresentaram alterações cerebrais (4 de mães tratadas e 9 de mães não tratadas), 8 apresentaram hepatoesplenomegalia (1 de mãe tratada e 8 de mães não tratadas), 2 apresentaram alterações auditivas (ambos de mães não tratadas), 2 vieram à óbito (1 de mãe tratada e 1 de mãe não tratada) e 3 foram assintomáticos (ambos de mães não tratadas). Deste modo, pode-se concluir que (i) a triagem sorológica pré-natal é de grande relevância na identificação de gestantes expostas à toxoplasmose durante a gestação; (ii) o tratamento materno reduz a transmissão congênita de *T. gondii*; (iii) a triagem sorológica neonatal, aliada à análise de parâmetros clínicos permite identificar recém-nascidos verticalmente infectados, principalmente por meio da detecção conjunta de anticorpos IgM e IgA; e (iv) o acompanhamento sorológico de recém-nascidos é importante no esclarecimento de situações duvidosas, principalmente em casos de recém-nascidos assintomáticos, mas com sorologia sugestiva de infecção congênita.

Palavras-chave: Toxoplasmose congênita. Soros pareados mãe-RN. Triagem sorológica. Tratamento materno.

ABSTRACT

Congenital toxoplasmosis is one of the most serious manifestations of Toxoplasma gondii infection in humans, and may cause abortions or fetal losses, as well as severe ocular and/or cerebral sequelae in newborns. The serological screening of pregnant women and newborns is mainly based on the detection of IgG and IgM antibodies to T. gondii and constitutes an important measure to be adopted in programs to control this infection, despite the limitations in the antibody detection and interpretation of results. In this sense, this study aimed to evaluate levels of IgG, IgM and IgA antibodies to T. gondii in paired serum samples from mothers with suspected primary toxoplasmosis in pregnancy and their respective newborns, correlating these results with clinical data of patients. A total of 173 pairs of serum samples from mothers and newborns from the Department of Pediatrics and Neonatology of Clinical Hospital of Federal University of Uberlândia (HC-UFU) from 2006 to June 2014 were analyzed by indirect ELISA for detection of IgG anti-T. gondii and capture ELISA for detection of IgM and IgA anti-T. gondii, while clinical data were obtained from research in the clinical records of each patient. All samples from mothers and newborns (100%) were positive for IgG, with a strong positive correlation between them, while 83.8% of mothers and 17.1% of newborns were positive for IgM, with moderate positive correlation and the vast majority of samples (68.2%) was positive for IgM only in maternal sera. For IgA, 24.3% of mothers and 13.7% of newborns were positive, with moderate positive correlation between them and the vast majority of pairs of samples (72.2%) with double-negative results. When analyzing the correlations between the levels of the three antibody isotypes in maternal and newborn samples, there was significant correlation only between the levels of IgM and IgA for both samples, with higher correlation between these antibodies in samples from newborns when compared to maternal samples. From 173 mother serum samples tested, 146 (84.4%) were IgM⁺ and/or IgA⁺, being 108 (74.0%) samples from treated mothers with anti-T. gondii drugs and 38 (26.0%) from untreated mothers during pregnancy. From these 146 mothers, 32 newborns were born with serology suggestive of congenital toxoplasmosis (IgM⁺ and/or IgA⁺), being 13 from treated mothers and 19 from untreated mothers. The analysis of clinical data and follow-up of these 32 newborns confirmed the occurrence of congenital toxoplasmosis in 22 of them (5 from treated mothers and 17 from untreated ones), of which 18 had ocular abnormalities (4 from treated mothers and 14 from untreated ones), 13 showed brain changes (4 from treated mothers and 9 from untreated ones), 8 presented with hepatosplenomegaly (1 from treated mother and 8 from untreated ones), two had hearing loss (both from untreated mothers), two came to death (1 from treated mother and 1 from untreated one) and 3 were asymptomatic (both from untreated mothers). So, it can be concluded that (i) prenatal serological screening is very important for the identification of pregnant women exposed to toxoplasmosis during pregnancy; (ii) maternal treatment reduces congenital transmission of T. gondii; (iii) neonatal serologic screening, associated with analysis of clinical parameters, allows the identification of vertically infected newborns, mainly through simultaneous detection of IgM and IgA antibodies; and (iv) serological follow-up of newborns is important in clarifying doubtful situations, especially in cases of asymptomatic newborns that present suggestive serology of congenital infection.

Keywords: Congenital toxoplasmosis. Mother-newborn paired sera. Serological screening. Maternal treatment.

1 INTRODUÇÃO

A toxoplasmose congênita corresponde a uma das manifestações mais graves da infecção por *Toxoplasma gondii* em humanos e ocorre quando formas taquizoítas colonizam a placenta durante a infecção materna e atingem os tecidos fetais (OZ, 2014). O primeiro caso de toxoplasmose congênita em humanos foi descrito em 1938 por Wolf, Cowen e Paige, três patologistas norte-americanos que identificaram *T. gondii* em uma menina nascida por parto cesariano em um hospital de Nova Iorque, e que apresentou crises convulsivas aos 3 dias de idade, além de lesões inflamatórias na mácula de ambos os olhos. Após sua morte, ocorrida com 1 mês de idade, análises histológicas do cérebro, da medula espinhal e do olho direito permitiram a identificação de taquizoítas de *T. gondii* nas lesões inflamatórias, e parasitas viáveis foram isolados em camundongos inoculados com fragmentos destes tecidos (DUBEY, 2008; WOLF; COWEN; PAIGE, 1939).

Tradicionalmente, a transmissão vertical de *T. gondii* é reconhecida quando a mulher adquire a infecção primária pelo parasita durante a gestação, de modo que este infecta os tecidos placentários durante sua fase de disseminação e, conseqüentemente, atinge o feto. Porém, há outras situações em que a transmissão congênita pode ocorrer. A primeira delas se refere à transmissão em mulheres imunocompetentes infectadas alguns meses antes da gestação, de modo que a parasitemia pode persistir durante o início da gestação e resultar em transmissão do parasita (VILLENA et al., 1998; LINDSAY; DUBEY, 2011; McAULEY, 2014). Outra situação de transmissão ocorre em mulheres que apresentam reativação de infecção latente durante a gestação, em função de algum quadro imunossupressor, tais como AIDS ou outras doenças que acometem o sistema imune ou tratamento com drogas imunossupressoras. Nesta situação, há a conversão de bradizoítas em taquizoítas e nova parasitemia, que pode resultar em transmissão para o feto (AZEVEDO et al., 2010; BACHMEYER et al., 2006; CAMPOS et al., 2014). Por fim, outra situação mais recentemente reconhecida ocorre quando a mulher imunocompetente e portadora de infecção latente com um genótipo típico do parasita se infecta durante a gestação com parasita de linhagem distinta, principalmente um genótipo atípico. Nestes casos, como cepas atípicas são muito virulentas, a imunidade estabelecida pela infecção anterior parece não impedir a ocorrência de nova parasitemia, com conseqüente transmissão para o feto (VALDÉS et al., 2011). Casos como estes tem sido documentados principalmente na França, onde cerca de 92% das infecções congênitas são devidas a cepas do tipo II, menos virulentas, nas quais 84% das crianças infectadas são assintomáticas. Porém, quando uma mulher previamente infectada

com uma cepa do tipo II é reinfectada com uma cepa atípica ou recombinante, a transmissão congênita pode ocorrer e cerca de 83% das crianças infectadas com tais cepas são sintomáticas (ELBEZ-RUBINSTEIN et al., 2009; LEBAS et al., 2004).

Em geral, a frequência de transmissão vertical aumenta com a idade gestacional, de modo que a probabilidade de infecção congênita é menor que 10% quando a infecção materna ocorre antes de 12 semanas de gestação, aumentando para 20%, 52% e 70% quando a mãe se infecta entre 12 e 19 semanas, entre 19 e 28 semanas e entre 28 e 39 semanas de gestação, respectivamente (MONTROYA; REMINGTON, 2008; RABILLOUD; WALLON; PEYRON, 2010). Porém, a gravidade da infecção para o feto e/ou recém-nascido é maior quando a transmissão ocorre nos estágios iniciais da gestação, principalmente no primeiro trimestre, já que fetos infectados nas últimas semanas de gestação normalmente nascem assintomáticos, apesar de poderem apresentar alterações relacionadas ao comprometimento do sistema nervoso central e coriorretinite até os 3 anos de idade (WALLON et al., 2013).

Uma das consequências da transmissão congênita de *T. gondii* é a ocorrência de aborto ou a morte fetal intra-útero, principalmente quando a transmissão ocorre no primeiro trimestre de gestação (FLEGR, 2013). Por outro lado, recém-nascidos infectados podem apresentar diversas sequelas, tais como hidrocefalia, microcefalia, calcificações cerebrais, retardamento mental e motor, desordens neurológicas, alterações auditivas, anomalias cardiovasculares, alterações hematológicas, hepatoesplenomegalia, além de sequelas oculares (microftalmia, catarata, estrabismo e lesões na retina), as quais podem levar à cegueira quando atingem a mácula (CARLIER et al., 2012; MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

A incidência de toxoplasmose congênita varia muito entre os diferentes países e mesmo entre diferentes regiões de um mesmo país, com a maioria dos estudos concentrando-se na Europa e nos Estados Unidos. Assim, são relatadas taxas menores do que 1 infectado por 10.000 nascidos vivos em países como Áustria, Noruega, Suécia e Estados Unidos, 1-3 por 10.000 na Dinamarca, Suíça e Reino Unido, e 3-10 por 10.000 na França, Itália, Bélgica e Polônia (CARLIER et al., 2012). No Brasil, a incidência média de infecção congênita é em torno de 6 por 10.000 nascidos vivos, mas com grande variação regional (LAGO et al., 2007). Uma estimativa da distribuição regional da toxoplasmose congênita no Brasil a partir de resultados de triagem sorológica neonatal apontou que os estados do Pará, Rondônia, Mato Grosso, Maranhão e Espírito Santo apresentam maiores incidências (14-20 positivos por 10.000 neonatos testados), enquanto os estados de Mato Grosso do Sul, Rio Grande do Norte, São Paulo e Alagoas apresentam as menores taxas (2-3 positivos por 10.000 neonatos testados) (NETO; AMORIM; LAGO, 2010). Especificamente em Uberlândia (Minas Gerais),

investigação realizada em 805 amostras de sangue de cordão umbilical detectou a ocorrência de toxoplasmose congênita em 0,5% dos recém-nascidos analisados, a partir da pesquisa de anticorpos IgM e/ou IgA específicos (SEGUNDO et al., 2004a, 2004b).

A maior parte dos estudos sobre epidemiologia, diagnóstico e conduta profissional na toxoplasmose congênita ocorre na França, país que apresenta uma das maiores incidências da doença no continente europeu (VILLENA et al., 2010). Em função da elevada prevalência da infecção em gestantes (soroprevalência em torno de 84% das gestantes nos anos de 1960), com consequente incidência elevada de infecção congênita, a França estabeleceu uma política nacional de controle da toxoplasmose no final da década de 1970, com a criação do Centro Nacional de Referência da Toxoplasmose e de um programa de triagem e acompanhamento de gestantes, visando o diagnóstico precoce da infecção materna e, consequentemente, a diminuição das taxas de transmissão vertical e das sequelas dela decorrentes (LINDSAY; DUBEY, 2011; ROBERT-GANGNEUX, 2014). Como resultado deste programa, a soroprevalência entre as gestantes francesas diminuiu para 54% e 44%, de acordo com os dados dos inquéritos sorológicos nacionais realizados em 1995 e 2003, respectivamente (BERGER; LE STRAT; DESENCLOS, 2008; VILLENA et al., 2010).

As bases fundamentais da política nacional francesa de controle da toxoplasmose congênita abrangem os seguintes objetivos: (1) detecção e acompanhamento sorológico de gestantes soronegativas (não imunizadas), com início precoce, logo no início da gestação; (2) acompanhamento e aconselhamento das gestantes soronegativas, visando minimizar os riscos de exposição e aquisição de infecção durante a gestação; (3) detecção precoce da infecção primária entre as gestantes, com início imediato de tratamento para prevenir a transmissão ao feto ou limitar a gravidade da infecção congênita, caso a transmissão ocorra; (4) monitoramento mensal por ultrassonografia das gestantes com soroconversão na gestação para avaliar sinais de possível acometimento fetal; (5) adequação do tratamento para gestantes com transmissão fetal comprovada durante a gestação; (6) avaliação clínica, sorológica e radiológica dos recém-nascidos, com início imediato de tratamento quando a infecção for comprovada; e (7) acompanhamento clínico, sorológico e radiológico das crianças e neonatos com ou sem infecção congênita, cujas mães apresentaram soroconversão durante a gestação (STERKERS et al., 2010; VILLENA et al., 2010).

No Brasil, a triagem sorológica de gestantes e recém-nascidos é sugerida como política pública não obrigatória, em função da elevada prevalência da toxoplasmose materna (superior a 40%), sendo oferecida gratuitamente em algumas regiões, mas sem uma uniformização das ações e procedimentos, com cada estado e/ou cidade seguindo protocolos

próprios. Programas de triagem sorológica de gestantes podem ser verificados nos estados do Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo e Goiás e nas cidades de Curitiba, no Paraná, e Porto Alegre, no Rio Grande do Sul (CARELLOS; ANDRADE; AGUIAR, 2008; LOPES-MORI et al., 2011).

A triagem sorológica de gestantes corresponde ao primeiro passo em um programa de controle da toxoplasmose congênita, pois visa determinar o *status* sorológico materno anti-*T. gondii* durante a gestação e avaliar a possibilidade de infecção materna primária e o consequente risco de transmissão congênita, direcionando a conduta do profissional obstétrico durante a gestação. Além disso, a triagem sorológica de recém-nascidos é indicada em casos de suspeita de infecção materna durante a gestação, servindo de base para a determinação da ocorrência de transmissão congênita e para o direcionamento da conduta do médico pediatra quanto à infecção por *T. gondii* (MONTROYA; REMINGTON, 2008).

Basicamente, a triagem sorológica de gestantes e recém-nascidos é feita pela detecção de anticorpos IgG e IgM específicos, principalmente IgM, que se configura como um marcador sorológico de fase aguda. Porém, a avaliação da ocorrência de infecção materna primária e de infecção congênita por *T. gondii* a partir da detecção destes dois isotipos de anticorpos apresenta suas limitações (CARLIER et al., 2012; TEKESIN, 2012).

Em gestantes, a presença de anticorpos IgG e ausência de anticorpos IgM específicos indica exposição anterior ao parasita, sem risco ou com risco mínimo de transmissão congênita, enquanto a ausência dos dois isotipos de anticorpos significa ausência de exposição prévia e indica susceptibilidade à infecção durante a gestação, de modo que a gestante deve ser aconselhada quanto à adoção de medidas preventivas para se evitar a infecção. Por outro lado, um resultado positivo de IgM deve ser interpretado com cautela, pois pode indicar infecção recente pelo parasita, com risco elevado de transmissão congênita, devendo a gestante ser tratada e monitorada durante a gestação quanto aos sinais de acometimento fetal. No entanto, dependendo da técnica sorológica utilizada na detecção destes anticorpos, resultados falso-positivos podem ocorrer, além do sério problema da persistência prolongada de IgM (IgM residual ou "arraste" de IgM) em alguns pacientes, que podem apresentar sorologia positiva para este anticorpo por mais de 1 ano após a infecção (MONTROYA; REMINGTON, 2008; OZ, 2014; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

Em recém-nascidos, a detecção de IgG específica não tem valor significativo no diagnóstico da toxoplasmose congênita, pois este isotipo de anticorpo é transferido da mãe para o filho através da placenta, de modo que a simples detecção destes anticorpos circulantes no recém-nascido não permite distinguir entre IgG de origem materna e IgG própria. Portanto,

a detecção de IgM específica, que não tem passagem placentária, corresponde à maior indicação de infecção congênita, porém considerando as limitações das técnicas de detecção, outras ferramentas devem ser incluídas, tais como o acompanhamento clínico e sorológico da criança (MONTTOYA; REMINGTON, 2008; ROBERT-GANGNEUX, 2014).

Neste sentido, considerando a importância das análises sorológicas no diagnóstico da infecção primária por *T. gondii* em gestantes e da infecção congênita em recém-nascidos, este trabalho teve como objetivo avaliar os níveis de anticorpos dos isotipos IgG, IgM e IgA em amostras de soros pareadas de mães e recém-nascidos com suspeita de exposição à infecção primária por *T. gondii* durante a gestação, correlacionando estes resultados com dados clínicos dos pacientes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Pacientes e amostras de soro

O presente estudo incluiu um total de 173 amostras pareadas de soros de mães e recém-nascidos (RN) provenientes do Banco de Amostras Biológicas do Laboratório de Imunoparasitologia da Universidade Federal de Uberlândia (LIP-UFU), cuja implantação e utilização foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da Universidade Federal de Uberlândia (CEP-UFU), mediante o parecer nº 041/2008, de 29 de fevereiro de 2008, em obediência às Resoluções nº CNS 347/05 e CNS 196/96 do Ministério da Saúde.

Estas amostras foram provenientes do Setor de Pediatria e Neonatologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU) e remetidas ao LIP-UFU desde 2005, em função de um projeto estabelecido entre este laboratório e o referido setor do HC-UFU. Por este projeto, amostras pareadas de soros de mães e recém-nascidos atendidos no HC-UFU, com suspeita de infecção materna primária por *T. gondii* durante a gestação ou suspeita de toxoplasmose congênita no recém-nascido, eram remetidas ao LIP para a detecção de anticorpos IgM e IgA específicos, especialmente a detecção de IgA, já que o teste sorológico para este isotipo de anticorpo não é realizado na rotina do Laboratório de Análises Clínicas do HC-UFU. Uma vez realizados tais testes, estas amostras pareadas eram identificadas e estocadas a -20°C no LIP e sua posterior utilização em protocolos experimentais foi autorizada pelo CEP-UFU, conforme o parecer supracitado.

Para este estudo foram incluídas apenas as amostras pareadas de soros de mães e recém-nascidos coletadas de 2006 a Junho de 2014, cujos prontuários clínicos puderam ser localizados no Setor de Arquivo do HC-UFU, perfazendo um total de 173 amostras de mães, com idade média de 24,6 anos (14 a 41 anos) e 175 amostras de RN, com idades variando de 1 a 8 dias, exceto para 11 casos, com idade superior (entre 1 e 3 meses). A diferença entre o número de mães e recém-nascidos se deve à existência de dois casos de parto gemelar.

2.2 Manutenção e obtenção de parasitas

Formas taquizoítas da cepa RH de *T. gondii* foram mantidas por meio de inoculação intraperitoneal em camundongos Swiss ou BALB/c, por meio de passagens seriadas em intervalos de 48-72 horas de um inóculo de aproximadamente 1×10^6 taquizoítas obtidos do

exsudato peritoneal de camundongos previamente infectados (MINEO; CAMARGO; FERREIRA, 1980). Os exsudatos peritoneais foram obtidos por meio de lavagem da cavidade abdominal do animal com solução salina estéril tamponada com fosfatos a 0,01 M (PBS, pH 7,2) e, em seguida, as suspensões parasitárias foram submetidas a uma centrifugação rápida (45 x g, 1 minuto, 4°C) para remover debris celulares do hospedeiro. O sobrenadante foi coletado e lavado por duas vezes (720 x g, 10 minutos, 4°C) com PBS e, quando necessário, para a remoção de hemácias, os parasitas foram tratados com solução tampão de lise (NH₄Cl 14 mM e TRIS-HCl 17 mM, pH 7,2) por 1 minuto à temperatura ambiente. O sedimento final da suspensão parasitária foi ressuspendido em 10 mL de PBS e os parasitas contados em câmara hemocitométrica. Após nova lavagem com PBS, o sedimento foi armazenado a -20°C para posterior preparação de antígenos solúveis de *T. gondii*.

2.3 Preparação de antígeno solúvel de *T. gondii*

Antígeno solúvel de taquizoítas de *T. gondii* (STAg) foi preparado como descrito por Carvalho e colaboradores (2008), com algumas modificações. Suspensões parasitárias (1 x 10⁸ taquizoítas/mL) foram tratadas com coquetel de inibidores de proteases (*Complete ULTRA Tablets, Mini, EASYpack, Roche Applied Science*, Penzberg, Bavaria, Alemanha) e então submetidas a dez ciclos rápidos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C, seguido por dois ciclos de ultrassom a 60 Hz, em banho de gelo, em sonicador (*Sonopuls mini20 Ultrasonic Homogenizer, Bandelin Electronic GmbH & Co.*, Berlim, Alemanha), sendo cada ciclo com duração de 5 minutos, com pulsos de 30 segundos e intervalo de 10 segundos entre eles. Após centrifugação (10.000 x g, 30 minutos, 4°C), o sobrenadante foi coletado, a concentração proteica foi determinada pelo método de Bradford (1976) e o perfil antigênico da preparação foi analisado em eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Alíquotas dos antígenos foram armazenadas a -20°C até a utilização.

2.4 Ensaios imunoenzimáticos (ELISA)

Ensaios imunoenzimáticos (ELISA) foram realizados com as amostras pareadas de soros de mães e recém-nascidos para detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii*, de acordo com os protocolos específicos para a detecção de cada isotipo, conforme descrito a seguir. Todos os ensaios sorológicos foram realizados nas dependências do LIP-UFU.

2.4.1 ELISA indireto

ELISA indireto foi realizado para a detecção de anticorpos IgG específicos a *T. gondii*, conforme descrito previamente (CARVALHO et al., 2008; MINEO; CAMARGO; FERREIRA, 1980), com algumas modificações.

Placas de microtitulação de poliestireno de alta afinidade (*Corning Laboratories Inc.*, New York, NY, EUA) foram sensibilizadas por 18 horas a 4°C com STAg (10 µg/mL) diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M (pH 9,6). Após a incubação, as placas foram lavadas três vezes com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T) e bloqueadas com PBS-T contendo 5% de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé, São Paulo, SP) (PBS-TM) por 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagem por três vezes com PBS-T, as placas foram incubadas durante 1 hora a 37°C com amostras de soro de mães e recém-nascidos diluídas na razão 1:64 em PBS-TM. Após seis lavagens com PBS-T, as placas foram incubadas por 1 hora a 37°C com anticorpos de cabra anti-IgG humana conjugados com peroxidase (*Sigma-Aldrich Chemical Co.*, St. Louis, MO, EUA) diluídos na razão 1:2000. Após nova lavagem por seis vezes com PBS-T, a reação foi revelada pela adição das soluções A e B (v/v) de solução reveladora comercial contendo substrato enzimático H₂O₂ e o cromógeno 2,2'-azino-bis-3-etil-benzotiazolina ácido sulfônico (ABTS) (*ABTS Peroxidase Substrate System*; KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, Maryland, EUA).

A densidade óptica (DO) foi determinada a 405 nm em leitora de microplacas (*Titertek Multiskan Plus spectrophotometer*, Flow Laboratories, McLean, EUA). Soros controles positivos e negativos foram incluídos em cada placa. O limite de positividade (*cut off*) da reação foi determinado pela média da DO dos soros controles negativos acrescida de 3 desvios padrões. Os resultados foram expressos em índices de reatividade ELISA (IE), de acordo com a fórmula: $IE = DO \text{ amostra} / DO \text{ cut off}$, sendo que valores de $IE > 1,2$ foram considerados positivos, para a exclusão de valores de reatividade próximos a $IE = 1,0$.

2.4.2 ELISA de captura IgM e IgA

ELISA de captura foi realizado para a detecção de anticorpos IgM e IgA específicos a *T. gondii*, de acordo com protocolo anteriormente descrito (CARVALHO et al., 2008; MINEO et al., 1986), com algumas modificações.

Microplacas de poliestireno (*Corning Laboratories Inc.*, New York, NY, EUA) foram sensibilizadas durante 18 horas a 4°C com anticorpos de captura anti-IgM humana ou anti-

IgA humana (*Sigma-Aldrich Chemical Co.*, St. Louis, MO, EUA) diluídos, respectivamente, nas razões 1:200 e 1:100 em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M (pH 9,6). As placas foram lavadas três vezes com PBS-T e bloqueadas com PBS-TM por 1 hora à temperatura ambiente. Após novas lavagens com PBS-T, as placas foram incubadas por 2 horas a 37°C com as amostras de soro de mães e recém-nascidos diluídas na razão 1:16 em PBS-TM. Após novas lavagens (6 vezes) em PBS-T, as placas foram incubadas com STAg (100 µg/mL) em PBS-TM por 2 horas a 37°C. Após lavagem (6 vezes) em PBS-T, o antígeno ligado foi detectado pela adição de anticorpos IgG de coelho anti-*T. gondii* conjugados com peroxidase (preparado segundo protocolo descrito por Wilson e Nakane, 1978) diluído 1:500 em PBS-TM, seguindo incubação por 1 hora a 37°C. As etapas de revelação, leitura e expressão dos índices de reatividade ELISA foram realizadas conforme descrito para ELISA indireto (seção 2.4.1).

2.5 Análises de prontuários clínicos

Com o objetivo de se obter informações demográficas e clínicas das 173 mães e dos 175 recém-nascidos, que tiveram suas amostras de soro utilizadas neste estudo, análises de seus prontuários clínicos foram realizadas no Setor de Arquivo Médico do HC-UFU, mediante autorização do responsável pelo setor.

Nos prontuários clínicos correspondentes às mães foram pesquisadas as seguintes informações principais: (1) idade materna na ocasião do respectivo parto e da coleta da amostra de soro remetida ao LIP; (2) trimestre gestacional de diagnóstico da toxoplasmose; (3) ocorrência de tratamento para toxoplasmose durante a gestação; (4) resultados de exames sorológicos e de PCR (reação em cadeia da polimerase) em líquido amniótico durante a gestação; (5) ocorrência de sintomas maternos relacionados à toxoplasmose e relatados durante a gestação; (6) ocorrência de alterações fetais ou outras alterações relacionadas à toxoplasmose evidenciadas em exames de ultrassonografia fetal; (7) ocorrência de outras doenças ou alterações maternas durante a gestação; e (8) outras informações relevantes relacionadas à toxoplasmose.

Nos prontuários clínicos correspondentes aos recém-nascidos foram pesquisadas as seguintes informações principais: (1) idade do recém-nascido na ocasião da coleta da amostra de soro remetida ao LIP; (2) trimestre gestacional de diagnóstico da toxoplasmose materna; (3) ocorrência de tratamento materno para toxoplasmose durante a gestação; (4) realização e resultado de PCR em líquido amniótico durante a gestação; (5) realização e resultados de exames de fundo de olho (fundoscopia) para avaliação de alterações oculares; (6) realização e

resultados de exames de raio X de crânio ou de ultrassonografia de crânio ou outros exames para avaliação de alterações cerebrais; (7) realização e resultados de exames auditivos para avaliação de alterações auditivas; (8) ocorrência de outras alterações e/ou sinais do recém-nascido relacionados à toxoplasmose congênita; (9) realização e resultados de exames sorológicos do recém-nascido logo após o nascimento e durante acompanhamento sorológico posterior; (10) ocorrência de tratamento do recém-nascido para toxoplasmose; (11) outras doenças ou alterações do recém-nascido; e (12) outras informações relevantes relacionadas à toxoplasmose.

2.6 Análises estatísticas

Análise estatística e construção de gráficos foram realizadas no programa computacional *GraphPad Prism* versão 5.0 (*GraphPad Software, Inc.*, San Diego, EUA).

Inicialmente, os dados dos resultados dos ensaios imunoenzimáticos foram analisados pelos testes de normalidade (*Kolmogorov-Smirnov test*, *Shapiro-Wilk normality test* e *D'Agostino & Pearson omnibus normality test*). Como os dados não seguiram uma distribuição normal, as diferenças entre as medianas dos níveis de anticorpos IgG, IgM e IgA nas amostras de soro de mães e recém-nascidos foram analisadas pelo teste não paramétrico pareado de Wilcoxon, enquanto as diferenças entre as porcentagens de positivos de mães e recém-nascidos para cada isotipo de anticorpo foram determinadas pelo teste exato de Fischer.

As correlações entre os níveis de anticorpos IgG, IgM e IgA específicos a *T. gondii* nas amostras de soros de mães e recém-nascidos foram analisadas pelo teste de correlação de Spearman. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* em amostras pareadas de soros de mães e recém-nascidos

Foram testadas 173 amostras pareadas de soros de mães e recém-nascidos (RNs) remetidas ao LIP pelo Setor de Pediatria e Neonatologia do HC-UFU de 2006 a junho de 2014, totalizando 173 amostras de mães e 175 amostras de RNs, uma vez que havia dois casos de parto gemelar entre os pares de amostras analisadas. A Tabela 1 apresenta a distribuição por ano das amostras incluídas neste estudo, bem como a idade materna e resultados sorológicos para toxoplasmose em cada período.

Tabela 1 - Características demográficas e sorológicas de amostras pareadas de mães com suspeita de toxoplasmose primária adquirida durante a gestação e seus respectivos recém-nascidos (RN), provenientes do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU) durante o período de 2006 a 2014.

Ano	Nº amostras pareadas (Mãe/RN)	Idade materna ^a (anos)	Soropositividade para <i>Toxoplasma gondii</i> – Mãe ^b n (%) ^c			Soropositividade para <i>Toxoplasma gondii</i> – RN ^b n (%) ^c		
			IgG	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA
2006	12	28,3 ± 8,3	12 (100)	8 (66,7)	3 (25,0)	12 (100)	4 (33,3)	5 (41,7)
2007	23	24,7 ± 7,9	23 (100)	15 (65,2)	9 (39,1)	23 (100)	7 (30,4)	6 (26,1)
2008	15	22,8 ± 5,3	15 (100)	15 (100)	1 (6,7)	15 (100)	2 (13,3)	1 (6,7)
2009	25/26 ^c	23,4 ± 5,4	25 (100)	24 (96,0)	6 (24,0)	26 (100)	0 (0)	1 (4,0)
2010	21/22 ^c	24,0 ± 5,7	21 (100)	14 (66,7)	2 (9,5)	22 (100)	1 (4,8)	1 (4,8)
2011	25	25,7 ± 6,9	25 (100)	21 (84,0)	3 (12,0)	25 (100)	4 (16,0)	1 (4,0)
2012	13	23,3 ± 3,8	13 (100)	13 (100)	4 (30,8)	13 (100)	3 (23,1)	4 (30,8)
2013	25	21,5 ± 3,5	25 (100)	23 (92,0)	10 (40,0)	25 (100)	5 (20,0)	3 (12,0)
2014 ^d	14	28,1 ± 7,1	14 (100)	12 (85,7)	4 (28,6)	14 (100)	4 (28,6)	2 (14,3)
Total	173/175	24,6 ± 2,3	173 (100)	145 (83,8)	42 (24,3)	175 (100)	30 (17,1)	24 (13,7)

^a Idade da mãe na data do parto (média ± desvio padrão);

^b Soropositividade para *Toxoplasma gondii* determinada por ELISA indireto para anticorpos IgG e ELISA captura para anticorpos IgM e IgA;

^c Divergência entre o número de mães e recém-nascidos devido à ocorrência de partos gemelares;

^d Coleta de amostras e análise de prontuários finalizadas no mês de junho de 2014.

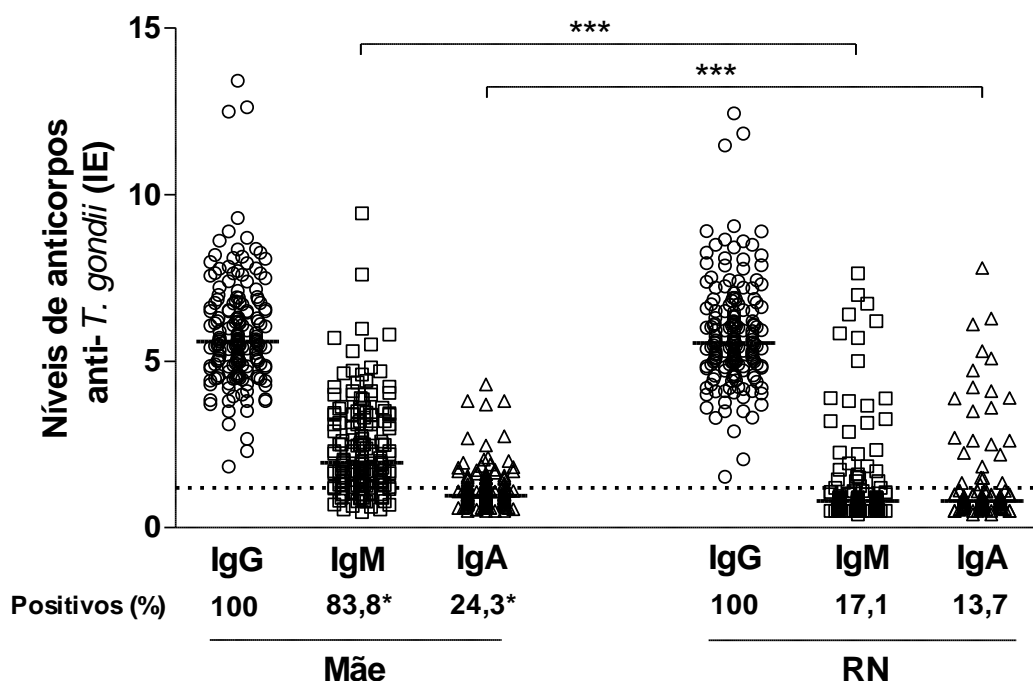


Figura 1 - Níveis de anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*Toxoplasma gondii* em 173 amostras pareadas de soros de mães com suspeita de toxoplasmose primária adquirida durante a gestação e seus respectivos recém-nascidos (RN), provenientes do HC-UFU durante o período de 2006 a 2014. Os resultados são expressos em Índice ELISA (IE) e as barras horizontais indicam a mediana. A linha pontilhada indica o limite de positividade das reações (IE > 1,2) e as porcentagens de amostras positivas são também indicadas. Diferenças estatisticamente significativas entre níveis de anticorpos de mães e RNs foram determinadas pelo teste de Wilcoxon (***) $p < 0,0001$). Diferenças estatisticamente significativas entre porcentagens de positivos de mães e RNs para cada isotipo de anticorpo foram determinadas pelo teste exato de Fischer (*) $p < 0,05$).

Os níveis de anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* presentes nas amostras de mães e RNs são apresentados na Figura 1, que apresenta os resultados das amostras analisadas em todo o período.

Com relação à detecção de anticorpos IgG, observa-se que todas as amostras de soros de mães e RNs foram positivas para este isotipo e não houve diferença entre as medianas dos níveis determinados nas amostras provenientes de mães (IE = 5,50) e de RNs (IE = 5,54) (Figura 1).

É importante destacar que todas as amostras pareadas de soros de mães e RNs remetidas ao LIP pelo Setor de Pediatria e Neonatologia do HC-UFU e analisadas no presente estudo correspondem a mães que apresentaram sorologia sugestiva de soroconversão durante ou imediatamente antes da gestação, ou a RNs com alterações clínicas ao nascimento sugestivas de toxoplasmose congênita. Assim, todas estas amostras tiveram seu *status* sorológico para *T.*

gondii previamente avaliado por exames realizados no Laboratório de Análises Clínicas do HC-UFU, utilizando-se *kits* comerciais para a detecção de anticorpos IgG e IgM específicos. Neste sentido, todas as amostras maternas remetidas apresentaram resultados positivos para anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii*, de acordo com os testes sorológicos realizados no HC-UFU.

Tal fato justifica a soropositividade de 100% observada para anticorpos IgG nas amostras maternas quando analisadas pelo ELISA indireto pelo LIP. Historicamente, os testes sorológicos para detecção de anticorpos IgG apresentam alta sensibilidade e especificidade, além de excelente reprodutibilidade, o que reduz as divergências de resultados entre diferentes técnicas ou laboratórios (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Por outro lado, a soropositividade de 100% para IgG nas amostras dos RNs e a ausência de diferenças entre os níveis destes anticorpos nas amostras de mães e RNs é um resultado esperado, uma vez que anticorpos IgG são transferidos da mãe para o feto via placenta, de modo que os níveis destes anticorpos no soro do recém-nascido são muito similares aos níveis maternos (PALMEIRA et al., 2012). Assim, a maior parte dos anticorpos IgG presentes no soro do RN são de origem materna, principalmente no caso dos RNs deste estudo, que, em sua maioria, tinham idade entre 1 e 8 dias.

Com relação aos anticorpos IgM, 83,8% ($n = 145$) das amostras maternas foram positivas para este isotipo, sendo significativamente maior que a soropositividade observada para as amostras de RNs, em que apenas 17,1% ($n = 30$) foram positivas para IgM ($p < 0,0001$). Além disso, as medianas dos níveis destes anticorpos presentes nas amostras das mães ($IE = 1,95$) foram significativamente maiores que aquelas determinadas para as amostras dos respectivos RNs ($IE = 0,80$) ($p < 0,0001$) (Figura 1).

A soropositividade inferior para IgM nos soros das mães, em relação à soropositividade de 100% determinada pelos testes sorológicos do HC-UFU pode ter ocorrido em função de dois fatores: (1) a sorologia positiva pelos testes do HC-UFU pode ter sido obtida durante a gestação e, no momento da coleta da amostra remetida ao LIP (logo após o parto), os níveis maternos de IgM já poderiam ter diminuído até níveis indetectáveis pelos testes sorológicos, principalmente no caso de mães com infecção diagnosticada no 1º trimestre de gestação (MONTROYA; REMINGTON, 2008; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012); ou (2) os testes para detecção de IgM utilizados no HC-UFU podem apresentar resultados falso-positivos, já que testes rotineiramente utilizados na detecção deste isotipo costumam apresentar problemas de sensibilidade e especificidade (MARANGONI et al., 2014; REMINGTON; THULLIEZ; MONTROYA, 2004).

Como anticorpos IgM normalmente não são transferidos pela placenta, a detecção de IgM anti-*T. gondii* no soro do RN indica síntese própria deste isotipo e é sugestiva de infecção congênita pelo parasita (LAGO; OLIVEIRA; BENDER, 2014). Isto explica a menor soropositividade, bem como os menores níveis destes anticorpos detectados nas amostras de RNs em relação às amostras maternas.

Com relação aos anticorpos IgA, apenas 24,3% (n = 42) das amostras maternas foram positivas para este isotipo, o que foi significativamente maior que a soropositividade observada entre as amostras de RNs, em que apenas 13,7% (n = 24) foram positivas para este isotipo (p = 0,0138). Além disso, as medianas dos níveis destes anticorpos presentes nas amostras das mães (IE = 0,96) foram significativamente maiores que os níveis determinados para as amostras dos respectivos RNs (IE = 0,80) (p < 0,0001) (Figura 1).

A baixa soropositividade observada para IgA nas amostras maternas também pode refletir o tempo de infecção, pois anticorpos deste isotipo são sintetizados nas fases mais precoces da infecção por *T. gondii*, apresentando declínio significativo 3 a 4 meses após a infecção, quando podem se tornar indetectáveis (NASCIMENTO; SUZUKI; ROSSI, 2008). Assim, mães que se infectaram no primeiro trimestre de gestação podem não apresentar níveis significativos de IgA específica após o parto, em função do tempo maior de infecção. Este fato se justifica pela análise de que, das 42 mães IgA-positivas, 17 (40,5%) delas foram diagnosticadas com toxoplasmose primária no 3º trimestre de gestação e apresentaram os maiores valores de índice ELISA para este isotipo após o parto. Por outro lado, 12 (28,6%) delas não foram diagnosticadas durante a gestação, não sendo possível avaliar o tempo de infecção no momento do parto. Apenas 7 mães (16,7%) IgA-positivas tiveram diagnóstico de soroconversão no 1º trimestre de gestação e a maioria delas apresentou baixos valores de índice ELISA para este isotipo após o parto, o que pode significar persistência de níveis residuais destes anticorpos por maiores períodos de tempo (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

Anticorpos IgA também não atravessam a placenta, de modo que sua detecção no soro de recém-nascidos reflete síntese própria e, portanto, é indicativo da ocorrência de infecção congênita (NASCIMENTO; SUZUKI; ROSSI, 2008; PALMEIRA et al., 2012). Isso explica a menor soropositividade destes anticorpos nas amostras de RNs (13,7%), quando comparada às amostras maternas.

3.2 Correlação dos níveis de anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* entre as amostras de soros de mães e recém-nascidos

Correlações entre os níveis de anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* presentes nas amostras pareadas de soros de mães e RNs foram realizadas, comparando-se os níveis de cada isotipo entre as amostras de mães e RNs, bem como as positivities duplas ou únicas para cada isotipo (Figura 2).

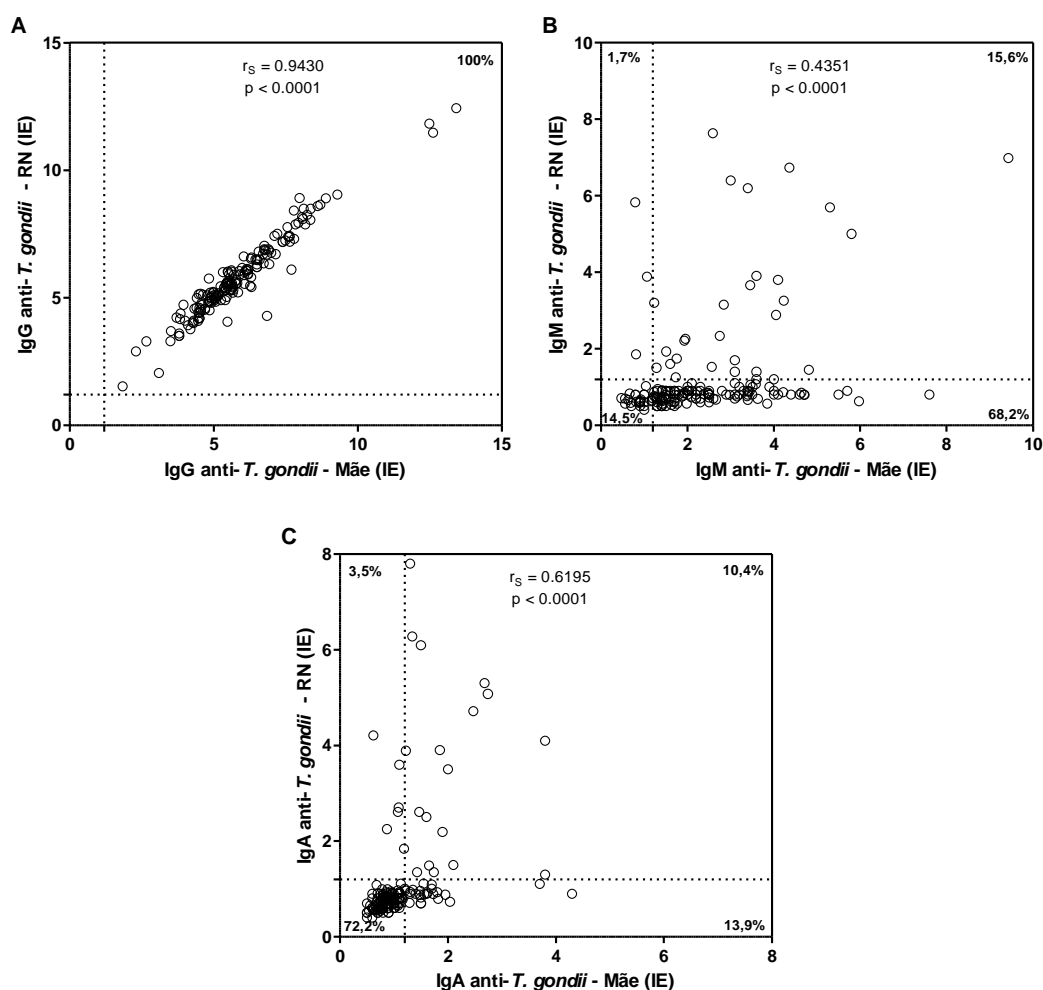


Figura 2 - Correlação entre os níveis de anticorpos IgG (A), IgM (B) e IgA (C) anti-*Toxoplasma gondii* de 173 amostras pareadas de mães com suspeita de toxoplasmose primária adquirida durante a gestação e seus respectivos recém-nascidos (RN), provenientes do HC-UFU durante o período de 2006 a 2014. Os resultados são expressos em Índice ELISA (IE) e a linha pontilhada indica o limite de positividade das reações (IE > 1,2). O coeficiente de correlação (r_s) foi calculado pelo teste de correlação de Spearman. As porcentagens de amostras duplo-positivas, duplo-negativas ou positivas somente para um dos anticorpos são indicadas nos cantos dos quadrantes correspondentes.

Houve forte e significativa correlação positiva entre os níveis de IgG anti-*T. gondii* presentes nas amostras de soros provenientes de mães e de RNs ($r_s = 0,9430$; $p < 0,0001$), com 100% de amostras duplo-positivas (Figura 2A). Conforme discutido previamente, este resultado reflete o alto grau de transferência placentária de anticorpos IgG, de modo que a soropositividade observada nos RNs refere-se principalmente a anticorpos de origem materna e não a anticorpos sintetizados pelo próprio RN.

Para anticorpos IgM anti-*T. gondii*, houve uma moderada correlação positiva entre os níveis detectados nas amostras provenientes de mães e RNs ($r_s = 0,4351$; $p < 0,0001$), com a grande maioria dos pares de amostras (68,2%) apresentando resultado positivo para IgM apenas no soro materno ($p < 0,0001$). Não houve diferença significativa entre a porcentagem de pares duplo-positivos, ou seja, positivos para IgM nas amostras da mãe e do respectivo RN (15,6%) e duplo-negativos (14,5%). Por outro lado, a porcentagem de pares com positividade de IgM apenas na amostra do RN foi significativamente menor (1,7%; $p < 0,0001$) (Figura 2B). Como anticorpos IgM não são transferidos pela placenta, apenas RNs com infecção congênita apresentariam resultados positivos para estes anticorpos, o que explica a maior porcentagem de pares de amostras com resultados positivos apenas no soro materno.

A soropositividade de IgM detectada apenas no soro do RN em 3 pares de amostras (1,7%) poderia indicar infecção materna adquirida imediatamente antes ou logo no início da gestação, com transmissão congênita no primeiro trimestre. Assim, as mães apresentariam níveis indetectáveis de IgM no momento do parto e os RNs com infecção ativa apresentariam níveis ainda elevados destes anticorpos ao nascimento. No entanto, pela análise dos prontuários clínicos destes 3 RNs, esta possibilidade parece não ter ocorrido com nenhum deles. Para os três casos analisados, os respectivos RNs nasceram sem qualquer sinal e/ou sintoma relacionado à infecção congênita, os quais também não se manifestaram durante acompanhamento ambulatorial. Além disso, a sorologia realizada no HC-UFU logo após o nascimento apresentou resultado positivo para IgG, mas negativo para IgM anti-*T. gondii* para os três RNs, os quais permaneceram com resultados negativos de IgM e apresentaram queda dos níveis de IgG até a completa negatificação durante acompanhamento sorológico de 1 ano. Portanto, a possibilidade de infecção congênita foi descartada nos três casos. Uma explicação alternativa para estes resultados divergentes pode ser a troca entre as amostras de soro da mãe e do RN no momento de sua coleta no HC-UFU e posterior envio ao LIP. Assim, apenas as mães seriam IgM-positivas e os RNs seriam negativos.

Para anticorpos IgA anti-*T. gondii*, houve também uma moderada correlação positiva entre os níveis detectados nas amostras provenientes de mães e RNs ($r_s = 0,6195$; $p < 0,0001$),

mas com a grande maioria dos pares de amostras (72,2%) apresentando resultado duplo-negativo ($p < 0,0001$). Não houve diferença significativa entre a porcentagem de pares duplo-positivos (10,4%) e positivos apenas no soro materno (13,9%). Por outro lado, a porcentagem de pares com positividade de IgA apenas na amostra do RN foi significativamente menor (3,5%; $p = 0,0182$) (Figura 2C).

A baixa soropositividade das amostras maternas e dos RNs para anticorpos IgA deve-se principalmente à precocidade da síntese destes anticorpos durante a infecção por *T. gondii* e à curta permanência de níveis detectáveis no soro, conforme discutido previamente (SENSINI, 2006). Um dado interessante corresponde aos 6 casos (3,5%) em que apenas o RN apresentou resultado positivo para IgA, enquanto a mãe foi negativa para estes anticorpos. Para cinco destes casos, os RNs apresentaram toxoplasmose congênita confirmada pela análise clínica e sorológica, de modo que apresentavam infecção recente e ativa ao nascimento, com síntese de altos títulos de IgA. Já as mães (4 casos) não tiveram a infecção diagnosticada na gestação, mas provavelmente se infectaram logo no início, não apresentando níveis detectáveis destes anticorpos no momento do parto (MONTROYA; REMINGTON, 2008; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). O outro caso em que apenas a amostra do RN foi IgA-positiva corresponde a um dos casos discutidos anteriormente, que também foi positivo para IgM apenas na amostra do RN, o que pode indicar a ocorrência de troca entre as amostras de soros da mãe e do RN.

Comparando-se os resultados entre as positivities de IgM e IgA anti-*T. gondii*, houve diferença significativa entre a porcentagem de duplo-negativos para IgM (14,5%) e para IgA (72,2%) ($p < 0,0001$). Também houve diferença significativa entre as porcentagens de pares positivos para IgM apenas no soro materno (68,2%), quando comparados com a mesma positividade para IgA (13,9%) ($p < 0,0001$). Por outro lado, não houve diferença significativa entre as porcentagens de pares duplo-positivos para IgM (15,6%) e para IgA (10,4%), nem entre os pares positivos apenas no soro do RN para IgM (1,7%) e para IgA (3,5%) (Figuras 2B; 2C).

3.3 Correlação entre os níveis de anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* nas amostras de soros de mães e nas amostras de recém-nascidos

Além das análises de correlações dos níveis de anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* entre as amostras de mães e RNs, foram analisadas também as correlações entre os

níveis destes isotipos de anticorpos nas amostras de soros provenientes das mães e nas amostras dos RNs, conforme representado na Figura 3.

Analisando-se as correlações para as amostras de soros provenientes das mães, observou-se que houve correlação significativa, porém fraca, apenas entre os isotipos IgM e IgA ($r_s = 0,3854$; $p < 0,0001$) (Figura 3C). A maioria das amostras maternas foi positiva apenas para anticorpos IgM anti-*T. gondii* (60,1%) ($p < 0,0001$), enquanto uma taxa significativamente baixa de amostras foram positivas apenas para anticorpos IgA (0,6%). Não houve diferenças significativas entre amostras duplo-positivas (23,7%) e duplo-negativas (15,6%). Para as amostras maternas, não houve correlação entre os isotipos IgG e IgM, em que a maioria das amostras foi duplo-positiva (83,8%) (Figura 3A), nem entre os isotipos IgG e IgA, em que a maioria das amostras foi positiva apenas para IgG (75,7%) (Figura 3B).

Nas amostras de soros dos RNs, houve correlação positiva moderada entre os isotipos IgM e IgA ($r_s = 0,5494$; $p < 0,0001$), superior à observada entre estes mesmos isotipos nas amostras maternas, mas com a maioria das amostras com resultado duplo-negativo (79,8%) ($p < 0,0001$). Houve diferença significativa entre as porcentagens de amostras duplo-positivas (11,0%) e as amostras positivas apenas para IgA anti-*T. gondii* (2,9%) ($p < 0,001$), mas não houve diferença entre as amostras duplo-positivas (11,0%) e aquelas positivas apenas para o isotipo IgM (6,3%) (Figura 3F). Para as amostras de RNs também não houve correlação entre os isotipos IgG e IgM, em que a maioria das amostras foi positiva apenas para IgG (82,9%) (Figura 3D), nem entre os isotipos IgG e IgA, em que a maioria das amostras também foi positiva apenas para IgG (86,3%) (Figura 3E).

As análises de correlações envolvendo anticorpos IgG não apresentam valor significativo no diagnóstico da infecção materna primária nem no diagnóstico da infecção congênita por *T. gondii*, pois estes anticorpos podem persistir em níveis séricos detectáveis por toda a vida de um paciente infectado. Deste modo, a detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* no soro da mãe significa apenas exposição ao parasita, sem indicação do tempo desta exposição, enquanto a detecção destes anticorpos no soro de um RN indica primariamente a transferência placentária de anticorpos maternos, sem indicação de infecção congênita. Como anticorpos IgM e IgA são mais característicos de infecção recente e não são transferidos pela placenta, há pequena correlação entre seus níveis e os níveis de IgG a partir da análise de uma única amostra de soro coletada da mãe e de seu RN logo após o parto (RODRIGUES et al., 2009; SOARES; CARVALHO; CALDEIRA, 2012).

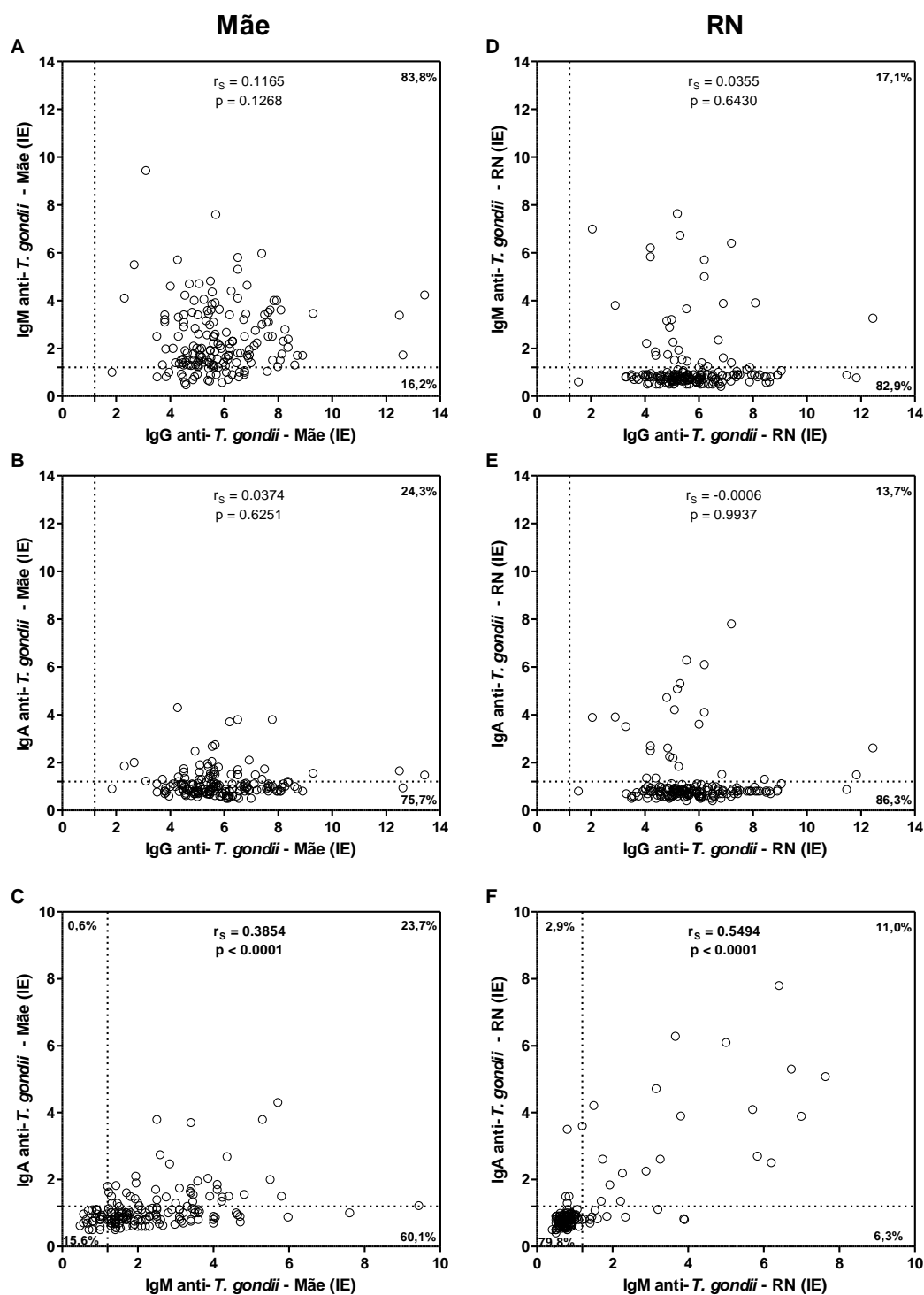


Figura 3 - Correlação entre os isotipos de anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*Toxoplasma gondii* em 173 amostras pareadas de soros de mães com suspeita de toxoplasmose primária adquirida durante a gestação (A, B e C) e seus respectivos recém-nascidos (RN) (D, E e F), provenientes do HC-UFU durante o período de 2006 a 2014. Os resultados são expressos em Índice ELISA (IE) e a linha pontilhada indica o limite de positividade das reações (IE > 1,2). O coeficiente de correlação (r_s) foi calculado pelo teste de correlação de Spearman. As porcentagens de amostras duplo-positivas, duplo-negativas ou positivas somente para um dos anticorpos são indicadas nos cantos dos quadrantes correspondentes.

As correlações entre anticorpos IgM e IgA nos soros maternos e dos RNs foram mais significativas, visto que estes anticorpos são sintetizados nas fases mais precoces da infecção e não são transferidos por via placentária. No entanto, a correlação entre estes isotipos nos soros maternos foi menor, provavelmente em função do maior tempo de infecção entre as mães, uma vez que estes soros foram coletados logo após o parto. Deste modo, como as mães já poderiam apresentar infecções adquiridas alguns meses antes, o nível de anticorpos IgA poderia ser muito baixo ou mesmo indetectável no parto, além do nível de IgM poder representar uma persistência maior destes anticorpos, sem necessariamente indicar infecção recente. Por outro lado, a infecção por *T. gondii* entre os RNs era mais recente, de modo que estes ainda apresentavam níveis detectáveis e muitas vezes elevados de IgA ao nascimento, os quais apresentavam maior correlação com os anticorpos IgM (LAGO; OLIVEIRA; BENDER, 2014).

3.4 Recém-nascidos com sorologia sugestiva de toxoplasmose congênita

Das 173 amostras testadas, correspondentes aos soros maternos, 145 apresentaram resultado positivo para anticorpos IgM anti-*T. gondii*, sugerindo a ocorrência de infecção materna recente pelo parasita. Destas 145 amostras positivas para IgM, 41 delas também foram positivas para IgA, de modo que, das 42 amostras maternas positivas para IgA, 41 também são positivas para IgM e apenas 1 amostra é positiva apenas para IgA. Deste modo, tem-se um total de 146 amostras maternas (84,4%) com sorologia sugestiva de infecção recente por *T. gondii*, ou seja, com resultados sorológicos positivos para anticorpos IgM e/ou IgA e, portanto, com possibilidade de terem transmitido o parasita verticalmente para seus respectivos recém-nascidos.

Destas 146 amostras maternas, foi constatado a partir das análises de prontuários clínicos que 108 (74,0%) mães receberam tratamento para toxoplasmose durante a gestação, normalmente com espiramicina, mas em alguns casos com o tratamento triplice (pirimetamina + sulfadiazina + ácido folínico), enquanto 38 mães (26,0%) não foram tratadas durante a gestação, pois não tiveram diagnóstico de uma possível infecção primária por *T. gondii* neste período. De acordo com as informações dos prontuários clínicos, a ausência de diagnóstico de infecção por *T. gondii* durante a gestação entre algumas destas mães ocorreu em função da não realização de acompanhamento pré-natal, ou em função da não repetição da sorologia para toxoplasmose no segundo e terceiro trimestre de gestação, quando a mãe era identificada

como não infectada na sorologia do primeiro trimestre. Assim, neste último caso, a infecção materna pode ter ocorrido no final da gestação e não ter sido identificada.

As porcentagens de mães tratadas foram significativamente maiores do que aquelas das mães não tratadas ($p < 0,05$) (Tabela 2). Assim, foi analisada a porcentagem dos RNs que apresentaram sorologia sugestiva de infecção congênita por *T. gondii* ao nascimento, filhos destas 146 mães com sorologia sugestiva de infecção recente, as quais foram subdivididas em mães tratadas e não tratadas durante a gestação (Figura 4).

Das 108 mães positivas para IgM e/ou IgA específicas e tratadas durante a gestação, 10 RNs (9,2%) tiveram resultado positivo para IgM ao nascimento, 6 (5,5%) foram positivos para IgA e 3 (2,8%) mostraram resultado duplo-positivo. Deste modo, 13 RNs (12,0%) provenientes deste grupo de 108 mães tratadas apresentaram resultados positivos para IgM e/ou IgA anti-*T. gondii*, sugerindo a ocorrência de infecção congênita (Figura 4).

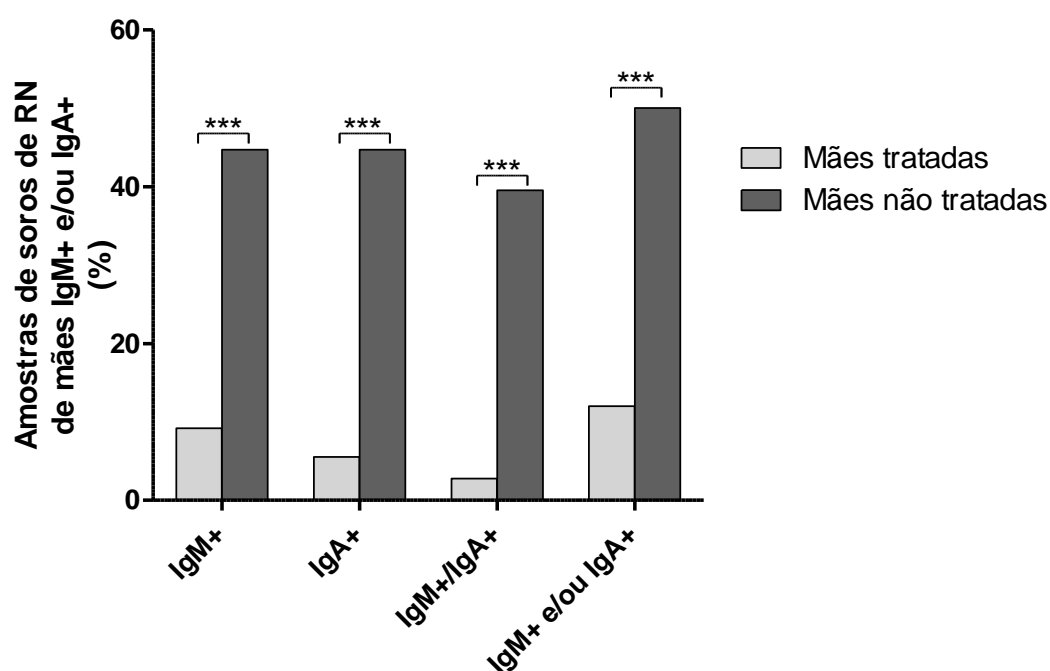


Figura 4 - Porcentagem de amostras de soros de recém-nascidos (RN) com sorologia positiva para IgM e/ou IgA anti-*Toxoplasma gondii*, procedentes de mães soropositivas para IgM e/ou IgA anti-*T. gondii* ($n = 146$), as quais foram tratadas ($n = 108$) ou não tratadas ($n = 38$) durante a gestação com drogas específicas para o tratamento da toxoplasmose. Diferenças estatisticamente significativas entre porcentagens de RNs de mães tratadas e não tratadas foram determinadas pelo teste exato de Fischer (* $p < 0,05$).

Por outro lado, das 38 mães positivas para IgM e/ou IgA específicas e não tratadas durante a gestação, 17 RNs (44,7%) tiveram resultado positivo para IgM ao nascimento, 17

(44,7%) foram positivos para IgA e 15 (39,5%) mostraram resultado duplo-positivo. Deste modo, 19 RNs (50,0%) provenientes deste grupo de 38 mães não tratadas apresentaram resultados positivos para IgM e/ou IgA anti-*T. gondii*, sugerindo a ocorrência de infecção congênita (Figura 4).

As porcentagens de RNs com sorologia sugestiva de infecção congênita por *T. gondii* (IgM⁺, IgA⁺, IgM⁺/IgA⁺ e IgM⁺ e/ou IgA⁺) provenientes de mães tratadas foram significativamente menores do que aquelas de RNS provenientes de mães não tratadas durante a gestação ($p < 0,0001$) (Figura 4), enfatizando a importância do tratamento materno em prevenir a infecção congênita.

Em síntese, no presente estudo foram encontrados 32/146 (21,9%) RNs com sorologia sugestiva de toxoplasmose congênita ao nascimento, sendo 13/108 (12,0%) nascidos de mães tratadas durante a gestação e 19/38 (50%) de mães não tratadas.

3.5 Dados clínicos de recém-nascidos com sorologia sugestiva de toxoplasmose congênita

A Tabela 2 apresenta os principais dados clínicos obtidos a partir da análise dos prontuários dos 32 RNs com sorologia sugestiva de toxoplasmose congênita ao nascimento (IgM⁺ e/ou IgA⁺ anti-*T. gondii*), analisados em função da ocorrência ou não de tratamento materno durante a gestação e apresentados de acordo com o ano de nascimento (2006 a 2014).

A presença de alterações oculares relacionadas à toxoplasmose congênita foi relatada nos prontuários de 18 RNs (56,3%), sendo 4 deles nascidos de mães tratadas durante a gestação e 14 de mães não tratadas, com diferença significativa entre estes dois grupos ($p < 0,05$) (Tabela 2). Estas alterações foram observadas a partir de exames de fundo de olho (fundoscopia) realizados no HC-UFU e incluem lesões típicas de coriorretinite ativa ou inativa, lesões maculares (ativas ou cicatriciais), vitreíte, descolamento de retina, hemorragia retiniana, microftalmia, nistagmo, estrabismo, catarata e comprometimento da acuidade visual.

A presença de alterações cerebrais relacionadas à toxoplasmose congênita foi relatada nos prontuários de 13 RNs (40,6%), sendo 4 deles nascidos de mães tratadas durante a gestação e 9 de mães não tratadas, sem diferença significativa entre estes dois grupos (Tabela 2). Estas alterações foram observadas a partir de exames de raio X e/ou ultrassonografia de crânio e análises de líquido cefalorraquidiano realizados no HC-UFU e incluem calcificações cerebrais, hidrocefalia, microcefalia, ventriculomegalia e encefalite.

Tabela 2 - Dados clínicos e laboratoriais de recém-nascidos (RN) com sorologia suspeita de toxoplasmose congênita nascidos de mães IgM⁺ e/ou IgA⁺ anti-*Toxoplasma gondii*, tratadas ou não tratadas durante a gestação, provenientes do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU) durante o período de 2006 a 2014.

Ano	Amostras de mães IgM ⁺ e/ou IgA ⁺ anti- <i>T. gondii</i> n (%) ^d	Tratamento materno na gestação n (%) ^e		Amostras de RN IgM ⁺ e ou IgA ⁺ anti- <i>T. gondii</i> n (%) ^f		Alterações oculares ^a n (%) ^g		Alterações cerebrais ^b n (%) ^g		Hepato- esplenomegalia n (%) ^g		Óbito n (%) ^g	
		SIM	NÃO	Mães tratadas	Não tratadas	Mães tratadas	Não tratadas	Mães tratadas	Não tratadas	Mães tratadas	Não tratadas	Mães tratadas	Não tratadas
2006	8 (66,7)	3 (37,5)	5 (62,5)	0 (0)	4 (80,0)	0 (0)	4 (100)	0 (0)	4 (100)	0 (0)	4 (100)	0 (0)	0 (0)
2007	16 (69,6)	9 (56,2)	7 (43,8)	1 (11,1)	6 (85,7)	0 (0)	5 (83,3)	0 (0)	1 (16,7)	0 (0)	1 (16,7)	0 (0)	1 (16,7)
2008	15 (100)	14 (93,3)	1 (6,7)	1 (7,1)	1 (100)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
2009	24 (96,0)	23 (95,8)	1 (4,2)	1 (4,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
2010	14 (66,7)	10 (71,4)	4 (28,6)	1 (10,0)	1 (25,0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
2011	21 (84,0)	16 (76,2)	5 (23,8)	2 (12,5)	1 (20,0)	1 (50)	1 (100)	1 (50)	1 (100)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)
2012	13 (100)	9 (69,2)	4 (30,8)	3 (33,3)	1 (25,0)	2 (66,7)	1 (100)	3 (100)	1 (100)	1 (33,3)	1 (100)	1 (33,3)	0 (0)
2013	23 (92,0)	16 (69,6)	7 (30,4)	2 (12,5)	4 (57,1)	0 (0)	1 (25)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
2014 ^c	12 (85,7)	8 (66,7)	4 (33,3)	2 (25,0)	1 (25,0)	1 (50)	1 (100)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Sub- total	146 (84,4)	108 (74,0)*	38 (26,0)	13 (12,0)	19 (50,0)*	4 (30,8)	14 (73,7)*	4 (30,8)	9 (47,4)	1 (7,7)	7 (36,8)	1 (7,7)	1 (5,3)
Total		146 (84,4)		32 (21,9)		18 (56,3)		13 (40,6)		8 (25,0)		2 (6,3)	

^a Alterações oculares sugestivas de toxoplasmose congênita, determinadas a partir de exame de fundo de olho (Fundoscopia);

^b Alterações cerebrais sugestivas de toxoplasmose congênita, determinadas a partir de exames de Raio X e/ou ultrassonografia de crânio;

^c Coleta de amostras e análise de prontuários finalizadas no mês de junho de 2014;

^d Porcentagem em relação ao número total de amostras de mães para o período;

^e Porcentagem em relação ao número total de amostras de mães IgM⁺ e/ou IgA⁺ para o período;

^f Porcentagem em relação ao número total de amostras de mães IgM⁺ e/ou IgA⁺ tratadas ou não tratadas, respectivamente, no período;

^g Porcentagem em relação ao número total de amostras de RNs IgM⁺ e/ou IgA⁺ provenientes de mães tratadas ou não tratadas, respectivamente, no período;

* Significância estatística determinada pelo teste exato de Fischer ($p < 0,05$) comparando mães tratadas e não tratadas.

Além disso, 8 RNs (25,0%) apresentaram hepatoesplenomegalia, conforme determinado por exame clínico e ultrassonografia de abdome, sendo 1 de mãe tratada durante a gestação e 7 de mães não tratadas (Tabela 2). Dois RNs (ambos de mães não tratadas) apresentaram comprometimento auditivo, com perda neurossensorial em ambos os ouvidos, em decorrência da toxoplasmose congênita (dados não mostrados). Outros dois RNs (1 de mãe tratada e 1 de mãe não tratada) vieram a óbito, em função de complicações da toxoplasmose congênita (Tabela 2).

Assim, dos 32 RNs com sorologia sugestiva de toxoplasmose congênita ao nascimento, 19 (59,4%) deles apresentaram sinais e/ou sintomas e alterações relacionadas à infecção, enquanto 13 (40,6%) se mostraram sem qualquer alteração aparente relacionada à infecção congênita (assintomáticos).

Todos os RNs com resultados negativos de IgM e/ou IgA específicas foram assintomáticos ao nascimento, sem qualquer alteração relacionada à toxoplasmose congênita.

3.6 Acompanhamento sorológico e ambulatorial dos recém-nascidos com suspeita de toxoplasmose congênita no HC-UFU

Um dos objetivos da análise de prontuários clínicos dos RNs no HC-UFU foi a obtenção de dados relacionados ao acompanhamento sorológico e ambulatorial dos RNs com suspeita de exposição a *T. gondii* durante a gestação. Em geral, todos os RNs provenientes de mães com sorologia sugestiva de toxoplasmose primária durante a gestação são acompanhados por um período médio de 1 ano no Setor de Pediatria e Neonatologia do HC-UFU, quanto à manifestação de sinais, sintomas e alterações relacionadas à infecção e quanto ao estado sorológico.

De acordo com as análises de prontuários clínicos, os 19 RNs com sorologia e alterações clínicas compatíveis com toxoplasmose congênita ao nascimento apresentaram evolução sorológica também compatível com a infecção congênita, com manutenção de títulos elevados de IgG específica, com ou sem negatificação de IgM, após um período de acompanhamento sorológico de 8 meses a 1 ano. Portanto, foi comprovada a transmissão congênita de *T. gondii* nestes 19 RNs, tanto pelos dados clínicos, quanto pela evolução sorológica.

Com relação aos 13 RNs com sorologia sugestiva de toxoplasmose congênita, mas assintomáticos ao nascimento, o acompanhamento sorológico permitiu determinar que 3 deles apresentavam títulos elevados de IgG com 1 ano de idade, o que comprova a ocorrência de

transmissão congênita nestes indivíduos. Por outro lado, o acompanhamento demonstrou que outros 5 RNs assintomáticos permaneceram sem qualquer manifestação típica de toxoplasmose congênita no período de 1 ano, além de apresentarem resultados negativos de IgM e queda acentuada de IgG até atingir níveis indetectáveis ao final do período. Estas observações excluem a possibilidade de transmissão congênita de *T. gondii* nestes 5 RNs.

Finalmente, os 5 RNs assintomáticos remanescentes não fizeram acompanhamento no HC-UFU e não foi possível verificar sua evolução clínica e sorológica, o que impediu determinar a ocorrência ou não de toxoplasmose congênita.

Em síntese, das 173 mães analisadas no período, 146 apresentaram sorologia sugestiva de infecção primária por *T. gondii* (IgM⁺ e/ou IgA⁺), de acordo com os dados sorológicos do LIP. Destas 146 mães nasceram 32 RNs que apresentaram sorologia sugestiva de toxoplasmose congênita (IgM⁺ e/ou IgA⁺) ao nascimento, dos quais 22 deles tiveram infecção congênita confirmada pelos dados clínicos e pelo acompanhamento sorológico. Destes 22 RNs com toxoplasmose congênita confirmada, 17 nasceram de mães não tratadas durante a gestação, enquanto 5 nasceram de mães tratadas.

Tomando-se estes resultados em conjunto, alguns pontos merecem destaque, sendo um deles com relação ao tratamento materno. Diversos resultados contraditórios já foram relatados com relação à eficácia do tratamento materno com espiramicina na redução da transmissão materno-fetal de *T. gondii*. Dentre estes estudos, merece atenção uma revisão realizada por Wallon e colaboradores (1999), que não encontraram nenhuma evidência do efeito do tratamento na redução da transmissão vertical do parasita. O Estudo Multicêntrico Europeu em Toxoplasmose Congênita (EMSCOT - *European Multicenter Study on Congenital Toxoplasmosis*) incluiu uma análise de 1.208 pares mãe-RN de 11 centros e não encontrou nenhum efeito evidente do tratamento materno na redução da transmissão do parasita (GILBERT; GRAS; EMSCOT, 2003). Outro estudo conduzido pelo grupo Revisão Sistemática em Toxoplasmose Congênita (SYROCOT - *Systematic Review on Congenital Toxoplasmosis*) incluiu 1.745 mães infectadas e encontrou fraca evidência de que o tratamento materno tenha reduzido a transmissão materno-fetal (SYROCOT et al., 2007).

No entanto, os resultados do presente estudo apontaram claramente maior transmissão entre as mães não tratadas (17 RNs infectados/38 mães não tratadas - 44,7%), quando comparadas com as mães tratadas (5 RNs infectados/108 mães tratadas - 4,6%), o que demonstra que o tratamento materno durante a gestação pode ter sido importante para redução da transmissão congênita, conforme apontam alguns resultados de outros trabalhos semelhantes (CAPOBIANGO et al., 2014; RODRIGUES et al., 2014; SOARES;

CARVALHO; CALDEIRA, 2012). É interessante notar ainda que, dos 5 RNs infectados nascidos de mães tratadas, o tratamento iniciou-se no final do 2º trimestre (2 casos) ou no 3º trimestre (3 casos), demonstrando atraso no diagnóstico da infecção materna e no início do tratamento, o que pode comprometer sua eficácia (ROBERT-GANGNEUX, 2014).

Alguns estudos sustentam ainda que, apesar de não haver evidências de que o tratamento materno durante a gestação reduza a transmissão vertical de *T. gondii*, sua principal vantagem seria a redução das manifestações clínicas fetais, em caso de transmissão congênita, reduzindo a quantidade e a gravidade das lesões cerebrais e oculares. Porém, os dados são bastante contrastantes nos diferentes trabalhos, principalmente em função da ausência de controles não tratados (CORTINA-BORJA et al., 2010; GRAS et al., 2005; VILLENA et al., 2010). Nossos resultados não permitem avaliar esta importância do tratamento materno, pois os 5 RNs infectados, cujas mães foram tratadas durante a gestação, apresentaram alterações oculares e/ou cerebrais graves ao nascimento, com a ressalva de que o tratamento materno foi iniciado nas fases finais da gestação.

A triagem sorológica pré-natal constitui-se numa das principais ferramentas na identificação de gestantes com infecção primária por *T. gondii* e, portanto, sob risco de transmissão congênita do parasita. Sua realização e periodicidade é bastante variada entre os diversos países, de acordo com a prevalência local da toxoplasmose, de modo que países com baixa prevalência e baixa morbidade da infecção congênita, como Estados Unidos, Suécia e Dinamarca, não apresentam um programa obrigatório de triagem pré-natal. O principal argumento contrário à triagem pré-natal de gestantes nestes países é o fato de que os métodos sorológicos de diagnóstico de infecção materna podem apresentar resultados falso-negativos, e a ansiedade e preocupação materna gerada por um diagnóstico equivocado durante a gestação, bem como os efeitos colaterais de um tratamento potencialmente desnecessário podem trazer mais prejuízos que a infecção congênita em si. Além disso, em termos de políticas públicas, os gastos financeiros com a triagem sorológica de todas as gestantes seriam maiores que os gastos com tratamento da infecção congênita, que é rara nestes países (ROBERT-GANGNEUX, 2014; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

Nossos resultados demonstram claramente que a triagem sorológica, apesar de suas falhas e limitações, tem grande importância no diagnóstico da infecção materna e, consequentemente, na indicação de tratamento materno, visto que a transmissão congênita foi muito maior entre as mães não tratadas na gestação, com consequências graves para os recém-nascidos. Vale ressaltar que as 38 mães não tratadas abordadas neste estudo não receberam tratamento em função da ausência de diagnóstico durante a gestação, pois todas as demais

mães que tiveram sorologia sugestiva de toxoplasmose primária na gestação foram tratadas. Em países como o Brasil, onde a soroprevalência da toxoplasmose é elevada e circulam linhagens atípicas e altamente virulentas do parasita, a triagem pré-natal deveria se constituir como política pública obrigatória, pois os custos e prejuízos gerados pela ocorrência de infecção congênita podem ser muito superiores aos custos com a triagem de todas as gestantes (AVELINO et al., 2014; CAPRETTI et al., 2014; VAZ et al., 2011).

Um problema comum na triagem sorológica de gestantes corresponde à persistência de IgM por períodos de tempo elevados em alguns pacientes ("arraste" de IgM), levando a um diagnóstico equivocado de infecção primária e à prescrição desnecessária de tratamento. No nosso estudo, a ocorrência de resultados positivos para anticorpos IgM em gestantes com relato de infecção prévia em gestações anteriores foi relatada nos prontuários de 10 pacientes, demonstrando a necessidade de métodos mais precisos na identificação da fase da infecção, bem como a identificação de marcadores antigênicos que permitam avaliar melhor a ocorrência de infecção primária (LAGO; OLIVEIRA; BENDER, 2014; ROBERT-GANGNEUX, 2014).

Outra medida importante no controle da toxoplasmose congênita é a triagem sorológica neonatal, visando identificar recém-nascidos com sorologia sugestiva de infecção congênita, de forma a prescrever o tratamento adequado de forma precoce (BESSIÈRES et al., 2009; KIEFFER; WALLON, 2013; TORRES et al., 2013). Nossos resultados demonstraram correlação significativa entre os níveis de anticorpos IgM e IgA nos soros de RNs (Figura 3F), de modo que a detecção conjunta destes dois isotipos são bons indicadores da ocorrência de toxoplasmose congênita. Este fato é reforçado pela análise de que, dos 22 RNs com transmissão congênita confirmada, 19 deles (86,4%) apresentaram soropositividade para anticorpos IgM e IgA, com índices ELISA elevados na maioria dos casos. Além disso, todos os 5 RNs sem infecção congênita, mas com sorologia sugestiva ao nascimento, apresentaram resultados positivos apenas para IgM, com baixos valores de índice ELISA (próximos aos valores de *cut off* da reação), com resultados negativos para IgA.

Neste sentido, os testes sorológicos para detecção de anticorpos IgM e IgA em amostras de recém-nascidos também podem apresentar resultados duvidosos, evidenciando a necessidade de desenvolvimento de métodos sorológicos mais eficazes, bem com a descoberta de novos marcadores antigênicos que permitam avaliar precocemente a ocorrência de infecção congênita.

Outra medida de grande relevância no diagnóstico da toxoplasmose congênita é o acompanhamento dos recém-nascidos cujas mães apresentaram sorologia sugestiva de

soroconversão durante a gestação, visto que muitos recém-nascidos assintomáticos e sem sorologia sugestiva de infecção congênita ao nascimento podem desenvolver alterações, principalmente oculares, após 2 anos de idade ou mais (McAULEY, 2014; KIEFFER; WALLON, 2013; ROBERT-GANGNEUX, 2014). O acompanhamento dos RNs incluídos neste estudo permitiu avaliar que todos aqueles que não apresentaram sintomas nem sorologia sugestiva de infecção congênita ao nascimento permaneceram assintomáticos após um período de acompanhamento de cerca de 1 ano, além de apresentarem negatização dos níveis de IgG (degradação da IgG materna) e manutenção dos resultados negativos de IgM. Além disso, o acompanhamento permitiu a confirmação da ocorrência de infecção congênita em 22 RNs, além de descartar a ocorrência de transmissão congênita em 5 RNs com sorologia sugestiva ao nascimento. Porém, nem todas as mães expostas à toxoplasmose durante a gestação aderiram plenamente ao acompanhamento, o que inviabilizou a correta avaliação da ocorrência de infecção congênita em 5 RNs assintomáticos e com sorologia sugestiva ao nascimento.

A partir dos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que (i) a triagem sorológica pré-natal é de grande relevância na identificação de gestantes expostas à toxoplasmose durante a gestação; (ii) o tratamento materno tão logo a soroconversão seja identificada reduz significativamente a transmissão congênita de *T. gondii*; (iii) a triagem sorológica neonatal, aliada à análise de parâmetros clínicos, constitui-se em importante metodologia na identificação de recém-nascidos verticalmente infectados, principalmente por meio da detecção conjunta de anticorpos IgM e IgA; e (iv) o acompanhamento sorológico de recém-nascidos é importante no esclarecimento de situações duvidosas, principalmente em casos de recém-nascidos assintomáticos, mas com sorologia sugestiva de infecção congênita. No entanto, pesquisas sobre novas metodologias diagnósticas e novos marcadores antigênicos devem ser realizadas, visando aumentar a confiabilidade dos resultados para o esclarecimento precoce do diagnóstico de infecção congênita, além da implementação de políticas públicas uniformizadas em todo o território nacional, visando a redução dos casos de transmissão congênita.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AVELINO, M. M.; AMARAL, W. N.; RODRIGUES, I. M.; RASSI, A. R.; GOMES, M. B.; COSTA, T. L.; CASTRO, A. M. Congenital toxoplasmosis and prenatal care state programs. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, p. 33-45, 2014.

AZEVEDO, K. M.; SETÚBAL, S.; LOPES, V. G.; CAMACHO, L. A.; OLIVEIRA, S. A. Congenital toxoplasmosis transmitted by human immunodeficiency-virus infected women. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 2, p. 186-189, 2010.

BACHMEYER, C.; MOUCHNINO, G.; THULLIEZ, P.; BLUM, L. Congenital toxoplasmosis from an HIV-infected woman as a result of reactivation. **Journal of Infection**, v. 52, n. 2, p. e55-57, 2006.

BERGER, F. G. V.; LE STRAT, Y.; DESENCLOS, J. C. Toxoplasmosis in pregnant women in France: trends in seroprevalence and incidence, and associated factors. **Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire**, v. 14-15, p. 117-121, 2008.

BESSIÈRES, M. H.; BERREBI, A.; CASSAING, S.; FILLAUX, J.; CAMBUS, J. P.; BERRY, A.; ASSOULINE, C.; AYOUBI, J. M.; MAGNAVAL, J. F. Diagnosis of congenital toxoplasmosis: prenatal and neonatal evaluation of methods used in Toulouse University Hospital and incidence of congenital toxoplasmosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 389-392, 2009.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CAMPOS, F. A.; ANDRADE, G. M.; PÁDUA-SANTOS-LANNA, A.; LAGE, B. F.; ASSUMPÇÃO, M. V.; PINTO, J. A. Incidence of congenital toxoplasmosis among infants born to HIV-coinfected mothers: case series and literature review. **The Brazilian Journal of the Infectious Diseases**, v. 14, 2014.

CAPOBIANGO, J. D.; BREGANÓ, R. M.; NAVARRO, I. T.; NETO, C. P.; CASELLA, A. M.; MORI, F. M.; PAGLIARI, S.; INOUE, I. T.; REICHE, E.M. Congenital toxoplasmosis in a reference center of Paraná, Southern Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 18, n. 4, p. 364-371, 2014.

CAPRETTI, M. G.; DE ANGELIS, M.; TRIDAPALLI, E.; ORLANDI, A.; MARANGONI, A.; MORONI, A.; GUERRA, B.; ARCURI, S.; MARSICO, C.; FALDELLA, G. Toxoplasmosis in pregnancy in an area with low seroprevalence: is prenatal screening still worthwhile? **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 33, n. 1, p. 5-10, 2014.

CARELLOS, E. V. M.; ANDRADE, G. M. G.; AGUIAR, R. A. L. P. Evaluation of prenatal screening for toxoplasmosis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil: a cross-sectional study of postpartum women in two maternity hospitals. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 2, p. 391-401, 2008.

CARLIER, Y.; TRUYENS, C.; DELORON, P.; PEYRON, F. Congenital parasitic infections: a review. **Acta Tropica**, v. 121, n. 2; p. 55-70, 2012.

CARVALHO, F. R.; SILVA, D. A. O.; CUNHA-JÚNIOR, J. P.; SOUZA, M. A.; OLIVEIRA, T. C.; BÉLA, S. R.; FARIA, G. G.; LOPES, C. S.; MINEO, J. R. Reverse enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies against SAG1-related sequence, SAG2A, and p97 antigens from *Toxoplasma gondii* to detect specific Immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgA antibodies in human sera. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington DC, v. 15, n. 8, p. 1265-1271, 2008.

CORTINA-BORJA, M.; TAN, H. K.; WALLON, M.; PAUL, M.; PRUSA, A.; BUFFOLANO, W.; MALM, G.; SALT, A.; FREEMAN, K.; PETERSEN, E.; GILBERT, R. E.; EUROPEAN MULTICENTER STUDY ON CONGENITAL TOXOPLASMOSIS. Prenatal treatment for serious neurological sequelae of congenital toxoplasmosis: an observation prospective cohort study. **PLoS Medicine**, v. 7, n. 10, p. e1000351, 2010.

DUBEY, J. P. The history of *Toxoplasma gondii* – the first 100 years. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 467-475, 2008.

ELBEZ-RUBINSTEIN, A.; AJZENBERG, D.; DARDÉ, M. L.; COHEN, R.; DUMÈTRE, A.; YERA, H.; GONDON, E.; JANAUD, J. C.; THULLIEZ, P. Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: case report, strain characterization, experimental model of reinfection, and review. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 199, n. 2, p. 280–285, 2009.

FLEGR, J. How and why *Toxoplasma* makes us crazy. **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 4, p. 156-163, 2013.

GILBERT, R.; GRAS, L.; EUROPEAN MULTICENTRE STUDY ON CONGENITAL TOXOPLASMOSIS. Effect of timing and type of treatment on the risk of mother to child transmission of *Toxoplasma gondii*. **BJOG International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 110, n. 2, p. 112-120, 2003.

GRAS, L.; WALLON, M.; POLLAK, A.; CORTINA-BORJA, M.; EVENGARD, B.; HAYDE, M.; PETERSEN, E.; GILBERT, R.; EUROPEAN MULTICENTER STUDY ON CONGENITAL TOXOPLASMOSIS. Association between prenatal treatment and clinical manifestations of congenital toxoplasmosis in infancy: a cohort study in 13 European centres. **Acta Paediatrica**, v. 94, n. 12, p. 1721-1731, 2005.

KIEFFER, F.; WALLON, M. Congenital toxoplasmosis. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 112, p. 1099-1101, 2013.

LAGO, E. G.; NETO, E. C.; MELAMED, J.; RUCKS, A. P.; PRESOTTO, C.; COELHO, J. C.; PARISE, C.; VARGAS, P. R.; GOLDBECK, A. S.; FIORI, R. M. Congenital toxoplasmosis: late pregnancy infections detected by neonatal screening and maternal serological testing at delivery. **Paediatric and Perinatal Epidemiology**, v. 21, n. 6, p. 525-531, 2007.

LAGO, E. G.; OLIVEIRA, A. P.; BENDER, A. L. Presence and duration of anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulin M in infants with congenital toxoplasmosis. **Jornal de Pediatria**, v. 90, n. 4, p. 363-369, 2014.

LEBAS, F.; DUCROCQ, S.; MUCIGNAT, V.; PARIS, L.; MÉGIER, P.; BAUDON, J. J.; GOLD, F. Congenital toxoplasmosis: a new case of infection during pregnancy in a

previously immunized and immunocompetent woman. **Archives de Pédiatrie**, v. 11, n. 8, p. 926–928, 2004.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: the changing paradigm of congenital toxoplasmosis. **Parasitology**, v. 138, n. 14, p. 1829-1831, 2011.

LOPES-MORI, F. M. R.; MITSUKA-BREGANÓ, R.; CAPOBIANGO, J. D.; INOUE, I. T.; REICHE, E. M. V.; MORIMOTO, H. K.; CASELLA, M. B.; BITTENCOURT, L. H. F. B.; FREIRE, R. L.; NAVARRO, I. T. Programas de controle da toxoplasmose congênita. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 57, n. 5, p. 594-599, 2011.

MARANGONI, A.; CAPRETTI, M. G.; DE ANGELIS, M.; NARDINI, P.; COMPRI, M.; FOSCHI, C.; ORLANDI, A.; MARSICO, C.; RIGHETTI, F.; FALDELLA, G.; CEVENINI, R. Evaluation of a new protocol for retrospective diagnosis of congenital toxoplasmosis by use of Guthrie cards. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 8, p. 2963-2970, 2014.

McAULEY, J. B. Congenital toxoplasmosis. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 3, n. 1, p. S30-S35, 2014.

MINEO, J. R.; CAMARGO, M. E.; FERREIRA, A. W. Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Toxoplasma gondii* polysaccharides in human toxoplasmosis. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 27, n. 2, p. 283-287, 1980.

MINEO, J. R.; CAMARGO, M. E.; FERREIRA, A. W.; ALMEIDA, G. Research on IgM anti-*Toxoplasma gondii* antibodies by using a reverse immunoenzymatic technique. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 28, p. 6-11, 1986.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**, London, v. 363, n. 9425, p. 1965-1976, 2004.

MONTOYA J. G.; REMINGTON, J. S. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 47, p. 554-566, 2008.

NASCIMENTO, F. S.; SUZUKI, L. A.; ROSSI, C. L. Assessment of the value of detecting specific IgA antibodies for the diagnosis of a recently acquired primary *Toxoplasma* infection. **Prenatal Diagnosis**, v. 28, n. 8, p. 749-752, 2008.

NETO, C. N.; AMORIM, F.; LAGO, E. G. Estimation of the regional distribution of congenital toxoplasmosis in Brazil from the results of neonatal screening. **Scientia Medica**, v. 20, n. 1, p. 64-70, 2010.

OZ, H. S. Maternal and congenital toxoplasmosis, currently available and novel therapies in horizon. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 385, 2014.

PALMEIRA, P.; QUINELLO, C.; SILVEIRA-LESSA, A. L.; ZAGO, C. A.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, p. 1-14, 2012.

RABILLOUD, M.; WALLON, M.; PEYRON, F. In utero and at birth diagnosis of congenital toxoplasmosis: use of likelihood ratios for clinical management. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 29, n. 5, p. 421-425, 2010.

REMYINGTON, J. S.; THULLIEZ, P.; MONTOYA, J. G. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 42, n. 3, p. 941-945, 2004.

ROBERT-GANGNEUX, F. It is not only the cat that did it: How to prevent and treat congenital toxoplasmosis. **Journal of Infection**, v. 68, p. S125-S133, 2014.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2, p. 264-296, 2012.

RODRIGUES, I. M.; CASTRO, A. M.; GOMES, M. B.; AMARAL, W. N.; AVELINO, M. M. Congenital toxoplasmosis: evaluation of serological methods for the detection of anti-*Toxoplasma gondii* IgM and IgA antibodies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 3, p. 434-440, 2009.

RODRIGUES, I. M.; COSTA, T. L.; AVELAR, J. B.; AMARAL, W. N.; CASTRO, A. M.; AVELINO, M. M. Assessment of laboratory methods used in the diagnosis of congenital toxoplasmosis after maternal treatment with spiramycin in pregnancy. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, p. 349, 2014.

SEGUNDO, G. R.; SILVA, D. A. O.; MINEO, J. R.; FERREIRA, M. S. Congenital toxoplasmosis in Uberlândia, MG, Brazil. **Journal of Tropical Pediatrics**, Oxford, v. 50, n. 1, p. 50-53, 2004a.

_____. A comparative study of congenital toxoplasmosis between public and private hospitals from Uberlândia, MG, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 1, p. 13-17, 2004b.

SENSINI, A. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy: opportunities and pitfalls of serological diagnosis. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 12, n. 6, p. 504-512, 2006.

SOARES, J. A. S.; CARVALHO, S. F. G.; CALDEIRA, A. P. Profile of pregnant women and children treated at a reference center for congenital toxoplasmosis in the Northern State of Minas Gerais, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 1, p. 55-59, 2012.

STERKERS, Y.; VARLET-MARIE, E.; MARTY, P.; BASTIEN, P.; ANOFEL TOXOPLASMA-PCR QUALITY CONTROL GROUP. Diversity and evolution of methods and practices for the molecular diagnosis of congenital toxoplasmosis in France: a 4-year survey. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 10, p. 1594-1602, 2010.

SYROCOT (SYSTEMATIC REVIEW ON CONGENITAL TOXOPLASMOSIS); THIÉBAUT, R.; LEPROUST, S.; CHÊNE, G.; GILBERT, R. Effectiveness of prenatal treatment for congenital toxoplasmosis: a meta-analysis of individual patients' data. **Lancet**, v. 369, n. 9556, p. 115-122, 2007.

TEKKESIN, N. Diagnosis of toxoplasmosis in pregnancy: a review. **HOAJ Biology**, v. 1, p. 1-8, 2012.

TORRES, E.; RIVERA, R.; CARDONA, N.; SANCHEZ, V.; LORA, F.; GÓMEZ-MARÍN, J. E. Evaluation of IgG anti-*Toxoplasma* avidity and polymerase chain reaction in the postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 32, n. 6, p. 693-695, 2013.

VALDÈS, V.; LEGAGNEUR, H.; WATRIN, V.; PARIS, L.; HASCOËT, J. M. Congenital toxoplasmosis due to maternal reinfection during pregnancy. **Archives de Pédiatrie**, v. 18, n. 7, p. 761-763, 2011.

VAZ, R. S.; RAULI, P.; MELLO, R. G.; CARDOSO, M. A. Toxoplasmose congênita: uma doença negligenciada? Atual política de saúde pública brasileira. **Field Actions Science Reports**, v. 3, 2011.

VILLENA, I.; ANCELLE, T.; DELMAS, C.; GARCIA, P.; BREZIN, A. P.; THULLIEZ, P.; WALLON, M.; KING, L.; GOULET, V.; TOXOSURV NETWORK; NATIONAL REFERENCE CENTRE FOR TOXOPLASMOSIS. Congenital toxoplasmosis in France in 2007: first results from a national surveillance system. **Euro Surveillance**, v. 15, n. 25, 2010.

VILLENA, I.; CHEMLA, C.; QUEREUX, C.; DUPOUY, D.; LEROUX, B.; FOUDRINIER, F.; PINON, J. M. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis transmitted by an immunocompetent woman infected before conception. Reims Toxoplasmosis Group. **Prenatal Diagnosis**, v. 18, n. 10, p. 1079-1081, 1998.

WALLON, M.; LIOU, C.; GARNER, P.; PEYRON, F. Congenital toxoplasmosis: systematic review of evidence of efficacy of treatment in pregnancy. **BMJ**, v. 318, n. 7197, p. 1511-1514, 1999.

WALLON, M.; PEYRON, F.; CORNU, C.; VINAULT, S.; ABRAHAMOWICZ, M.; KOPP, C. B.; BINGUET, C. Congenital *Toxoplasma* infection: monthly prenatal screening decreases transmission rate and improves clinical outcome at age 3 years. **Clinical Infectious Diseases**, v. 56, n. 9, p. 1223-1231, 2013.

WILSON, M. B.; NAKANE, P. K. Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In: Knapp, W.; Holubar, K.; Wick, G. (Eds.), **Immunofluorescence and related staining techniques**. Amsterdam: Elsevier North Holland Biomedical Press, pp.215-224, 1978.

WOLF, A.; COWEN, D.; PAIGE, B. Human toxoplasmosis: occurrence in infants as an encephalomyelitis verification by transmission to animals. **Science**, v. 89, n. 2306, p. 226-227, 1939.

CAPÍTULO III

Detecção de IgG total e subclasses específicas a antígenos de Toxoplasma gondii em amostras pareadas de soros de mães com toxoplasmose primária durante a gestação e recém-nascidos com suspeita de infecção congênita

RESUMO

O diagnóstico da infecção humana por *Toxoplasma gondii* é uma tarefa crítica e desafiadora, principalmente em gestantes com infecção primária e fetos e recém-nascidos com infecção congênita, e se baseia principalmente na detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA por meio de ensaios sorológicos. Há a necessidade da descoberta de marcadores diagnósticos mais precisos que permitam distinguir a infecção aguda daquela adquirida num passado recente, além de identificar precocemente recém-nascidos portadores de infecção congênita. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo obter diferentes frações antigênicas derivadas do antígeno solúvel de taquizoítas de *T. gondii* (STAg) e utilizá-las para a detecção de IgG total e suas subclasses em amostras pareadas de soros de mães e recém-nascidos (RNs) com sorologia presuntiva de toxoplasmose recente. Um total de 28 pares de amostras de soros de mães e RNs foram divididas em dois grupos, de acordo com os resultados sorológicos obtidos por ELISA indireto (IgG) e ELISA de captura (IgM), sendo (GI) formado por mães com infecção recente e RNs com infecção congênita (Mãe IgG⁺ IgM⁺ e RN IgG⁺ IgM⁺) (n = 12 pares); e (GII) por mães com infecção recente e RNs sem infecção congênita (Mãe IgG⁺ IgM⁺ e RN IgG⁺ IgM⁻) (n = 16 pares). Frações de STAg (STAg 0-30%, STAg 30-40%, STAg 40-50%, STAg 50-60%, STAg 60-70% e STAg 70-80%) foram obtidas por meio de precipitação em concentrações crescentes de sulfato de amônio e utilizadas para a detecção de IgG total nas amostras pareadas dos grupos GI e GII por *immunoblotting*. Houve uma grande variedade de bandas antigênicas reconhecidas por anticorpos IgG presentes nas amostras de soros dos grupos GI e GII, tanto no STAg total quanto nas frações obtidas por precipitação em sulfato de amônio. Porém, esta variedade diminuiu à medida que se aumentou a concentração de sulfato de amônio utilizada na precipitação do antígeno. Assim, a fração STAg 30-40% foi utilizada posteriormente, juntamente com STAg total, para a detecção de subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) anti-*T. gondii* nas amostras pareadas dos grupos GI e GII. A análise das bandas antigênicas do STAg reconhecidas por anticorpos IgG1 demonstrou o reconhecimento de bandas de 17 a 135 kDa pelas amostras dos grupos GI e GII, com resultados muito similares entre os dois grupos e muito similares aos observados com IgG total, mas sem o reconhecimento de bandas diferenciais pelos soros dos RNs em relação aos soros maternos. Para IgG2, houve o reconhecimento de uma variedade bem menor de bandas, sendo que os soros dos RNs do grupo GI reconheceram as mesmas bandas que os soros maternos, com frequências idênticas, enquanto os RNs do grupo GII também reconheceram as mesmas bandas que os soros maternos, mas com frequências bem menores. Quanto à detecção de IgG3 usando STAg total, observou-se uma maior variedade de bandas reconhecidas pelo grupo GI, com maior frequência que GII. Quanto à IgG4, uma menor variedade de bandas foram reconhecidas no STAg, com maior frequência pelos soros do grupo GI. Na fração STAg 30-40%, todas as subclasses de IgG dos soros dos grupos GI e GII reconheceram uma menor variedade de bandas antigênicas, com menor frequência que o STAg, sem o reconhecimento de bandas diferenciais entre os grupos GI e GII e entre mães e RNs do grupo I. A utilização de frações antigênicas obtidas a partir de precipitação do STAg no diagnóstico da toxoplasmose humana se mostrou interessante na detecção de anticorpos IgG e suas subclasses, permitindo diferenciação entre amostras positivas e negativas, mas não se mostrou uma boa alternativa no diagnóstico da toxoplasmose congênita, com resultados considerados inferiores aos do STAg, em função da menor frequência de bandas antigênicas reconhecidas e da ausência de reconhecimento diferencial de antígenos pelos soros dos RNs.

Palavras-chave: Toxoplasmose congênita. Subclasses de IgG. *Immunoblotting*. Pares mãe/recém-nascido. STAg. Frações antigênicas.

ABSTRACT

The diagnosis of human infection with Toxoplasma gondii is a critical and challenging task, especially in pregnant women with primary infection and fetuses and newborns with congenital infection, and it is based mainly on the detection of IgG, IgM and IgA antibodies by serological tests. In this context, the present study aimed to obtain different antigenic fractions derived from soluble antigen of tachyzoites of T. gondii (STAg) and use them to detect total IgG and its subclasses in paired serum samples from mothers and newborns with presumptive serology of recent toxoplasmosis. A total of 28 pairs of serum samples from mothers and newborns were divided into two groups according to the serological results obtained by indirect ELISA (IgG) and capture ELISA (IgM), being (GI) mothers with recent infection and their newborns with congenital infection (mother IgG⁺ IgM⁺ and newborn IgG⁺ IgM⁺) (n=12 pairs); and (GII) mothers with recent infection and newborns without congenital infection (mother IgG⁺ IgM⁺ and newborn IgG⁺ IgM⁻) (n=16 pairs). STAg fractions (STAg 0-30%, STAg 30-40%, STAg 40-50%, STAg 50-60%, STAg 60-70%, and STAg 70-80%) were obtained by precipitation with increasing concentrations of ammonium sulfate and used for detection of total IgG in paired samples from GI and GII by immunoblotting. There was a variety of antigenic bands recognized by IgG antibodies from the sera of groups GI and GII, both in total STAg as in the fractions obtained by precipitation in ammonium sulfate. However, this variety has decreased according to increasing the ammonium sulfate concentration used in the precipitation of the antigen. Thus, STAg 30-40% fraction was subsequently used along with the total STAg for the detection of IgG subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4) anti-T. gondii in paired samples from the GI and GII. The analysis of antigenic bands recognized by the IgG1 antibodies showed bands from 17-135 kDa recognized by sera of GI and GII when using STAg, with very similar results in both groups and very similar to the results observed with total IgG total, but without recognition of differential bands by sera of neonates compared to maternal sera. As for IgG2, there was recognition of a much smaller variety of bands, and sera from newborns in GI group recognized the same bands that maternal sera, with identical frequencies, while newborns from GII group also recognized the same bands that maternal sera, but with much lower frequencies. For the detection of IgG3 using total STAg, we observed a greater variety of bands recognized by GI group, with greater frequency than GII. Regarding IgG4, a smaller variety of bands were recognized in STAg more frequently by sera from GI. In STAg 30-40% fraction, all IgG subclasses from sera of groups GI and GII recognized a smaller variety of antigenic bands with lower frequency than total STAg, without the recognition of differential bands between GI and GII groups and between mothers and newborns from group GI. The use of antigenic fractions obtained from STAg precipitation in the diagnosis of human toxoplasmosis proved to be interesting to detect IgG and its subclasses, allowing differentiation between positive and negative samples, but it was not a good alternative for the diagnosis of congenital toxoplasmosis, presenting results considered inferior to the STAg, due to the lower frequency of recognized antigenic bands and the absence of differential recognition of antigens by sera of newborns.

Keywords: Congenital toxoplasmosis. IgG subclasses. Immunoblotting. Pairs mother/newborn. STAg. Antigenic fractions.

1 INTRODUÇÃO

O diagnóstico da infecção humana por *Toxoplasma gondii* é uma tarefa crítica e desafiadora para determinados grupos de pacientes, dentre eles as gestantes que adquirem a infecção primária durante a gestação, além de fetos e recém-nascidos que adquirem a infecção congênita (KAYE, 2011; REMINGTON et al., 2006; SENSINI, 2006).

Os principais métodos utilizados para o diagnóstico da infecção por *T. gondii* são os ensaios sorológicos, que visam, principalmente, a avaliação qualitativa e quantitativa de anticorpos específicos dos isotipos IgG, IgM e IgA. Por estes métodos, a detecção de anticorpos IgM específicos corresponde ao marcador sorológico mais frequentemente utilizado para o diagnóstico da infecção aguda ou recente, uma vez que um teste positivo para IgG estabelece apenas que o indivíduo teve contato prévio com *T. gondii*, o qual pode não ter sido recente. Entretanto, o elevado percentual de resultados falso-positivos para IgM e a persistência de níveis circulantes e detectáveis deste isotipo de anticorpo por períodos prolongados no soro do paciente (acima de 12 meses em alguns casos) fundamentam o conceito de que a presença isolada de anticorpos IgM específicos não confirma o diagnóstico de infecção aguda por *T. gondii* (KAYE, 2011; ROBERT-GANGNEUX, 2014). Outros métodos laboratoriais auxiliares, como a detecção de anticorpos IgA e IgE, também marcadores de infecção aguda, apresentam limitações relacionadas à sensibilidade dos testes e às taxas variáveis de decaimento destes anticorpos no soro do paciente, que podem perdurar por intervalos de tempo variáveis (4 a 8 meses) (LEITE et al., 2008; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Na atualidade, o ensaio que mensura a avidéz de anticorpos IgG tem sido utilizado como um teste auxiliar em casos de amostras com resultados positivos para IgM, determinando, com maior segurança, em casos de alta avidéz, que a infecção primária ocorreu pelo menos há 3 ou 4 meses e afastar o risco de transmissão fetal nos resultados de alta avidéz obtidos no primeiro trimestre da gestação. Porém, o teste de avidéz apresenta duas importantes limitações: o fenômeno da maturação tardia da IgG, uma vez que 25% dos casos de infecção com 12 meses de duração apresentam IgG de baixa avidéz; e o grande percentual de pacientes (26,4%) com resultado de avidéz intermediária (ou *borderline*), de difícil interpretação (McLEOD et al., 2009; SENSINI, 2006; TORRES et al., 2013).

A sensibilidade e a especificidade dos ensaios sorológicos comumente utilizados no sorodiagnóstico da toxoplasmose humana são altamente dependentes do tipo de antígeno e da modalidade de teste utilizada. Assim, diferentes preparações antigênicas têm sido desenvolvidas: (1) antígenos solúveis e totais de taquizoítas contendo uma mistura de

antígenos de superfície e antígenos intracelulares obtidos por criólise, sonicação ou solubilização em detergentes, como o STAg (antígeno solúvel de taquizoítas de *T. gondii*) (MARCOLINO et al., 2000; RIBEIRO; SOUZA; MINEO, 2002); (2) taquizoítas fixados com formalina (contendo principalmente antígenos de superfície) (SILVA-DOS-SANTOS et al., 2012); (3) antígenos excretados e/ou secretados pelo parasita, como o ESA (*excreted/secreted antigens*) (YAMAMOTO et al., 1998); (4) proteínas nativas purificadas por meio de cromatografia de afinidade utilizando anticorpos monoclonais (CARVALHO et al., 2008); (5) proteínas recombinantes de antígenos imunodominantes do parasita (BÉLA et al., 2008; SANTANA et al., 2012). Desta forma, quanto maior o grau de purificação dos antígenos, maior é a especificidade do teste (ELISA utilizando proteínas nativas ou recombinantes) e, por outro lado, quanto menos purificada a preparação antigênica (ELISA utilizando antígeno total), maior é a probabilidade de ocorrência de reatividade cruzada e inespecífica (SENSINI, 2006).

Sendo assim, existe demanda crescente para o desenvolvimento de marcadores diagnósticos mais acurados que permitam distinguir infecção aguda daquela adquirida num passado recente, além de identificar precocemente recém-nascidos portadores de infecção congênita. O emprego de outros métodos e abordagens diagnósticas, utilizando diferentes preparações antigênicas para a detecção e mensuração dos níveis de anticorpos anti-*T. gondii* apresentam grande potencial para dar suporte a esse diagnóstico. Ao lado da necessidade destes novos conhecimentos, é imprescindível avaliar a dinâmica dos marcadores de infecção aguda ao longo do tempo, já que o contexto diagnóstico se altera de acordo com o tempo de infecção. Desta forma, o desenvolvimento de novos imunoensaios aplicados em estudos seccionais e longitudinais pode contribuir para avaliar a utilidade destes testes no diagnóstico envolvendo gestantes e recém-nascidos com suspeita clínica de toxoplasmose.

Porém, há poucos estudos avaliando a resposta de subclasses de IgG no diagnóstico da infecção humana por *T. gondii*. Em humanos, IgG1 é a subclasse predominante de IgG, a qual é sintetizada nas fases mais precoces da infecção, seguida pela síntese de baixos níveis de IgG2 e IgG3, enquanto IgG4 é sintetizada em níveis tão baixos, que pode não ser detectada durante a infecção (CORREA et al., 2007). Alguns estudos já demonstraram que a presença de anticorpos IgG3 e IgG4 sintetizados pelo feto congenitamente infectado poderia estar relacionada a sinais clínicos da infecção congênita, enquanto IgG1 corresponde à subclasse com perfil protetor. Além disso, sugere-se que subclasses de IgG podem ser usadas como marcadores de infecção congênita e podem estar associadas a sintomas e/ou sinais clínicos da toxoplasmose (CAÑEDO-SOLARES et al., 2008; SOUZA-E-SILVA et al., 2013).

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo obter diferentes frações antigênicas derivadas do antígeno solúvel de taquizoítas de *T. gondii* (STAg) por meio de precipitação em soluções com concentrações crescentes de sulfato de amônio e caracterizar estas diferentes frações quanto à composição de antígenos imunodominantes de *T. gondii* reconhecidos por anticorpos IgG presentes em amostras pareadas de soros de mães e recém-nascidos com sorologia presuntiva de toxoplasmose recente. Além disso, este trabalho também objetivou avaliar a detecção de subclasses de IgG nestas amostras pareadas de soros de mães e recém-nascidos pela técnica de *immunoblotting* usando STAg total e uma de suas frações obtidas por precipitação com sulfato de amônio.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Pacientes e amostras de soro

O presente estudo incluiu um total de 28 amostras pareadas de soros de mães e seus respectivos recém-nascidos (RN) provenientes do Banco de Amostras Biológicas do Laboratório de Imunoparasitologia da Universidade Federal de Uberlândia (LIP-UFU), cuja implantação e utilização foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da Universidade Federal de Uberlândia (CEP-UFU), mediante o parecer nº 041/2008, de 29 de fevereiro de 2008, em obediência às Resoluções nº CNS 347/05 e CNS 196/96 do Ministério da Saúde.

Estas amostras foram provenientes do Setor de Pediatria e Neonatologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU) e remetidas ao LIP-UFU desde 2005, em função de um projeto estabelecido entre este laboratório e o referido setor do HC-UFU. Por este projeto, amostras pareadas de soros de mães e recém-nascidos atendidos no HC-UFU, com suspeita de infecção materna primária por *T. gondii* durante a gestação ou suspeita de toxoplasmose congênita no recém-nascido, eram remetidas ao LIP para a detecção de anticorpos IgM e IgA específicos. Uma vez realizados tais testes, estas amostras pareadas eram identificadas e estocadas a -20°C no LIP e sua posterior utilização em protocolos experimentais foi autorizada pelo CEP-UFU, conforme o parecer supracitado.

Para este estudo foram incluídas 28 amostras pareadas de soros de mães e recém-nascidos, divididas em dois grupos, de acordo com o perfil sorológico da infecção por *T. gondii*, conforme determinado a partir dos resultados de ELISA indireto para detecção de anticorpos IgG e ELISA de captura para detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii*. De acordo com os resultados obtidos por meio destes ensaios sorológicos convencionais e conforme os critérios de seleção, os pares de amostras foram assim divididos:

(1) **Grupo I (GI):** 12 pares de soros, em que a mãe apresentava sorologia sugestiva de infecção recente e o respectivo RN apresentava sorologia sugestiva de infecção congênita, ambas definidas pela presença de anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii* (Mãe IgG⁺ IgM⁺ e RN IgG⁺ IgM⁺) (Figura 1A). Além disso, a ocorrência de toxoplasmose congênita nos RNs deste grupo foi confirmada a partir da análise de seus respectivos prontuários clínicos no Setor de Arquivo Médico do HC-UFU, com a observação de alterações clínicas e evolução sorológica compatíveis com a infecção congênita durante acompanhamento do RN no Setor de Pediatria e Neonatologia do HC-UFU até 1 ano de idade, em média.

(2) **Grupo II (GII):** 16 pares de soros, em que a mãe apresentava sorologia sugestiva de infecção recente, definida pela presença de anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii*, e o RN apresentava sorologia sugestiva de ausência de infecção congênita, definida pela presença de anticorpos IgG (possivelmente de origem materna) e ausência de anticorpos IgM específicos a *T. gondii* (Mãe IgG⁺ IgM⁺ e RN IgG⁺ IgM⁻) (Figura 1B). Além disso, a ausência de toxoplasmose congênita nos RNs deste grupo foi confirmada a partir da análise de seus respectivos prontuários clínicos no Setor de Arquivo Médico do HC-UFU, com a observação da ausência de alterações clínicas associadas à infecção congênita, bem como evolução sorológica compatível com ausência de infecção durante acompanhamento do RN no Setor de Pediatria e Neonatologia do HC-UFU até 1 ano de idade, em média.

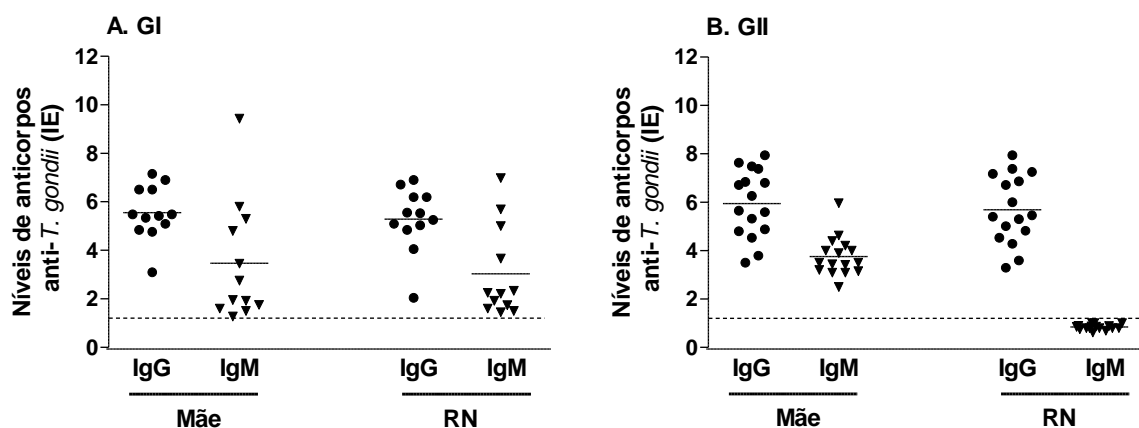


Figura 1 - Distribuição das amostras pareadas de soros de mães e recém-nascidos (RN) em dois grupos, de acordo com os resultados obtidos a partir de ELISA indireto para detecção de anticorpos IgG e ELISA de captura para detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii*. (A) Grupo I (GI) - soros de mães com sorologia sugestiva de toxoplasmose primária adquirida durante a gestação, e de seus respectivos RNs, com sorologia sugestiva de toxoplasmose congênita, ambos definidos pela presença de anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii* (n = 12 pares); (B) Grupo II (GII) - soros de mães com sorologia sugestiva de toxoplasmose primária adquirida durante a gestação, definida pela presença de anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii*, e de seus respectivos RNs, com sorologia sugestiva de ausência de infecção congênita, definida pela presença de anticorpos IgG, mas ausência de anticorpos IgM anti-*T. gondii* (n = 16 pares). Os resultados são expressos em Índice ELISA (IE), as barras horizontais indicam as médias dos valores de IE e a linha pontilhada indica o limite de positividade das reações (IE > 1,2).

2.2 Manutenção e obtenção de parasitas

A manutenção e obtenção de formas taquizoítas da cepa RH de *T. gondii* foram feitas por meio de inoculação intraperitoneal em camundongos Swiss ou BALB/c, a partir de

passagens seriadas em intervalos de 48-72 horas de um inóculo de aproximadamente 1×10^6 taquizoítas obtidos do exsudato peritoneal de camundongos previamente infectados, conforme descrito por Mineo, Camargo e Ferreira (1980) e também no Capítulo II (seção 2.2) deste trabalho.

2.3 Preparação de antígeno solúvel de *T. gondii*

Antígeno solúvel de taquizoítas de *T. gondii* (STAg) foi preparado como descrito por Carvalho e colaboradores (2008), com algumas modificações, conforme apresentado no Capítulo II (seção 2.3) deste trabalho.

2.4 Ensaios imunoenzimáticos - ELISA indireto e ELISA de captura IgM

Para a caracterização do perfil sorológico das amostras pareadas de soros de mães e RNs com relação à infecção por *T. gondii*, para posterior composição dos grupos de análises, ensaios imunoenzimáticos (ELISA) foram realizados para a detecção de anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii*. A detecção de anticorpos IgG foi feita pela técnica de ELISA indireto, conforme descrito previamente (CARVALHO et al., 2008; MINEO; CAMARGO; FERREIRA, 1980), com algumas modificações, como apresentado no Capítulo II (seção 2.4.1) deste trabalho. A detecção de anticorpos IgM foi feita pela técnica de ELISA de captura, de acordo com protocolo anteriormente descrito (CARVALHO et al., 2008; MINEO et al., 1986), com algumas modificações, conforme apresentado no Capítulo II (seção 2.4.2) deste trabalho.

2.5 Análises de prontuários clínicos

Com o objetivo de se obter informações clínicas das 28 mães e seus respectivos RNs, que tiveram suas amostras de soro utilizadas neste estudo, análises de seus prontuários clínicos foram realizadas no Setor de Arquivo Médico do HC-UFU, mediante autorização do responsável pelo setor. Esta análise de prontuários visou principalmente a obtenção de informações que permitissem confirmar ou excluir a possibilidade de infecção congênita nos RNs, a partir de dados referentes à ocorrência de alterações clínicas e da evolução sorológica destes RNs durante acompanhamento realizado no Setor de Pediatria e Neonatologia do HC-

UFU. Descrição mais completa quanto à análise de prontuários é apresentada no Capítulo II (seção 2.5) deste trabalho.

2.6 Precipitação de STAg em gradiente de concentração crescente de sulfato de amônio

Antígeno solúvel de taquizoítas de *T. gondii* (STAg) foi fracionado por precipitação sequencial em gradiente crescente de concentração de sulfato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$, a partir de modificação dos métodos descritos previamente por Yamamoto e colaboradores (1998) e por Cespedes e colaboradores (2000). Primeiramente, a uma solução de STAg foi adicionado lentamente (gota a gota), sob agitação, em banho de gelo, o volume necessário de uma solução de sulfato de amônio 100% concentrada até se obter uma solução final com concentração de 30% de sulfato de amônio. Esta solução foi mantida em repouso por 18 horas a 4°C e, posteriormente, foi centrifugada (12.000 x g, 15 minutos, 4°C) e o sobrenadante foi coletado. O sedimento foi ressuspensionado em PBS e dialisado por 48 hs contra PBS a 4°C com pelo menos duas trocas diárias da solução, para remoção do resíduo de sulfato de amônio, sendo denominada fração de STAg precipitada com 30% de sulfato de amônio (STAg 0-30%). O sobrenadante (concentração de até 30% de sulfato de amônio) foi incubado lentamente, nas mesmas condições anteriores, com o volume necessário de uma solução de sulfato de amônio 100% concentrada até se elevar a concentração final da solução a 40% de sulfato de amônio. Após incubação por 18 horas a 4°C e centrifugação nas mesmas condições anteriores, o sobrenadante foi coletado e o sedimento tratado como anteriormente, sendo denominado fração de STAg precipitada com 30-40% de sulfato de amônio (STAg 30-40%). Esse procedimento foi repetido sequencialmente com os sobrenadantes resultantes até a obtenção das frações antigênicas de STAg precipitadas em diferentes concentrações de sulfato de amônio (frações STAg 40-50%, STAg 50-60%, STAg 60-70% e STAg 70-80%, respectivamente). Todas as frações antigênicas foram aliqüotadas e, após a determinação da concentração proteica pelo método de Bradford (1976), foram estocadas a -80°C até a utilização.

2.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

As frações antigênicas obtidas a partir da precipitação sequencial de STAg em gradiente de concentração crescente de sulfato de amônio foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme método

descrito por Laemmli (1970). Os extratos de STAg total e das frações antigênicas de *T. gondii* obtidas por precipitação em sulfato de amônio (STAg 0-30%, STAg 30-40%, STAg 40-50%, STAg 50-60%, STAg 60-70% e STAg 70-80%), com teor proteico aproximado de 10 µg por poço, foram solubilizadas (v/v) em tampão de amostra para eletroforese (Tris-HCl 0,1 M, SDS 4%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0,2%), aquecidos a 100°C durante 5 minutos e submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%, com gel de empilhamento a 5%, em condições desnaturantes e não redutoras. A corrida foi realizada utilizando-se o sistema de eletroforese vertical em mini-gel (*Hoefer Pharmacia Biotech Inc.*, São Francisco, CA, EUA), sob corrente constante de 26 mA por cerca de 1 hora. Em poço paralelo às amostras, foi aplicado um volume de 5 µL de marcador de peso molecular (*BenchMarkTM Protein Ladder 10-220 kDa*, Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha). Para a visualização das bandas proteicas, o gel foi corado com nitrato de prata, utilizando-se kit comercial de coloração de gel com prata, seguindo-se as instruções do fabricante. Posteriormente, a imagem do gel foi digitalizada e o padrão de mobilidade das bandas proteicas de cada fração foi analisado pelo programa computacional *Kodak Digital Science 1D Image* (*Kodak*, Rochester, EUA), para determinação das massas moleculares aparentes das bandas obtidas, em comparação com o perfil de migração dos padrões de pesos moleculares.

2.8 Immunoblotting para caracterização antigênica das frações de STAg obtidas a partir da precipitação em sulfato de amônio

A reação de *immunoblotting* foi realizada para a avaliação do perfil antigênico da preparação de STAg total e de suas frações obtidas a partir de precipitações sequenciais em soluções com concentrações crescentes de sulfato de amônio (STAg 0-30%, STAg 30-40%, STAg 40-50%, STAg 50-60%, STAg 60-70% e STAg 70-80%). Após a separação eletroforética das proteínas de STAg e das respectivas frações, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose com poros de 0,22 µm (*Sigma-Aldrich Chemical Co.*, St. Louis, MO, EUA), como previamente descrito (TOWBIN; STAEBELIN; GORDON, 1979), utilizando-se um sistema semi-úmido de transferência (*Multiphor Novablot II*, *Pharmacia-LKB*, Suécia) por 2 horas a uma corrente constante de 0,8 mA/cm² do gel. A eficiência da transferência foi confirmada pela coloração das membranas com solução de Ponceau a 0,5%.

As membranas de nitrocelulose previamente eletrotransferidas com antígenos solúveis totais (STAg) ou com as frações precipitadas em sulfato de amônio foram cortadas em tiras de aproximadamente 3 mm de largura e colocadas em canaletas apropriadas para reação. As tiras

foram bloqueadas com solução de PBS-T suplementada com leite desnatado a 5% (PBS-TM) durante 2 horas a 37°C. Após lavagem 1 vez com PBS-TM a 1%, as membranas foram incubadas com amostras pareadas de soros de mães e RNs dos grupos GI e GII, descritos anteriormente, diluídas 1:100 em PBS-TM 1% e incubadas por 18 horas a 4°C, sob agitação pendular. Nesta etapa de caracterização antigênica das frações de STAg foram utilizados apenas 4 pares de amostras de soros de cada grupo (GI e GII). Além disso, para cada reação, como controle negativo, foi incluída uma amostra com sorologia negativa para *T. gondii*, caracterizada pela ausência de anticorpos IgG e IgM específicos.

Após o período de incubação com as amostras de soros, as tiras foram submetidas a 5 ciclos de lavagens com PBS-T 0,05% e incubadas com anticorpo anti-IgG humana conjugado com peroxidase diluído 1:2000 em PBS-TM 1% (*Sigma-Aldrich Chemical Co.*, St. Louis, MO, EUA). Após incubação por 2 horas à temperatura ambiente, sob agitação pendular, as tiras foram lavadas 5 vezes em PBS-T 0,05% e reveladas pela adição de solução reveladora comercial contendo substrato enzimático H₂O₂ e cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (*Stable DAB*, Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha). As reações foram interrompidas pela retirada da solução reveladora e adição de água destilada quando bandas de coloração marrom foram visualizadas nas tiras. Posteriormente, as imagens de cada tira foram digitalizadas e o padrão de mobilidade das bandas antigênicas coradas em cada uma delas foi analisado pelo programa computacional *Kodak Digital Science 1D Image* (*Kodak*, Rochester, EUA), para determinação das massas moleculares aparentes das bandas obtidas, em comparação com o perfil de migração dos padrões de pesos moleculares.

2.9 Immunoblotting para detecção de subclasses de IgG anti-*T. gondii* em amostras pareadas de soros de mães e recém-nascidos

Após a caracterização das bandas antigênicas presentes em cada fração de STAg obtida a partir de precipitação em sulfato de amônio e reconhecidas por anticorpos IgG presentes em amostras pareadas de soros de mães e RNs, novas reações de *immunoblotting* usando STAg e a fração STAg 30-40% foram realizadas para a detecção das subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) anti-*T. gondii* nas amostras pareadas de soros de mães e RNs dos grupos GI (n = 12 pares) e GII (n = 16 pares), com algumas modificações do protocolo de detecção de IgG total apresentado anteriormente.

Após a separação eletroforética das proteínas do STAg e da fração STAg 30-40% e eletrotransferência para membranas de nitrocelulose, tiras de aproximadamente 3 mm de

largura foram cortadas e colocadas em canaletas apropriadas para reação, onde foram bloqueadas com solução de PBS-T suplementada com leite desnatado a 5% (PBS-TM) para detecção de IgG1, ou com PBS-TM a 1% para detecção de IgG2, IgG3 e IgG4, durante 2 horas a 37°C. Posteriormente, as membranas foram incubadas com as amostras pareadas de soros de mães e RNs dos grupos GI e GII, diluídas 1:200 em PBS-TM 1% (IgG1), 1:50 em PBS-TM 0,5% (IgG3) e 1:25 em PBS-TM 0,5% (IgG2 e IgG4) por 18 horas a 4°C, sob agitação pendular. Além disso, para cada reação, como controle negativo, foi incluída uma amostra de soro com sorologia negativa para *T. gondii*.

Após o período de incubação com as amostras de soros, as tiras foram submetidas a 5 ciclos de lavagens com PBS-T 0,05% e incubadas com os respectivos anticorpos de detecção conjugados com biotina nas seguintes diluições: 1:3000 em PBS-TM 1% (anti-IgG1), 1:1000 em PBS-TM 0,5% (anti-IgG3) e 1:500 em PBS-TM 0,5% (anti-IgG2 e anti-IgG4) (*Sigma-Aldrich Chemical Co.*, St. Louis, MO, EUA). Após incubação por 2 horas à temperatura ambiente, sob agitação pendular, as tiras foram lavadas 5 vezes em PBS-T 0,05% e incubadas novamente por 30 minutos à temperatura ambiente, sob agitação pendular, com streptavidina conjugada com peroxidase diluída 1:1000 em PBS-TM 1% (IgG1), e 1:500 em PBS-TM 0,5% (IgG2, IgG3 e IgG4) (*Sigma-Aldrich Chemical Co.*, St. Louis, MO, EUA). As etapas de revelação e análise das bandas antigênicas reconhecidas por estes anticorpos foram feitas conforme descrito anteriormente (seção 2.8).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Perfil eletroforético do antígeno solúvel de taquizoítas de *T. gondii* (STAg) e suas frações obtidas por precipitação em concentrações crescentes de sulfato de amônio

O mecanismo de precipitação de proteínas com sais baseia-se no aumento da força iônica do sistema. Desta forma, quando pequenas quantidades de sal são adicionadas a uma solução contendo proteínas, ocorre uma interação destas com as cargas dos íons provenientes da dissociação do sal, com a consequente diminuição da interação entre as proteínas, aumentando sua solubilidade no meio aquoso. Porém, em condições de elevada força iônica, decorrente da adição de grandes quantidades de sal, verifica-se um efeito oposto, em que as moléculas de água interagem mais fortemente com os íons provenientes da dissociação do sal, promovendo assim a desidratação das proteínas. Durante esse processo, a interação entre as proteínas se torna mais forte, diminuindo sua solubilidade em meio aquoso, de modo a ocorrer a precipitação das proteínas. Esse processo é também conhecido por *salting-out* (NELSON; COX, 2011).

A precipitação de proteínas pelo gradativo aumento da concentração de sais é um processo amplamente utilizado para a separação de proteínas presentes em preparações proteicas complexas, uma vez que a concentração de sal necessária para precipitação é diferente para cada proteína. Dentre os sais utilizados em ensaios de precipitação de proteínas, o sulfato de amônio é um dos mais usados, em função de sua alta solubilidade, baixo custo e baixa toxicidade (BETTELHEIM et al., 2011).

Neste sentido, concentrações gradativas de sulfato de amônio foram utilizadas para fracionar diferentes componentes proteicos presentes no antígeno solúvel de taquizoítas de *T. gondii* (STAg), visando obter diferentes frações antigênicas que pudessem representar alternativas no diagnóstico sorológico da toxoplasmose humana, especialmente naquelas situações mais críticas, como a infecção primária em gestantes e puérperas e a infecção congênita em recém-nascidos.

Primeiramente, para análise do perfil proteico apresentado pelo STAg e suas frações obtidas a partir de precipitação em concentrações crescentes de sulfato de amônio, cada uma destas preparações antigênicas foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida 12% e o gel obtido foi corado posteriormente com nitrato de prata (Figura 2A).

Todas as frações antigênicas apresentaram uma grande variedade de bandas proteicas, com a observação de que o perfil eletroforético das frações de STAg obtidas, respectivamente,

a partir de precipitação em sulfato de amônio a 30% (STAg 0-30%) e a 40% (STAg 30-40%) é muito similar ao perfil eletroforético de STAg total. Por outro lado, a fração de STAg obtida a partir de precipitação em sulfato de amônio a 50% (STAg 40-50%) apresenta duas bandas proteicas mais fortemente coradas, com massas moleculares aparentes de 38 e 43 kDa, respectivamente, conforme determinado a partir da análise da migração eletroforética pelo programa computacional *Kodak Digital Science 1D Image*. A fração STAg 50-60% também apresenta duas bandas proteicas mais fortemente coradas, com massas moleculares aparentes de 28 e 30-31 kDa, respectivamente, enquanto a fração de STAg 60-70% também apresenta estas duas bandas proteicas (28 e 30-31 kDa) mais fortemente coradas, além de outra banda com massa molecular aparente de 24 kDa. E, finalmente, a fração STAg 70-80% apresenta pelo menos quatro bandas proteicas mais fortemente coradas, com massas moleculares aparentes de 24, 30, 31-32 e 43 kDa, respectivamente (Figura 2A).

3.2 Perfil antigênico do STAg e de suas frações obtidas por precipitação em concentrações crescentes de sulfato de amônio

A avaliação do perfil de antígenos de *T. gondii* presentes no STAg e em cada uma de suas frações obtidas a partir de precipitação em concentrações crescentes de sulfato de amônio e reconhecidos por anticorpos IgG de amostras de soros humanos foi realizada por meio de reação de *immunoblotting*, conduzida após separação eletroforética de cada uma das preparações antigênicas em gel de poliacrilamida 12% e transferência para membrana de nitrocelulose. Inicialmente, a reação foi realizada com apenas uma amostra de soro humano de paciente com sorologia sugestiva de infecção crônica por *T. gondii*, definida pela presença de anticorpos IgG e ausência de anticorpos IgM específicos (Figura 2B).

A análise dos resultados desta reação revela que o perfil antigênico das frações de STAg obtidas, respectivamente, a partir de precipitação em sulfato de amônio a 30% (STAg 0-30%) e a 40% (STAg 30-40%) é muito similar ao perfil antigênico de STAg total, a exemplo do que foi observado com o perfil proteico destas frações. Por outro lado, as demais frações de STAg apresentaram uma menor quantidade de bandas antigênicas reconhecidas por anticorpos IgG presentes na amostra de soro humano testada, chamando-se a atenção para o fato de que as frações STAg 60-70% e STAg 70-80% apresentaram algumas bandas de alto peso molecular reconhecidas por anticorpos IgG presentes nesta amostra de soro humano, mas as demais bandas reconhecidas concentraram-se na região próxima ao antígeno imunodominante de 30 kDa (Figura 2B).

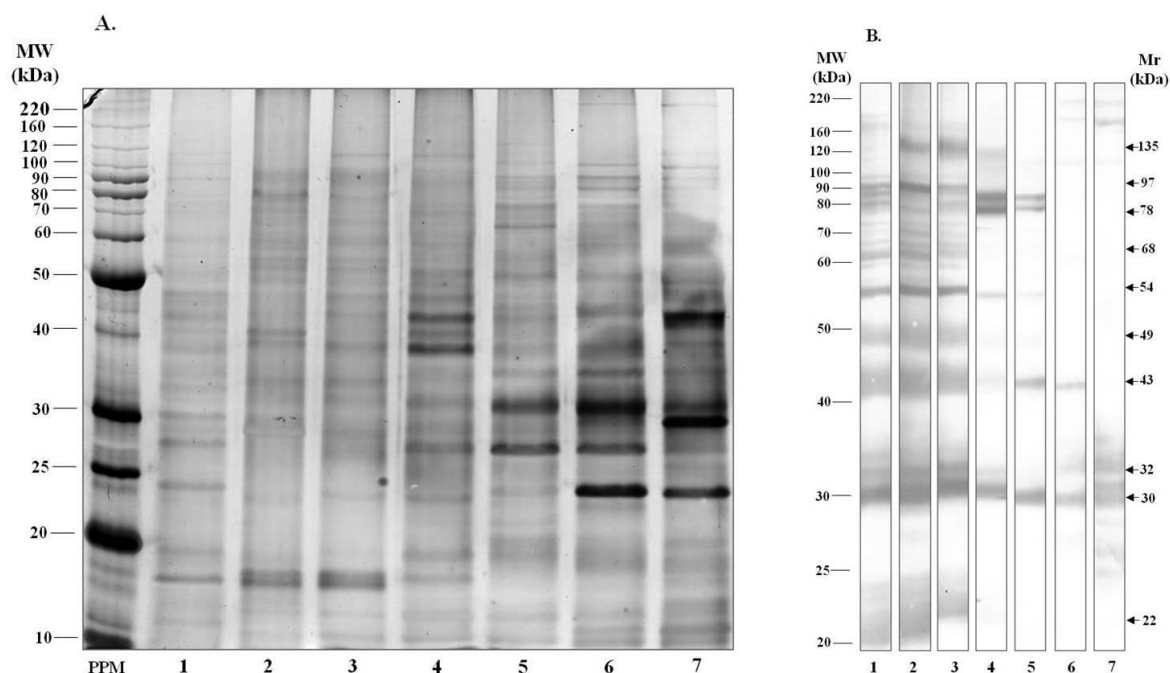


Figura 2 - Perfil proteico (A) e antigênico (B) do antígeno solúvel de taquizoítas de *T. gondii* (STAg) e suas frações obtidas por precipitação em concentrações crescentes de sulfato de amônio. (A) Gel de poliácridamida 12% (SDS-PAGE) corado com nitrato de prata, apresentando o padrão de pesos moleculares (PPM) de 10 a 220 kDa ((BenchMark™ Protein Ladder 10-220 kDa, Invitrogen) e o perfil eletroforético de STAg total e suas frações obtidas a partir de precipitações sequenciais em soluções com concentrações crescentes de sulfato de amônio. (B) *Immunoblot* representativo das principais bandas antigênicas de STAg total e de suas frações obtidas a partir de precipitações sequenciais em soluções com concentrações crescentes de sulfato de amônio reconhecidas por amostra de soro humano de paciente com sorologia sugestiva de infecção crônica por *T. gondii*, definida pela presença de anticorpos IgG e ausência de anticorpos IgM específicos. (1) STAg total; (2) Fração de STAg obtida por precipitação em solução de sulfato de amônio a 30% (Fração STAg 0-30%); (3) Fração STAg 30-40%; (4) Fração STAg 40-50%; (5) Fração STAg 50-60%; (6) Fração STAg 60-70%; e (7) Fração STAg 70-80%. Pesos moleculares (MW) dos padrões, expressos em kiloDalton (kDa), estão indicados à esquerda. Massas moleculares aparentes (Mr), expressas em kDa, estão indicadas à direita e foram analisadas pelo *software Kodak Digital Science 1D*.

Pela análise dos resultados do perfil proteico e do perfil de antígenos reconhecidos por anticorpos IgG presentes em amostra de soro humano, observa-se que as diferentes frações de STAg obtidas por precipitação com sulfato de amônio apresentam diferentes componentes antigênicos, reconhecidos de maneira diferenciada por anticorpos IgG anti- *T. gondii*.

3.3 Antígenos do STAg e suas frações precipitadas em sulfato de amônio reconhecidos por anticorpos IgG presentes em amostras pareadas de soros de mães e recém-nascidos

A partir da observação da composição antigênica distinta entre as diferentes frações de STAg obtidas por precipitação com sulfato de amônio, reações de *immunoblotting* foram

conduzidas com o objetivo de se avaliar o perfil de bandas antigênicas presentes no STAg total e em suas frações reconhecidas por anticorpos IgG presentes em amostras pareadas de soros de mães e recém-nascidos (RNs). Tais reações foram desenvolvidas com amostras pareadas de soros dos grupos GI e GII, conforme descrito em Material e Métodos (seção 2.1), utilizando-se nesta análise inicial apenas 4 pares de amostras por grupo (Figura 3).

Analisando-se o perfil de reconhecimento, observou-se uma grande variedade de bandas antigênicas reconhecidas por anticorpos IgG presentes nas amostras de soros dos grupos GI e GII, tanto no STAg total quanto nas frações obtidas por precipitação em sulfato de amônio. Porém, esta variedade diminuiu à medida que se aumentou a concentração de sulfato de amônio utilizada na precipitação do antígeno. Assim, as frações STAg 0-30%, STAg 30-40% e STAg 40-50% apresentaram uma variedade de bandas antigênicas muito similar à observada no STAg total, mas as demais frações (STAg 50-60%, STAg 60-70% e STAg 70-80%) apresentaram uma variedade bem menor de bandas reconhecidas por anticorpos IgG. Inclusive, nas frações STAg 60-70% e STAg 70-80% há o reconhecimento de apenas algumas bandas antigênicas próximas ao antígeno imunodominante de *T. gondii* de 30 kDa (p30) (Figura 3).

Observou-se também que o perfil e a frequência de bandas antigênicas reconhecidas no STAg total e em suas frações por anticorpos IgG presentes em amostras de soros de recém-nascidos é muito similar ao observado com as amostras de soros de suas respectivas mães, de modo que todos os soros de RNs testados reconheceram os mesmos antígenos que os soros de suas respectivas mães, sem o reconhecimento de nenhuma banda diferencial nos dois grupos de amostras (GI e GII) em nenhuma das frações antigênicas (Figura 3). Tal reconhecimento diferencial seria especialmente promissor se observado nas amostras do grupo I, em que os testes sorológicos convencionais (ELISA) apontaram a ocorrência de infecção congênita nos RNs, a qual foi confirmada pelo quadro clínico e evolução sorológica durante acompanhamento de aproximadamente 1 ano. Bandas antigênicas reconhecidas de maneira diferencial pelos soros dos RNs permitiriam discriminar entre anticorpos IgG de origem materna e aqueles oriundos de síntese fetal, atestando a ocorrência de infecção congênita. Um antígeno reconhecido pelo soro do recém-nascido e não reconhecido pelo soro da mãe, ou um antígeno reconhecido com maior intensidade pelo soro do recém-nascido em relação ao soro da mãe, constituir-se-ia num excelente marcador molecular de infecção congênita (L'OLLIVIER et al., 2012; MACHADO et al., 2010; REMINGTON; THULIEZ; MONTOYA, 2004; ROBERT-GANGNEUX et al., 1999; TRIDAPALLI et al., 2008).

Figura 3

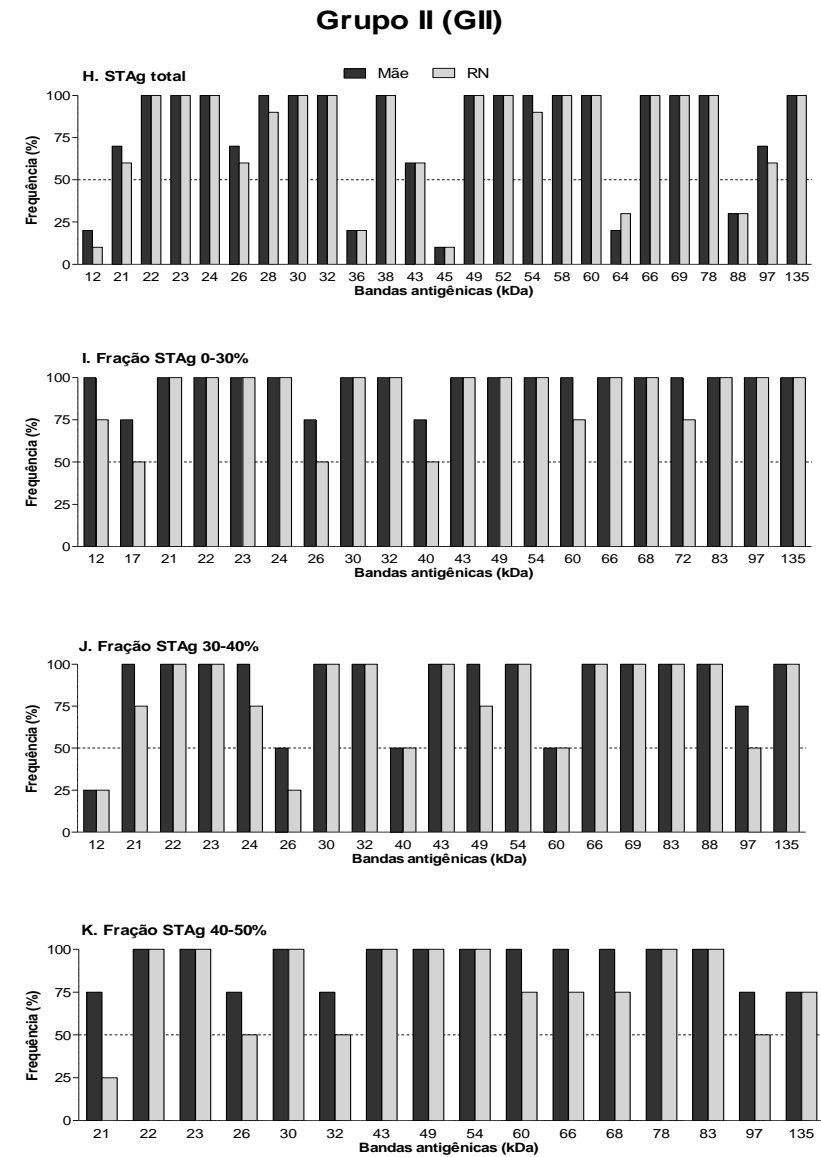
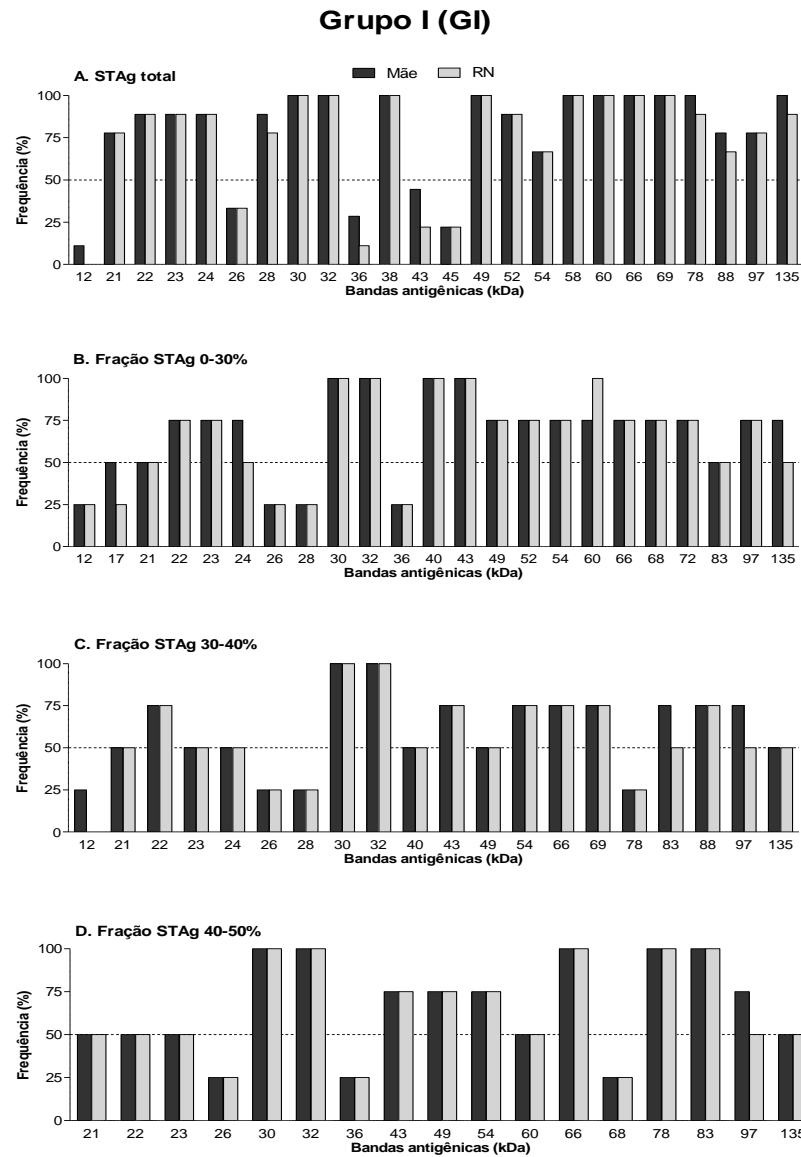


Figura 3 - Continuação

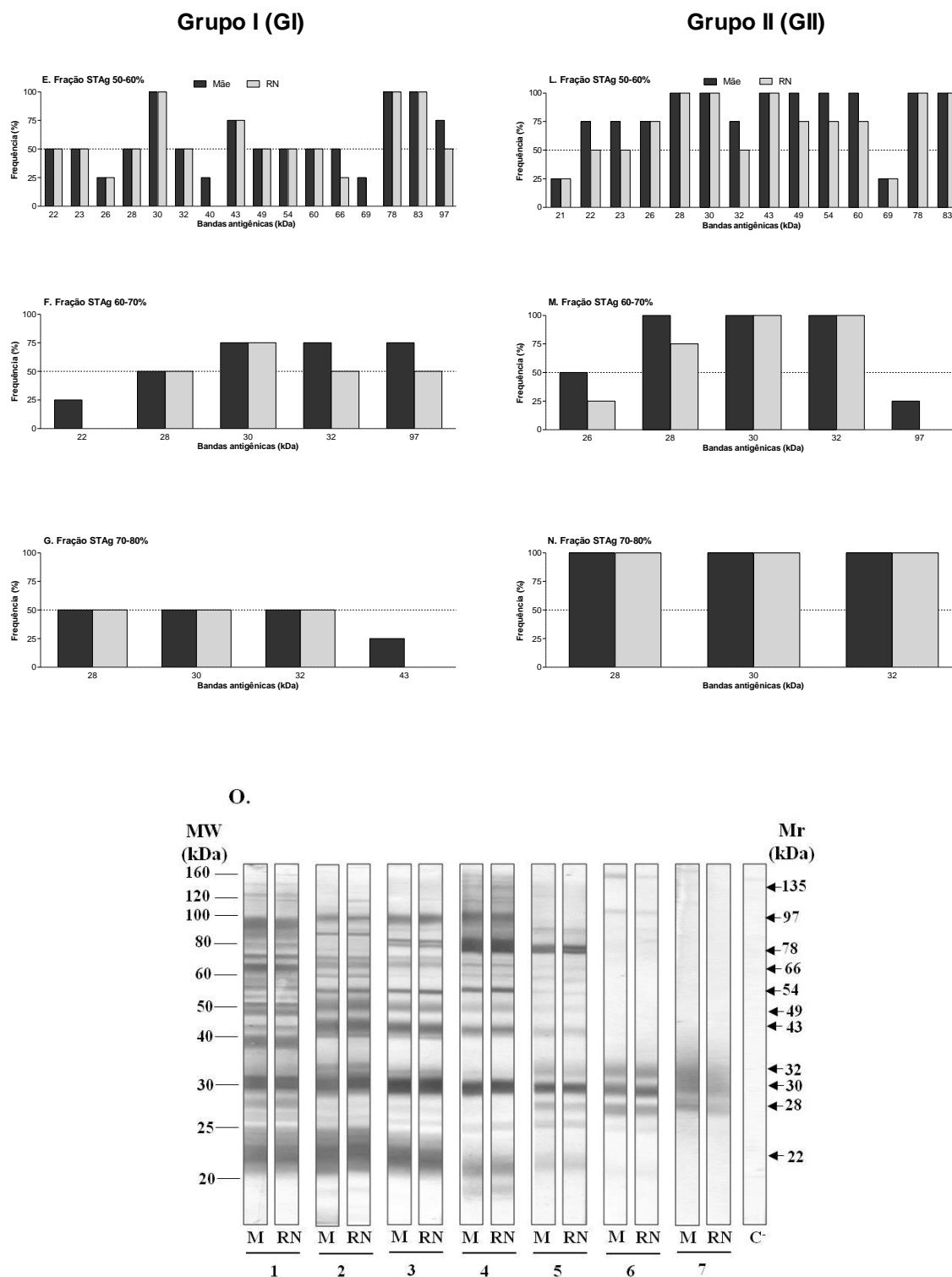


Figura 3 - Frequência (%) e perfil das bandas antigênicas de STAg total e suas frações obtidas por precipitação em concentrações crescentes de sulfato de amônio e reconhecidas por anticorpos IgG presentes em amostras pareadas de soros de mães (M) e recém-nascidos (RN) dos grupos (A-G) GI, em que as mães apresentavam sorologia sugestiva de infecção recente ($\text{IgG}^+ \text{IgM}^+$) e os RNs de infecção congênita ($\text{IgG}^+ \text{IgM}^+$) por *T. gondii* (n = 4 pares), e (H-N) GII, em que as mães apresentavam sorologia sugestiva de infecção recente ($\text{IgG}^+ \text{IgM}^+$) e os RNs de ausência de infecção congênita ($\text{IgG}^+ \text{IgM}^-$) por *T. gondii* (n = 4 pares). A linha tracejada indica a frequência de

reconhecimento igual a 50%. (O) *Immunoblots* representativos das bandas antigênicas reconhecidas por anticorpos IgG presentes em uma amostra pareada de soro de mãe (M) e recém-nascido (RN) do grupo GI em (1) STAg total; (2) Fração STAg 0-30%; (3) Fração STAg 30-40%; (4) Fração STAg 40-50%; (5) Fração STAg 50-60%; (6) Fração STAg 60-70%; e (7) Fração STAg 70-80%. C corresponde à tira incubada com soro controle negativo (IgG⁻ e IgM⁻ anti-*T. gondii*). Pesos moleculares (MW) dos padrões, expressos em kiloDalton (kDa), estão indicados à esquerda. Massas moleculares aparentes (Mr), expressas em kDa, estão indicadas à direita e foram analisadas pelo *software Kodak Digital Science 1D*.

Diversos trabalhos tem apontado a importância de resultados de testes de *immunoblotting* para a detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em amostras pareadas de soros de mães e RNs para o diagnóstico da toxoplasmose congênita. Nestes ensaios, a ocorrência de infecção congênita é comprovada ou altamente suspeita quando IgG presente no soro do RN reconhece bandas antigênicas que não são reconhecidas pelos anticorpos maternos ou reconhece bandas com maior intensidade que o observado com o soro materno, permitindo determinar que o RN apresenta anticorpos IgG com especificidades diferentes dos anticorpos maternos, em função de síntese própria. Caso a IgG presente no RN fosse resultante apenas da transferência materna via placenta durante a gestação, o padrão de reconhecimento de bandas seria idêntico entre os soros da mãe e do RN, tanto em tipos de bandas reconhecidas quanto na intensidade de marcação destas bandas (GALLEGO-MARÍN; HENAO; GÓMEZ-MARÍN, 2006; L'OLLIVIER et al., 2012; MACHADO et al., 2010; MAGI; MIGLIORINI, 2011; REMINGTON; ARAÚJO; DESMONTS, 1985; REMINGTON; THULIEZ; MONTROYA, 2004).

Este reconhecimento diferencial de bandas antigênicas pelos soros dos RNs do grupo GI, com infecção congênita, não foi observado com STAg nem com nenhuma de suas frações obtidas por precipitação em sulfato de amônio, de modo que os RNs deste grupo apresentaram padrão de reconhecimento idêntico ao observado com os soros maternos (Figura 3A-G).

Por outro lado, esta similaridade de bandas antigênicas reconhecidas pelos soros de mães e RNs era esperada no grupo GII, já que os testes sorológicos convencionais não apontaram a ocorrência de infecção congênita nos RNs deste grupo, de modo que os anticorpos IgG presentes em seu soro correspondem a anticorpos de origem materna e, portanto, deveriam reconhecer os mesmos antígenos e na mesma intensidade que os anticorpos presentes no soro de suas respectivas mães. Esse fato foi observado claramente para as amostras do grupo GII quando testadas com STAg e com todas as suas frações obtidas por precipitação (Figura 3H-N).

Comparando-se a variedade e a frequência de bandas antigênicas reconhecidas pelos soros maternos dos grupos GI e GII, observou-se perfis muito similares entre os dois grupos,

com as mães do grupo GII reconhecendo praticamente as mesmas bandas que as mães do grupo GI, porém com maior frequência de reconhecimento, tanto no STAg quanto nas frações. Esta maior frequência no grupo GII pode ser explicada pelo fato de que uma das mães testadas em GI apresentava sorologia indicativa de infecção bem recente, com reconhecimento de poucas bandas antigênicas, mesmo no STAg. Deste modo, não foi possível estabelecer antígenos reconhecidos de forma diferencial pelos soros das mães dos grupos GI, que transmitiram o parasita de forma congênita para seus filhos, e GII, que não transmitiram a infecção para seus filhos, não sendo possível identificar antígenos que agissem como marcadores moleculares, indicando maior probabilidade de transmissão congênita.

Esta maior frequência de reconhecimento de bandas observada com os soros maternos do grupo GII em relação aos soros do grupo GI se estendeu aos soros dos RNs, em função da transferência materna.

Este é o primeiro relato na literatura de protocolo de fracionamento de STAg utilizando precipitação em sulfato de amônio. Tal procedimento já foi adotado em trabalho prévio para obtenção de frações de antígenos excretados/secretados (ESA) de *T. gondii*, com resultados interessantes na detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em amostras de soros humanos (YAMAMOTO et al., 1998). Nossos resultados demonstram que todas as frações de STAg obtidas por precipitação em concentrações crescentes de sulfato de amônio podem ser usadas para o diagnóstico da infecção humana por *T. gondii* por meio da detecção de anticorpos IgG em ensaios de *immunoblotting*, discriminando entre amostras positivas e negativas. Porém, esta aplicação pode ser mais limitada para as frações STAg 60-70% e STAg 70-80%, em função da menor variedade na composição antigênica, que se baseia principalmente nos antígenos da região de 28-32 kDa, mesmo com o destaque para o antígeno imunodominante de 30 kDa.

Diante dos resultados apresentados, concluímos que a detecção de IgG total por *immunoblotting* em amostras pareadas de soros de mães e RNs usando STAg e suas diferentes frações obtidas por precipitação em sulfato de amônio não permitiram discriminação significativa entre as amostras de RNs com infecção congênita e RNs sem infecção congênita por *T. gondii*, ambos nascidos de mães com sorologia sugestiva de infecção primária adquirida durante a gestação. Este fato ocorreu principalmente em função da elevada taxa de transferência placentária destes anticorpos da mãe para o feto.

Porém, sabe-se que anticorpos IgG são constituídos por diferentes subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), cujas propriedades biológicas são distintas, inclusive com relação à transferência placentária, de modo que anticorpos das subclasses IgG2 e IgG3 apresentam

menores taxas de transferência placentária que os anticorpos IgG1 e IgG4 (PALMEIRA et al., 2012). Deste modo, decidimos avaliar a detecção de anticorpos das subclasses de IgG nas amostras pareadas de mães e RNs usando STAg e apenas uma de suas frações obtidas por precipitação. A fração selecionada foi a obtida com concentração de até 40% de sulfato de amônio (STAg 30-40%), em função da presença de uma variedade significativa de antígenos de *T. gondii* reconhecidos por anticorpos IgG humanos nesta fração, com boa discriminação de bandas antigênicas. Esta fração representou uma melhor alternativa em relação à fração STAg 0-30%, cujo perfil de bandas antigênicas é praticamente idêntico ao observado com STAg total, e em relação às demais frações (STAg 40-50%, STAg 50-60%, STAg 60-70% e STAg 70-80%), que apresentaram uma variedade bem menor de bandas antigênicas reconhecidas.

3.4 Detecção de subclasses de IgG em amostras pareadas de soros de mães e recém-nascidos usando STAg total e a fração STAg 30-40%

A avaliação das bandas antigênicas reconhecidas pelas subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 foi feita por *immunoblotting*, utilizando-se 12 pares de amostras de soros de mães e RNs do grupo GI e 16 pares de amostras do grupo GII.

A análise das bandas antigênicas reconhecidas por anticorpos IgG1 nas amostras pareadas demonstrou o reconhecimento de bandas de 17 a 135 kDa, tanto pelas amostras do grupo GI quanto pelas amostras do grupo GII, quando testadas com STAg, com resultados muito similares entre os dois grupos e muito similares aos resultados observados com a IgG total. Analisando-se apenas o padrão de reconhecimento de IgG1 das amostras de soros maternos de ambos os grupos frente a STAg total, observou-se uma grande variedade de bandas antigênicas reconhecidas com elevada frequência nos dois grupos, com uma frequência de reconhecimento ligeiramente superior pelas amostras do grupo GI, quando comparadas ao grupo GII (Figuras 4A e 4C). Este mesmo padrão de reconhecimento foi observado com os soros dos RNs de ambos os grupos, quando testados com STAg total.

Analisando-se os resultados obtidos com a detecção de IgG1 usando a fração STAg 30-40%, observou-se resultados similares com os obtidos com STAg total. Quando testados com a fração STAg 30-40%, os soros do grupo GI, em comparação com STAg total, não reconheceram as bandas de 17, 34 e 75 kDa e reconheceram as bandas de 26, 28, 38 e 58 kDa com frequência menor (Figura 4B).

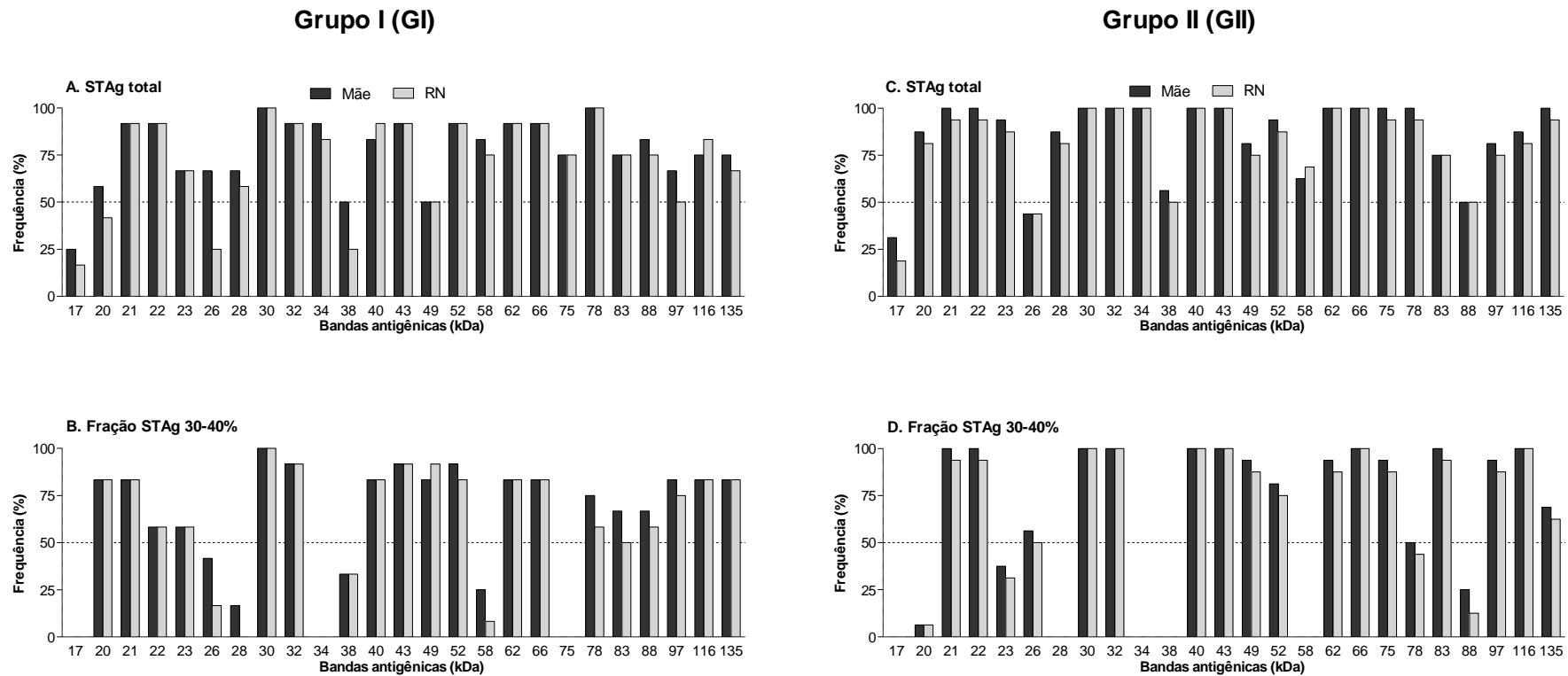


Figura 4 - Frequência (%) e perfil das bandas antigênicas de STAg total e da fração STAg 30-40% reconhecidas por anticorpos IgG1 presentes em amostras pareadas de soros de mães (M) e recém-nascidos (RN) dos grupos (A-B) GI, em que as mães apresentavam sorologia sugestiva de infecção recente ($\text{IgG}^+ \text{IgM}^+$) e os RNs de infecção congênita ($\text{IgG}^+ \text{IgM}^+$) por *T. gondii* (n = 12 pares), e (C-D) GII, em que as mães apresentavam sorologia sugestiva de infecção recente ($\text{IgG}^+ \text{IgM}^+$) e os RNs de ausência de infecção congênita ($\text{IgG}^+ \text{IgM}^-$) por *T. gondii* (n = 16 pares). A linha tracejada indica a frequência de reconhecimento igual a 50%.

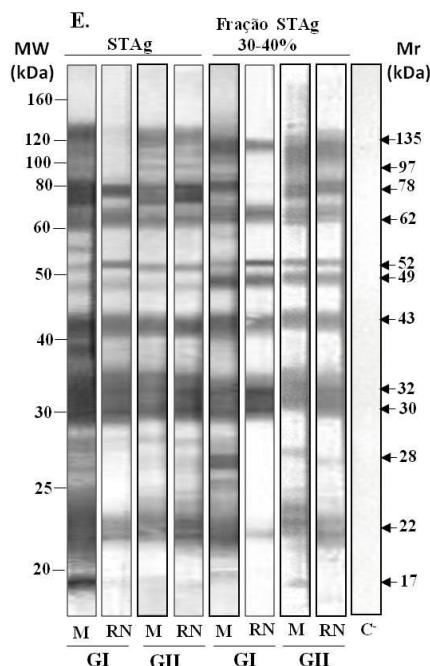


Figura 4 - Continuação - (E) Esquemas de *Immunoblots* das bandas antigênicas presentes no STAg total e na fração STAg 30-40% reconhecidas por anticorpos IgG1 presentes em um par de amostras de soros representativos de mãe (M) e recém-nascido (RN) do grupo GI e outro par de amostras representativas do grupo GII. C⁻ corresponde à tira incubada com soro controle negativo (IgG⁻ e IgM⁻ anti-*T. gondii*). Pesos moleculares (MW) dos padrões, expressos em kiloDalton (kDa), estão indicados à esquerda. Massas moleculares aparentes (Mr), expressas em kDa, estão indicadas à direita e foram analisadas pelo *software Kodak Digital Science 1D*.

Já os soros do grupo GII não reconheceram as bandas de 17, 28, 34, 38 e 58 kDa e reconheceram as bandas de 20, 23, 78 e 88 kDa com frequência menor, quando comparadas com STAg total (Figura 4D). O padrão de reconhecimento de IgG1 pelos soros dos RNs é praticamente idêntico ao observado com os soros das mães em ambos os grupos com as duas preparações antigênicas, exceto por uma frequência relativamente menor de reconhecimento de algumas bandas em ambos os grupos. Quando testados com STAg total, houve uma frequência levemente maior de reconhecimento das bandas de 40 e 116 kDa pelos soros dos RNs do grupo GI, em relação aos soros maternos, mas aparentemente sem relevância, em função da diferença muito pequena (Figura 4A).

A grande similaridade observada entre os resultados do reconhecimento de IgG1 com os resultados da IgG total refere-se ao fato de que a maior parte dos anticorpos IgG humanos (em torno de 70%) corresponde à subclasse IgG1 (MALEK, 2013). Em função disso, a mesma similaridade de reconhecimento observada para IgG total entre os soros dos grupos GI e GII também foi observada para IgG1, sem diferenças entre os soros maternos destes dois grupos. Além disso, não se observou no grupo GI o reconhecimento diferencial de bandas

antigênicas pelos soros dos RNs, que não fossem reconhecidas pelos soros maternos, o que se explica pela ampla transferência placentária desta subclasse de IgG (PALMEIRA et al., 2012).

Finalmente, comparando-se o padrão de reconhecimento de bandas pelos soros dos dois grupos frente ao STAg total e à fração STAg 30-40%, observou-se que a fração apresenta menor quantidade de bandas reconhecidas, mas com boa discriminação entre amostras positivas e negativas. Porém, não apresenta diferenças de bandas reconhecidas pelos soros dos grupos GI e GII.

A análise das bandas antigênicas reconhecidas por anticorpos IgG2 nas amostras pareadas demonstrou o reconhecimento de uma variedade bem menor de bandas, quando comparado ao reconhecimento por anticorpos IgG1. Os soros do grupo GI reconheceram apenas as bandas de 22, 30, 66, 75 e 135 kDa quando testados com STAg (Figura 5A), enquanto os soros do grupo GII reconheceram, além destas, as bandas de 50 e 57 kDa (Figura 5C). Já com relação ao reconhecimento de bandas do STAg pela IgG2 dos soros dos RNs, observou-se que os soros do grupo GI reconheceram as mesmas bandas que os soros maternos, com frequências idênticas, exceto nas bandas de 66 e 135 kDa, que foram reconhecidas com frequência levemente superior pelos soros dos RNs, em relação aos soros maternos. Já os soros dos RNs do grupo GII também reconheceram as mesmas bandas que os soros maternos, mas com frequências bem menores para todas as bandas, exceto para a banda de 30 kDa. Este mesmo padrão de reconhecimento foi observado com os soros dos RNs de ambos os grupos, quando testados com STAg total.

Este padrão de reconhecimento de IgG2 dos soros dos RNs é interessante, pois esta subclasse parece apresentar a menor taxa de transferência placentária entre as subclasses de IgG, de modo que a menor frequência de bandas reconhecidas pelos soros dos RNs do grupo GII pode ser resultado desta menor transferência materna, enquanto a similaridade entre as frequências materna e dos RNs do grupo GI pode indicar a presença de IgG2 sintetizada pelo próprio recém-nascido (EINARSDOTTIR et al., 2014).

Já o reconhecimento de bandas da fração STAg 30-40% pelos anticorpos IgG2 de ambos os grupos foi menor que o observado para STAg total, especialmente para os soros do grupo GI, que reconheceram apenas as bandas de 30 e 50 kDa, sendo esta última reconhecida pelos soros dos RNs com frequência maior que a observada pelos soros maternos (Figura 5B). Já os soros do grupo II, além destas bandas de 30 e 50 kDa, também reconheceram as bandas de 22, 75 e 135 kDa, mas com frequência muito baixa para todas elas, que foi menor ainda para os soros dos RNs (Figura 5D).

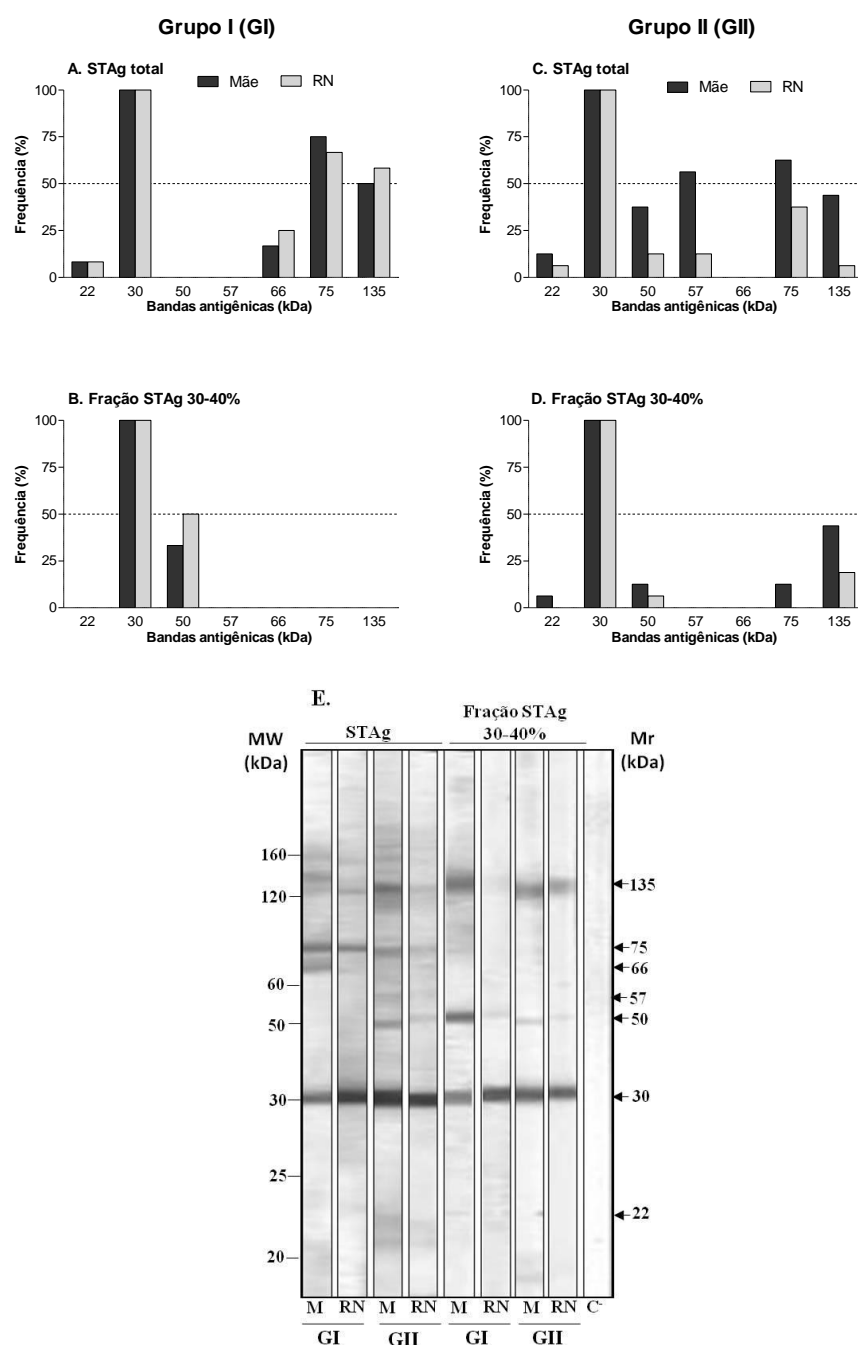


Figura 5 - Frequência (%) e perfil das bandas antigênicas de STAg total e da fração STAg 30-40% reconhecidas por anticorpos IgG2 presentes em amostras pareadas de soros de mães (M) e recém-nascidos (RN) dos grupos (A-B) GI, em que as mães apresentavam sorologia sugestiva de infecção recente ($\text{IgG}^+ \text{IgM}^+$) e os RNs de infecção congênita ($\text{IgG}^+ \text{IgM}^+$) por *T. gondii* (n = 12 pares), e (C-D) GII, em que as mães apresentavam sorologia sugestiva de infecção recente ($\text{IgG}^+ \text{IgM}^+$) e os RNs de ausência de infecção congênita ($\text{IgG}^+ \text{IgM}^-$) por *T. gondii* (n = 16 pares). A linha tracejada indica a frequência de reconhecimento igual a 50%. (E) Esquemas de *Immunoblots* das bandas antigênicas presentes no STAg total e na fração STAg 30-40% reconhecidas por anticorpos IgG2 presentes em um par de amostras de soros representativos de mãe RN do grupo GI e outro par de amostras representativas do grupo GII. C⁻ corresponde a tira incubada com soro controle negativo (IgG^- e IgM^- anti-*T. gondii*). Pesos moleculares (MW) dos padrões, expressos em kiloDalton (kDa), estão indicados à esquerda. Massas moleculares aparentes (Mr), expressas em kDa, estão indicadas à direita e foram analisadas pelo software *Kodak Digital Science 1D*.

Quanto à detecção de anticorpos IgG3 usando STAg total, observou-se que esta subclasse presente nas amostras maternas do grupo GI reconheceu uma variedade considerável de bandas antigênicas, variando de 21 a 116 kDa (Figura 6A), enquanto as amostras do grupo GII reconheceram bandas nesta mesma faixa de variação, com exceção das bandas de 28, 66, 83 e 92 kDa (Figura 6C). É interessante notar que, além da variedade de bandas antigênicas reconhecidas por esta subclasse presente nos soros do grupo GI ser maior que a observada entre os soros do grupo GII, a frequência de reconhecimento no grupo GI também é maior. Já os soros dos RNs do grupo GI apresentaram frequências de reconhecimento muito similares às apresentadas por suas mães, com uma frequência levemente superior para as bandas de 38, 52, 92, 97 e 116 kDa, enquanto os anticorpos IgG3 presentes nos soros dos RNs do grupo GII também reconheceram as mesmas bandas que os respectivos soros maternos, com a mesma frequência ou frequências ligeiramente menores (Figuras 6A e 6C).

Quando testados com a fração STAg 30-40%, os soros do grupo GI apresentaram menor variedade de bandas antigênicas reconhecidas por anticorpos IgG3 do que o observado com STAg total (Figura 6B). Porém, a exemplo do observado com STAg total, a frequência de bandas reconhecidas por IgG3 presente nos soros do grupo GI, quando testados com a fração STAg 30-40% foi maior que a frequência observada com os soros do grupo GII (Figura 6D).

Alguns trabalhos tem demonstrado maior síntese de IgG3 anti-*T. gondii* nas fases mais precoces da infecção e apontam que a produção desta subclasse pode ser um mecanismo relacionado com a sobrevivência do parasita, já que tais anticorpos podem não apresentar papel protetor significativo na infecção por *T. gondii* (SANTANA et al., 2012). Além disso, a síntese fetal destes anticorpos parece estar relacionada à ocorrência de sintomas clínicos mais graves nos casos de toxoplasmose congênita (CAÑEDO-SOLARES et al., 2008). Nossos resultados não apontam claramente a síntese fetal desta subclasse de anticorpos nos RNs do grupo I, pois não foi observado o reconhecimento diferencial de bandas antigênicas pelos soros dos RNs em relação aos soros das mães neste grupo. Porém, a maior frequência de bandas reconhecidas por anticorpos IgG3 nos soros maternos do grupo GI pode apontar para uma maior probabilidade de transmissão congênita entre estas mães, já que maior síntese de IgG3 pode reduzir a ativação de diversas funções, diminuindo a resposta do hospedeiro contra o parasita, o que poderia aumentar a possibilidade de colonização placentária e consequente transmissão vertical (PLEASS; WOOF, 2001).

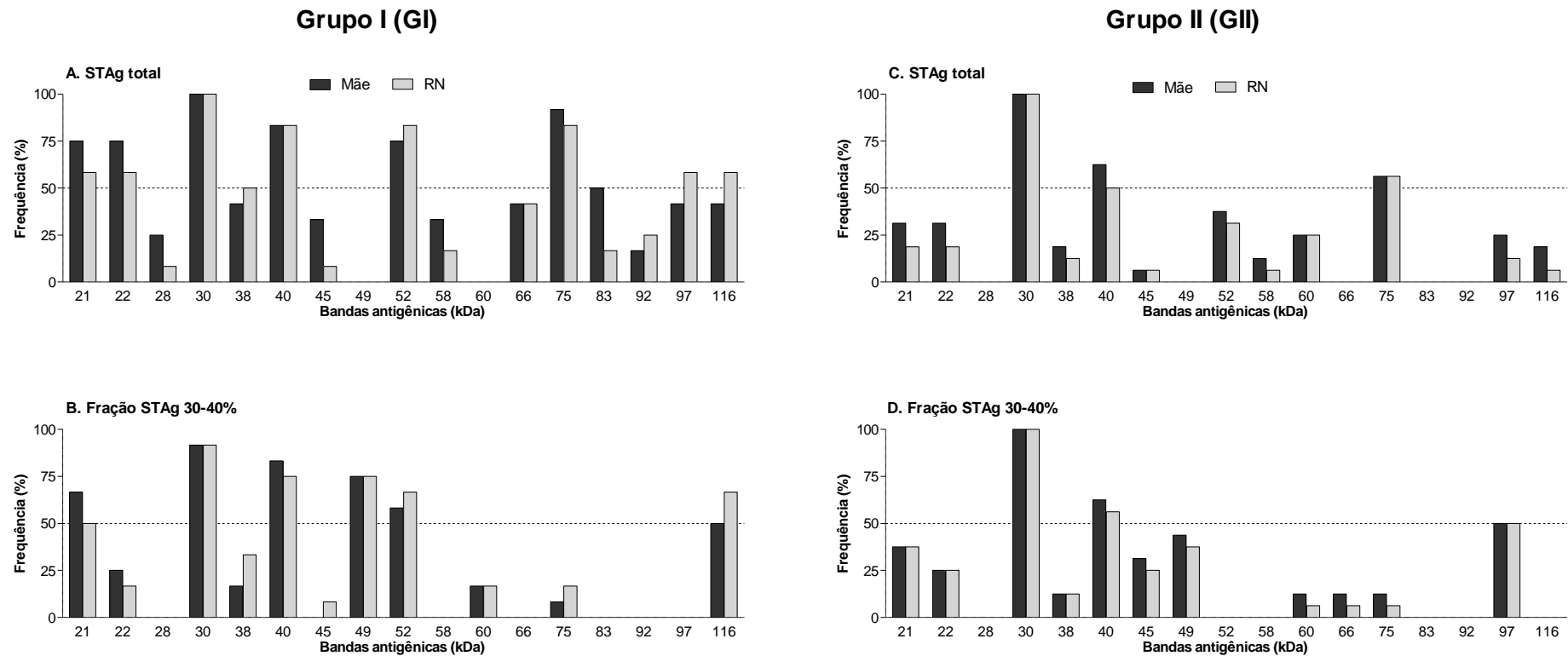


Figura 6 - Frequência (%) e perfil das bandas antigênicas de STAg total e da fração STAg 30-40% reconhecidas por anticorpos IgG3 presentes em amostras pareadas de soros de mães (M) e recém-nascidos (RN) dos grupos (A-B) GI, em que as mães apresentavam sorologia sugestiva de infecção recente ($\text{IgG}^+ \text{IgM}^+$) e os RNs de infecção congênita ($\text{IgG}^+ \text{IgM}^+$) por *T. gondii* (n = 12 pares), e (C-D) GII, em que as mães apresentavam sorologia sugestiva de infecção recente ($\text{IgG}^+ \text{IgM}^+$) e os RNs de ausência de infecção congênita ($\text{IgG}^+ \text{IgM}^-$) por *T. gondii* (n = 16 pares). A linha tracejada indica a frequência de reconhecimento igual a 50%.

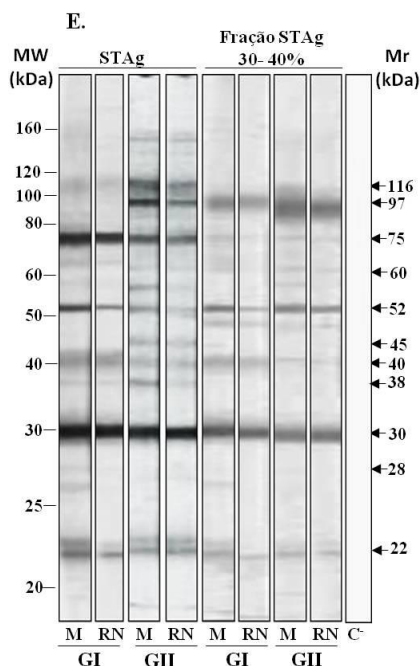


Figura 6 - Continuação - (E) Esquemas de *Immunoblots* das bandas antigênicas presentes no STAg total e na fração STAg 30-40% reconhecidas por anticorpos IgG3 presentes em um par de amostras de soros representativos de mãe (M) e recém-nascido (RN) do grupo GI e outro par de amostras representativas do grupo GII. C⁻ corresponde a tira incubada com soro controle negativo (IgG⁻ e IgM⁻ anti-*T. gondii*). Pesos moleculares (MW) dos padrões, expressos em kiloDalton (kDa), estão indicados à esquerda. Massas moleculares aparentes (Mr), expressas em kDa, estão indicadas à direita e foram analisadas pelo *software Kodak Digital Science 1D*.

Por outro lado, a análise das bandas antigênicas reconhecidas por anticorpos IgG4 nas amostras pareadas demonstrou o reconhecimento de uma pequena variedade de bandas, de modo similar ao observado com anticorpos IgG2. Os soros do grupo GI e do grupo GII reconheceram apenas as bandas de 30, 38, 50, 54 e 75 kDa quando testados com STAg (Figuras 7A e 7C). Porém, a frequência de reconhecimento pelos soros do grupo GI foi bem maior que a frequência do grupo GII, que reconheceu com maior frequência apenas a banda de 30 kDa. Com relação ao reconhecimento de bandas do STAg pela IgG4 dos soros dos RNs, não houve diferenças entre as frequências de reconhecimento destas bandas quando comparadas aos soros maternos, de modo que esta frequência foi mais elevada entre os soros dos RNs do grupo GI.

O reconhecimento de bandas da fração STAg 30-40% pelos anticorpos IgG4 de ambos os grupos foi menor que o observado para STAg total, de modo que os soros de ambos os grupos reconheceram apenas as bandas de 30, 50 e 97 kDa, com maior frequência de reconhecimento entre os soros do grupo GI e sem diferenças entre as frequências observadas nos soros das mães e dos RNs (Figura 7B e 7D).

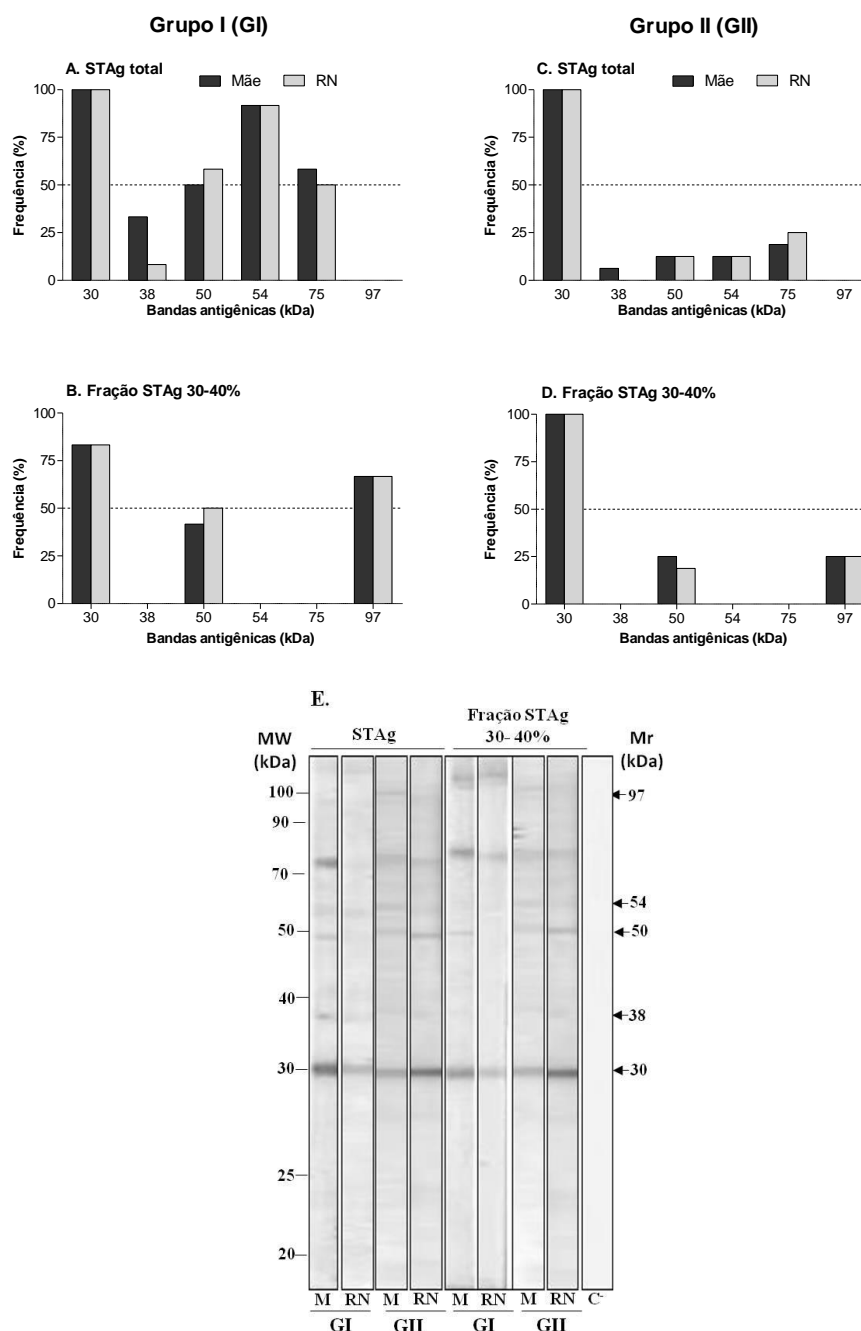


Figura 7 - Frequência (%) e perfil das bandas antigênicas de STAg total e da fração STAg 30-40% reconhecidas por anticorpos IgG4 presentes em amostras pareadas de soros de mães (M) e recém-nascidos (RN) dos grupos (A-B) GI, em que as mães apresentavam sorologia sugestiva de infecção recente ($\text{IgG}^+ \text{IgM}^+$) e os RNs de infecção congênita ($\text{IgG}^+ \text{IgM}^+$) por *T. gondii* (n = 12 pares), e (C-D) GII, em que as mães apresentavam sorologia sugestiva de infecção recente ($\text{IgG}^+ \text{IgM}^+$) e os RNs de ausência de infecção congênita ($\text{IgG}^+ \text{IgM}^-$) por *T. gondii* (n = 16 pares). A linha tracejada indica a frequência de reconhecimento igual a 50%. (E) Esquemas de *Immunoblots* das bandas antigênicas presentes no STAg total e na fração STAg 30-40% reconhecidas por anticorpos IgG4 presentes em um par de amostras de soros representativos de mãe RN do grupo GI e outro par de amostras representativas do grupo GII. C⁻ corresponde a tira incubada com soro controle negativo (IgG^- e IgM^- anti-*T. gondii*). Pesos moleculares (MW) dos padrões, expressos em kiloDalton (kDa), estão indicados à esquerda. Massas moleculares aparentes (Mr), expressas em kDa, estão indicadas à direita e foram analisadas pelo software *Kodak Digital Science 1D*.

A detecção e quantificação da produção de subclasses de IgG tem sido investigada na infecção por uma variedade de agentes infecciosos, em função, principalmente, das diferenças nas propriedades biológicas destes isotipos de anticorpos (BÉLA et al., 2008). Alguns trabalhos tem sido realizados na detecção de subclasses de IgG na infecção congênita por *T. gondii* e sua correlação com dados clínicos dos recém-nascidos infectados. Porém, a maioria destes trabalhos detecta subclasses de IgG por meio de ensaios ELISA e tem como maior limitação nos seus resultados a grande dificuldade em diferenciar os anticorpos de origem materna daqueles sintetizados pelo próprio recém-nascido, já que todas as subclasses apresentam transferência placentária, mesmo que em taxas variáveis (CAÑEDO-SOLARES et al., 2008; SOUZA-E-SILVA et al., 2012, 2013).

Neste sentido, a detecção de subclasses de IgG por meio de *immunoblotting* que, além de avaliar a presença destes anticorpos nas amostras sorológicas dos RNs, também permite a avaliação dos antígenos de *T. gondii* reconhecidos por cada subclasse, bem como o reconhecimento diferencial destes antígenos por amostras pareadas de soros de mães e recém-nascidos constituir-se-ia numa excelente ferramenta de diagnóstico da toxoplasmose congênita, permitindo a rápida identificação de recém-nascidos infectados.

O método de *immunoblotting* para a detecção de subclasses de IgG já foi utilizado anteriormente para a avaliação de antígenos reconhecidos nas fases aguda e crônica da infecção por *T. gondii*, com pequena detecção e marcação de bandas reconhecidas pelas subclasses IgG2, IgG3 e IgG4 e melhor discriminação apenas de anticorpos IgG1 (HUSKINSON et al., 1989).

No nosso entendimento, esta é a primeira descrição da detecção de subclasses de IgG presentes em amostras pareadas de soros de mães e recém-nascidos pelo método de *immunoblotting*, demonstrando os antígenos reconhecidos por estes isotipos de anticorpos. Porém, não foi possível a identificação clara de antígenos reconhecidos de maneira diferenciada por estas subclasses de anticorpos presentes em amostras de soros de RNs com infecção congênita, quando comparados com os anticorpos presentes nas amostras de suas respectivas mães. Uma possível explicação para a não identificação clara de anticorpos sintetizados pelo RN infectado em nossos experimentos poderia ser a idade muito recente dos RNs no momento da coleta da amostra para análise (1 a 8 dias, em média). Em idade tão recente, anticorpos de origem fetal podem apresentar pequena síntese e ser facilmente mascarados pela alta concentração de anticorpos maternos transferidos pela placenta. Neste caso, a identificação de anticorpos próprios do RN seria mais efetiva após algumas semanas ou meses de idade, quando a síntese fetal é mais pronunciada e ativa e o decaimento dos

anticorpos IgG maternos circulantes também já foi mais efetiva (MONTTOYA; REMINGTON, 2008; REMINGTON et al., 2006; REMINGTON; THULLIEZ; MONTTOYA, 2004).

Além disso, a identificação de novas preparações antigênicas, mais purificadas, seria uma alternativa interessante no diagnóstico mais eficiente da infecção por *T. gondii*, especialmente em gestantes e recém-nascidos. Nossa tentativa de utilização de frações antigênicas obtidas a partir de precipitação do STAg total no diagnóstico da toxoplasmose humana se mostrou interessante na detecção de anticorpos IgG e suas subclasses, permitindo diferenciação entre amostras positivas e negativas, mas não se mostrou uma boa alternativa no diagnóstico da toxoplasmose congênita, com resultados considerados inferiores aos do STAg, em função da menor frequência de bandas antigênicas reconhecidas e da ausência de reconhecimento diferencial de antígenos pelos soros maternos e dos RNs.

Desta forma, a busca por novas alternativas antigênicas, que permitam a obtenção de resultados mais fidedignos e confiáveis, aliada à padronização de métodos, como o *immunoblotting*, para a detecção de anticorpos de diferentes isotipos, incluindo subclasses de IgG, em amostras sorológicas provenientes de mães e recém-nascidos de diferentes idades, deve ser encorajada.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BÉLA, S. R.; SILVA, D. A. O.; CUNHA-JÚNIOR, J. P.; PIROVANI, C. P.; CHAVES-BORGES, F. A.; CARVALHO, F. R.; OLIVEIRA, T. C.; MINEO, J. R. 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. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, Washington DC, v. 62, p. 245-254, 2008.

BETTELHEIM, F. A.; BROWN, W. H.; CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. **Introdução à Bioquímica**. São Paulo: Cengage Learning, 2011. 392 p.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CAÑEDO-SOLARES, I.; GALVÁN-RAMÍREZ, M. L.; LUNA-PASTPEN, H.; RODRIGUEZ PÉREZ, L. R.; ORTIZ-ALEGRÍA, L. B.; RICO-TORRES, C. P.; VELA-AMIEVA, M.; PÉREZ-ANDRADE, M.; FIGUEROA-DAMIÁN, R.; CORREA, D. Congenital toxoplasmosis: specific IgG subclasses in mother/newborn pairs. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 27, n. 5, p. 469-474, 2008.

CARVALHO, F. R.; SILVA, D. A. O.; CUNHA-JÚNIOR, J. P.; SOUZA, M. A.; OLIVEIRA, T. C.; BÉLA, S. R.; FARIA, G. G.; LOPES, C. S.; MINEO, J. R. Reverse enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies against SAG1-related sequence, SAG2A, and p97 antigens from *Toxoplasma gondii* to detect specific Immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgA antibodies in human sera. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington DC, v. 15, n. 8, p. 1265-1271, 2008.

CESPEDES, S.; ANDREWS, E.; FOLCH, H.; ONATE, A. Identification and partial characterization of a new protective antigen of *Brucella abortus*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 49, p. 165-170, 2000.

CORREA, D.; CAÑEDO-SOLARES, I.; ORTIZ-ALEGRÍA, L. B.; CABALLERO-ORTEGA, H.; RICO-TORRES, C. P. Congenital and acquired toxoplasmosis: diversity and role of antibodies in different compartments of the host. **Parasite Immunology**, Malden, v. 29, p. 651-660, 2007.

EINARSDOTTIR, H. K.; STAPLETON, N. M.; SCHERJON, S.; ANDERSEN, J. T.; RISPENS, T.; VAN DER SCHOOT, C. E.; VIDARSSON, G. On the perplexingly low rate of transport of IgG2 across the human placenta. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e108319, 2014.

GALLEGO-MARÍN, C.; HENAO, A. C.; GÓMEZ-MARÍN, J. E. Clinical validation of a western blot assay for congenital toxoplasmosis and newborn screening in a hospital in Armenia (Quindío) Colombia. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 52, n. 2, p. 107-112, 2006.

HUSKINSON, J.; STEPICK-BIEK, P. N.; ARAÚJO, F. G.; THULLIEZ, P.; SUZUKI, Y.; REMINGTON, J. S. *Toxoplasma* antigens recognized by Immunoglobulin G subclasses during acute and chronic infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 9, p. 2031-2038, 1989.

KAYE, A. Toxoplasmosis: diagnosis, treatment, and prevention in congenitally exposed infants. **Journal of Pediatric Health Care**, v. 25, n. 6, p. 355-364, 2011.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LEITE, M.; SICILIANO, S.; ROCHA, L. S.; JUSTA, M. T.; CÉSAR, K. R.; GRANATO, C. F. Correlation between specific IgM levels and percentage IgG-class antibody avidity to *Toxoplasma gondii*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 50, n. 4, p. 237-242, 2008.

L'OLLIVIER, C.; WALLON, M.; FAUCHER, B.; PIARROUX, R.; PEYRON, F.; FRANCK, J. Comparison of mother and child antibodies that target high-molecular-mass *Toxoplasma gondii* antigens by Immunoblotting improves neonatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, n. 8, p. 1326-1328, 2012.

MACHADO, A. S.; ANDRADE, G. M. Q.; JANUÁRIO, J. N.; FERNANDES, M. D.; CARNEIRO, A. C. A. V.; CARNEIRO, M.; CARELLOS, E. V. M.; ROMANELLI, R. M. C.; VASCONCELOS-SANTOS, D. V.; VITOR, R. W. A. IgG and IgM Western blot assay for diagnosis of congenital toxoplasmosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 6, p. 757-761, 2010.

MAGI, B.; MIGLIORINI, L. Western blotting for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. **The New Microbiologica**, v. 34, n. 1, p. 93-95, 2011.

MALEK, A. Role of IgG antibodies in association with placental function and immunologic diseases in human pregnancy. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 9, n. 3, p. 235-249, 2013.

MARCOLINO, P. T.; SILVA, D. A. O.; LESER, P. G.; CAMARGO, M. E.; MINEO, J. R. Molecular markers in acute and chronic phases of human toxoplasmosis: determination of immunoglobulin G avidity by Western blotting. **Clinical Diagnostic and Laboratory Immunology**, Washington DC, v. 7, n. 3, p. 384-389, 2000.

McLEOD, R.; KIEFFER, F.; SAUTTER, M.; HOSTEN, T.; PELLOUX, H. Why prevent, diagnose and treat congenital toxoplasmosis? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 2, p. 320-344, 2009.

MINEO, J. R.; CAMARGO, M. E.; FERREIRA, A. W. Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Toxoplasma gondii* polysaccharides in human toxoplasmosis. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 27, n. 2, p. 283-287, 1980.

MINEO, J. R.; CAMARGO, M. E.; FERREIRA, A. W.; ALMEIDA, G. Research on IgM anti-*Toxoplasma gondii* antibodies by using a reverse immunoenzymatic technique. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 28, p. 6-11, 1986.

MONTOYA J. G.; REMINGTON, J. S. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 47, p. 554-566, 2008.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 1272 p.

PALMEIRA, P.; QUINELLO, C.; SILVEIRA-LESSA, A. L.; ZAGO, C. A.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, p. 1-14, 2012.

PLEASS, J.; WOOF, M. Fc receptors and immunity to parasites. **Trends in Parasitology**, v. 11, p. 545-555, 2001.

REMYINGTON, J. S.; ARAÚJO, F. G.; DESMONTES, G. Recognition of different *Toxoplasma* antigens by IgM and IgG antibodies in mothers and their congenitally infected newborns. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 152, n. 5, p. 1020-1024, 1985.

REMYINGTON, J. S.; McLEOD, R.; THULLIEZ, P.; DESMONTES, G. Toxoplasmosis. In: Remington, J. S.; Klein, J.; Wilson, C.; Baker, C. (Eds.), **Infectious diseases of the fetus and newborn infant**. 6 ed., Philadelphia: W B Saunders, pp. 947-1091, 2006.

REMYINGTON, J. S.; THULLIEZ, P.; MONTROYA, J. G. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 42, n. 3, p. 941-945, 2004.

RIBEIRO, A. C. A.; SOUZA, M. A.; MINEO, J. R. Detection of antibodies to the 97 kDa component of *Toxoplasma gondii* in samples of human serum. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 7, p. 1009-1013, 2002.

ROBERT-GANGNEUX, F. It is not only the cat that did it: How to prevent and treat congenital toxoplasmosis. **Journal of Infection**, v. 68, p. S125-S133, 2014.

ROBERT-GANGNEUX, F.; COMMERE, V.; TOURTE-SCHAEFER, C.; DUPOUY-CAMET, J. Performance of a Western blot assay to compare mother and newborn anti-*Toxoplasma* antibodies for the early neonatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 18, p. 648-654, 1999.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2, p. 264-296, 2012.

SANTANA, S. S.; SILVA, D. A. O.; VAZ, L. D.; PIROVANI, C. T.; BARROS, G. B.; LEMOS, E. M.; DIETZE, R.; MINEO, J. R.; CUNHA-JÚNIOR, J. P. Analysis of IgG subclasses (IgG1 and IgG3) to recombinant SAG2A protein from *Toxoplasma gondii* in sequential serum samples from patients with toxoplasmosis. **Immunology Letters**, v. 143, p. 193-201, 2012.

SENSINI, A. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy: opportunities and pitfalls of serological diagnosis. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 12, n. 6, p. 504-512, 2006.

SILVA-DOS-SANTOS, P. P.; BARROS, G. B.; MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O.; MENEGAZ, M. H.; SERUFO, J. C.; DIETZE, R. MARTINS-FILHO, O. A.; LEMOS, E. M.

Flow cytometry-based algorithm to analyze the anti-fixed *Toxoplasma gondii* tachyzoites IgM and IgG reactivity and diagnose human acute toxoplasmosis. **Journal of Immunological Methods**, v. 378, n. 1-2, p. 33-43, 2012.

SOUZA-E-SILVA, C. R.; ANDRADE, G. Q.; JANUÁRIO, J. N.; CARNEIRO, A. C. A. V.; CARNEIRO, M.; VASCONCELOS-SANTOS, D. V.; VITOR, R. W. A. Early diagnosis of congenital toxoplasmosis in newborn infants using IgG subclasses against two *Toxoplasma gondii* recombinant proteins. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 3, p. 342-347, 2012.

SOUZA-E-SILVA, C. R.; VASCONCELOS-SANTOS, D. V.; ANDRADE, G. Q.; CARELLOS, E. V. M.; ROMANELLI, R. M. C.; RESENDE, L. M.; JANUÁRIO, J. N.; CARNEIRO, M.; CARNEIRO, A. C. A. V.; VITOR, R. W. A. Association between IgG subclasses against *Toxoplasma gondii* and clinical signs in newborns with congenital toxoplasmosis. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 32, n. 1, p. 13-16, 2013.

TORRES, E.; RIVERA, R.; CARDONA, N.; SANCHEZ, V.; LORA, F.; GÓMEZ-MARÍN, J. E. Evaluation of IgG anti-*Toxoplasma* avidity and polymerase chain reaction in the postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 32, n. 6, p. 693-695, 2013.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington DC, v. 76, n. 9, p. 4350-4356, 1979.

TRIDAPALLI, E.; CAPRETTI, M. G.; FARNETI, G.; MARANGONI, A.; CEVENINI, R.; FALDELLA, G. Congenital toxoplasmosis: the importance of the western blot method to avoid unnecessary therapy in potentially infected newborns. **Acta Paediatrica**, v. 97, p. 1298-1300, 2008.

YAMAMOTO, Y. I.; MINEO, J. R.; MENEGHISSE, C. S.; GUIMARÃES, A. C.; KAWARABAYASHI, M. Detection in human sera of IgG, IgM and IgA to excreted/secreted antigens from *Toxoplasma gondii* by use of dot-ELISA and immunoblot assay. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 92, n. 1, p. 23-30, 1998.

CAPÍTULO IV

*Utilização de peptídeos sintéticos derivados de antígenos
imunodominantes de Toxoplasma gondii no sorodiagnóstico da
toxoplasmose humana*

APRESENTAÇÃO

O diagnóstico da infecção humana por *T. gondii* normalmente é feito por meio de testes sorológicos, que detectam anticorpos específicos presentes em amostras de soros do paciente, principalmente anticorpos dos isotipos IgG, IgM e IgA. Os métodos sorológicos normalmente utilizados nesta detecção baseiam-se na reatividade destes anticorpos contra antígenos do parasita presentes em diferentes preparações antigênicas, principalmente antígenos totais, que podem gerar diversos resultados falso-positivos e falso-negativos, especialmente para anticorpos IgM e IgA, além de permitirem fraca diferenciação entre as fases aguda e crônica da infecção. Assim, há a necessidade de desenvolvimento de novas preparações antigênicas, que permitam o diagnóstico mais claro e preciso da infecção humana, especialmente a infecção primária em gestantes e a infecção congênita em recém-nascidos.

O presente estudo teve como objetivos a identificação de epítomos lineares de células B presentes nos antígenos imunodominantes de *T. gondii*, utilizando ferramentas de bioinformática para a predição de epítomos e a avaliação do desempenho diagnóstico de peptídeos sintéticos representativos destes epítomos preditos de células B em ensaios imunoenzimáticos para a detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em amostras de soros de pacientes com diferentes perfis sorológicos da infecção.

Os resultados obtidos neste estudo são apresentados a seguir na forma de artigo científico redigido conforme as normas do periódico *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, para o qual será enviado para publicação.

Title: Use of synthetic peptides derived from immunodominant *Toxoplasma gondii* antigens for serodiagnosis of human toxoplasmosis

Running title: Synthetic peptides for serodiagnosis of toxoplasmosis

Authors: Fernando dos Reis de Carvalho^{a,b}, Silas Silva Santana^a, Heber Leão Silva Barros^a, Luiz Carlos Gebrim de Paula Costa^a, Ana Cláudia Arantes Marquez Pajuaba^a, Deise Aparecida de Oliveira Silva^a, Tiago Wilson Patriarca Mineo^a, and José Roberto Mineo^{a,*}

^a*Laboratory of Immunoparasitology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, 38401-136, Brazil.*

^b*Federal Institute of Education, Science and Technology of Goiás, Campus Itumbiara, Itumbiara, GO, 75524-010, Brazil.*

* Corresponding author. Mailing address: Laboratório de Imunoparasitologia, Universidade Federal de Uberlândia, Bloco 4C, Av. Pará, 1720, Campus Umuarama, 38400-902, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. Phone: 55-34-3218-2195. Fax: 55-34-3218-2333.

E-mail: jrmineo@ufu.br.

ABSTRACT

The amino acid sequences of sixteen immunodominant antigens of Toxoplasma gondii were used to perform B cell linear epitope prediction using a software-based approach. A total of 22 epitopes of antigens from surface (SRS), rhoptries (ROP), micronemes (MIC) and dense granules (GRA) of T. gondii were identified, and 15 residues from their amino acid sequences were used to synthesize peptides chemically linked to bovine serum albumin backbone. The diagnostic performance of these synthetic peptides was evaluated in immunoassays to detect specific IgG antibodies in sera of two groups of patients; G1 (n=42) with suspected acute phase, and G2 (n=42) with chronic phase of T. gondii infection. All synthetic peptides were recognized by IgG antibodies from these sera, showing mean absorbances higher than cut off values, high percentages of positivity, and good differentiation from seronegative samples. The peptides derived from SRS (Pep1-Pep4) and ROP (Pep5 and Pep7) antigens showed high mean reactivity and positivity rates. Pep13 (GRA4) and Pep21 (MIC2-associated protein) were significantly more recognized by sera from G1 (70% and 95%, respectively), making these epitopes potential markers of acute phase of infection. In contrast, Pep12 (MIC14) was significantly more recognized by sera from G2 (71%), characterizing it as potential chronic marker of infection. In conclusion, synthetic peptides designed from B cell linear epitope prediction constitute promising antigens in serological assays to diagnose toxoplasmosis and differentiate acute from chronic phases of infection, representing an alternative to the use of native or recombinant antigens.

Keywords: *Toxoplasmosis; synthetic peptides; SRS; ROP; MIC; GRA; acute phase; chronic phase.*

1 INTRODUCTION

Toxoplasma gondii, the causative agent of toxoplasmosis, is a widespread opportunistic protozoan parasite from the phylum Apicomplexa that virtually infects all warm-blooded animals, including humans (Dubey, 2008; Tenter et al., 2000). It is estimated that this parasite infects one-third of the human population worldwide (Oz, 2014; Weiss and Dubey, 2009). It generally causes an asymptomatic infection in immunocompetent people and in some cases can be associated with nonspecific manifestations in acute phase or neurological complications (McConkey et al., 2013). However, some infected people can present ocular pathologies (Maenz et al., 2014) and there are recent reports suggesting the association of *T. gondii* infection with schizophrenia and other neuropsychiatric and behavioral disorders (Hurley and Taber, 2012; McConkey et al., 2013). On the other hand, this infection is of great importance for pregnant women who acquire primary infection during pregnancy, because of the risk for congenital transmission to the fetus, which can lead to spontaneous abortion, death of the fetus in utero, or severe congenital defects, such as hydrocephalus, mental retardation or chorioretinitis (Montoya and Remington, 2008; Robert-Gangneux, 2014; Sukthana, 2006). This infection can also cause severe disease in immunocompromised subjects, like HIV-AIDS patients, who usually suffer from toxoplasmic encephalitis because of the reactivation of a latent infection (Saadatnia and Golkar, 2012).

The diagnosis of *T. gondii* infection can be performed by detecting specific antibodies in serum samples using serological methods or by isolating the parasite DNA in biological samples, such as amniotic fluid, fetal tissue, blood, cerebrospinal fluid and other clinical specimens using the PCR method (Murat et al., 2013; Robert-Gangneux and Dardé, 2012). Several classical serological methods can detect specific IgG and IgM antibodies to *T. gondii*, such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), indirect fluorescent antibody test (IFAT) and Western blotting. When the confirmation of initial serology is required, a number of complementary tests are available, including the Sabin-Feldman dye test or other tests to detect specific IgM, IgA or IgE antibodies, and IgG avidity tests (Ashburn et al., 1998; Lappalainen and Hedman, 2004; Marcolino et al., 2000; Remington et al., 2004; Roberts et al., 2001).

Serological methods generally used for the detection of specific antibodies in serum samples are based on the reactivity of these antibodies against total *T. gondii* antigens. These antigens can generate a series of false-positive and false-negative results, especially for IgM and IgA antibodies, in addition to a weak differentiation between acute and chronic phases of

the infection, making the diagnosis of primary and congenital infections a challenging situation (Murat et al., 2013; Sensini, 2006). Also, the use of this type of antigen requires mass production of the parasite either from the peritoneal fluids of infected mice or from tissue cultures (Pietkiewicz et al., 2004), making the diagnosis expensive and time consuming.

In order to improve the diagnosis of toxoplasmosis, the development of highly sensitive and reproducible methods using alternative sources of antigen has been extensively studied. Among them, recombinant antigens or chimeric antigenic preparations of *T. gondii* have been produced and evaluated as antigens for diagnosis in humans, with encouraging results, including differentiation between stages of infection (Béla et al., 2008; Buffolano et al., 2005; Dai et al., 2013; Drapala et al., 2014; Holec-Gasior, 2013; Holec-Gasior et al., 2012).

In that sense, several efforts have been made to identify new antigens for use in the diagnosis of toxoplasmosis, focusing in the immunodominant B cell epitopes within antigens from *T. gondii*, which can help to find the molecular regions involved in the specific humoral immune response, and they can be useful for immunoassays to detect anti-*T. gondii* antibodies (Araújo and Ferreira, 2010).

The use of B cell epitopes for the serodiagnosis of toxoplasmosis presents several advantages, including the precise knowledge of the composition of the diagnostic antigen (Liu et al., 2010). The identification of protein epitopes can be useful for diagnostic purpose and in the development of peptide vaccines. Thus, synthetic peptides representative of B cell epitopes derived from parasite immunodominant antigens, such as those from parasite surface, or from secretory organelles (rhoptries, micronemes, and dense granules), or even the cytoplasmic antigens could be the most promising antigens for the development of diagnostic kits for routine toxoplasmosis screening (Dai et al., 2012; Wang et al., 2013). There are some reports of the use of synthetic peptides on the diagnosis of *T. gondii* infection in humans, with interesting results in the general diagnosis of toxoplasmosis (Cardona et al., 2009), in the differentiation between acute and chronic phases of the infection (Dai et al., 2013), in serotyping *T. gondii* in serum samples (Kong et al., 2003; Nowakowska et al., 2006; Sousa et al., 2008) or in the evaluation of seroreactivity in serum samples from patients with toxoplasmosis.

Therefore, the aim of the present study was to identify B cell epitopes within different immunodominant antigens from *T. gondii*, such as antigens from surface and secretory organelles molecules, using software-based prediction. In addition, we evaluated the

diagnostic performance of synthetic peptides representative from these predicted B cell epitopes in immunoenzymatic assays to detect IgG antibodies specific to *T. gondii* in serum samples from patients with different serological profiles of the infection.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Patients and serum samples

A total of 84 human serum samples from the Bank of Biological Samples, Laboratory of Immunoparasitology, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil, was analyzed and distributed into two groups based on the results of conventional serological assays (indirect ELISA-IgG, and capture ELISA-IgM) using soluble *T. gondii* antigen (STAg). Group 1 (G1) included 42 serum samples from patients with a suspected acute phase of toxoplasmosis as defined by presenting positive IgG and IgM antibodies to *T. gondii*, and group 2 (G2) consisted of 42 serum samples from patients with the chronic phase as defined by presenting positive IgG, but negative IgM antibodies to *T. gondii*. Additionally, ten serum samples from non-infected subjects as defined by presenting negative IgG and IgM antibodies to *T. gondii* were included as negative control for the reactions. This study was approved by the Institutional Ethical Committee.

2.2 Indirect ELISA-IgG and capture ELISA-IgM

To characterize and distribute serum samples in the groups, indirect ELISA and capture ELISA were carried out to detect specific IgG and IgM antibodies to *T. gondii*, respectively, as described by Carvalho et al. (2008), using STAg as antigen. This antigen was produced from *T. gondii* tachyzoites (RH strain) as described elsewhere (Béla et al., 2008).

2.3 B cell epitope prediction and peptide design

To analyze the presence of B cell epitopes in immunodominant *T. gondii* antigens, the complete amino acid sequences of proteins from parasite surface antigens as SAG-related sequences (SRS), rhoptries (ROP), micronemes (MIC), and dense granules (GRA) were obtained from ToxoDB (<http://www.toxodb.org/toxo>). Next, the sequences were analyzed using the B Cell Epitope Prediction resources available at the Immune Epitope Database and Analysis Resource (IEDB) (<http://www.iedb.org>). The prediction of linear epitopes from protein sequence of each chosen antigen was performed using the method Bepipred Linear Epitope Prediction with a score threshold established at 1.5 (Larsen et al., 2006). Based on this analysis, the sequences of 15 amino acids with higher prediction scores were chosen as

antigen epitopes and used to design peptides. BLASTP analysis of the peptide sequences resulted in a total alignment with the respective *T. gondii* antigens and no significant alignment with proteins from other organisms.

2.4 Synthetic peptides

Based on the results of the B cell epitope prediction performed with each chosen antigen of *T. gondii*, as described in section 2.3, a total of 22 peptides with a sequence of 15 residues of amino acids were chemically synthesized by GenScript USA Inc. (Piscataway, New Jersey, EUA). The peptides were 95% pure as judged by high-performance liquid chromatography (HPLC) on analytical C18 reversed-phase column (4.5 x 250 mm), and the correct amino acid sequence of each peptide was confirmed by mass spectrometry, according to manufacturer's specifications. Peptides were conjugated to bovine serum albumin (BSA) by a cysteine insertion at the N-terminal amino acid and were lyophilized. Before use, each peptide was dissolved in ultrapure water and stored at -20°C, according to manufacturer's instructions. The peptide sequences and the respective antigens of *T. gondii* that each one was derived are shown in Table 1.

2.5 IgG ELISA using synthetic peptides

After a few steps to standardize the better reaction conditions, indirect ELISA was carried out to detect IgG antibodies to *T. gondii* using synthetic peptides. High-binding microtiter plates (Costar-Corning Laboratories Inc., New York, NY) were coated with 50 µl (10 µg/ml) of each peptide diluted in 0.06 M carbonate buffer (pH 9.6) overnight at 4°C. Plates were washed three times with 0.01 M phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2) containing 0.05% Tween 20 (PBS-T) and non-specific ligand sites were blocked with 100 µl of PBS-T plus 5% non-fat skim milk (PBS-TM) for 1 h at room temperature. Subsequently, after washing three times with PBS-T, wells were incubated with 50 µl of human serum samples diluted at 1:64 in PBS-TM for 1 h at 37°C. After washing six times with PBS-T, 50 µl of peroxidase-labeled goat anti-human IgG (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) diluted 1:2000 in PBS-TM were added and incubated for 1 h at 37°C. After washing six times with PBS-T, the assay was developed by adding the enzyme substrate H₂O₂ and chromogen 2,2'-azino-bis-3-ethyl-benzothiazoline sulfonic acid (ABTS) (ABTS Peroxidase Substrate System; KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, Maryland,

USA). The absorbance of duplicates from each serum sample was read at 405 nm in a plate reader (Titertek Multiskan Plus spectrophotometer, Flow Laboratories, USA). Results were expressed as liquid absorbance, obtained from the mean absorbance of duplicates of each serum sample subtracted of the absorbance of blank wells (wells that no serum sample was added, but incubated with immunoenzymatic conjugate). A positive cutoff point of the reaction was determined as the mean absorbance of ten negative control sera plus three standard deviations subtracted of the absorbance of blank wells.

2.6 Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism v. 5.0 (GraphPad Software, San Diego, USA). Seropositivity percentages found in the different assays using each peptide against serum samples from groups 1 and 2 were compared by the Fisher's exact test. The mean absorbances obtained from sera of groups 1 and 2 in the different assays using synthetic peptides were compared using unpaired Student's *t* test. Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

3 RESULTS

The complete amino acid sequences of sixteen immunodominant antigens of *T. gondii* were used to perform B cell linear epitope prediction using the method Bepipred Linear Epitope Prediction available at IEDB. From these antigens, five were representative of parasite surface antigens or SAG-related sequences (SRS): SRS16C (BSR4), SRS49A (SAG2Y), SRS49C (SAG2D), SRS49D (SAG2C) and SRS52A; two of rhoptry proteins (ROP): ROP2 and ROP7; five of microneme proteins (MIC): MIC1, MIC6, MIC8, MIC14 and MIC2-associated protein (M2AP); and four of dense granule proteins (GRA): GRA4, GRA6, GRA10 and GRA15. Figure 1 shows the prediction scores from amino acids of the complete sequence from each antigen, with a score threshold established at 1.5. The regions of higher prediction scores were chosen to synthesize peptides with a sequence of 15 residues of amino acids that were conjugated to BSA by a cysteine insertion on the N-terminal amino acid residue. The amino acid sequences of each synthetic peptide and their position in the respective antigen of *T.gondii* are shown in Table 1.

To evaluate the reactivity of *T. gondii*-specific IgG antibodies to each synthetic peptide, human serum samples were first distributed in two groups based on the results obtained from indirect ELISA-IgG and capture ELISA-IgM, confirming that all serum samples of G1 were positive IgG and IgM to *T. gondii*, and all serum samples of G2 were positive IgG, but negative IgM to *T. gondii* (Figure 2).

Next, the reactivity of IgG antibodies from human sera of both groups were evaluated with the 22 synthetic peptides by indirect ELISA (Figure 3). All peptides were recognized by serum samples of G1 and G2, with positivity rates higher than 90% for both groups when tested with peptides 1 to 11 (Pep1 - Pep11), with no significant difference between the groups. When tested with peptides 12 to 22 (Pep12 - Pep22), the positivity rates were lower than 90% for both groups of sera, except for peptides 16 and 21, that were recognized by 90% and 95% of sera from G1, respectively. There were significant differences in the positivity between the groups when the peptides 12, 13 and 21 were tested. The peptide 12 was recognized by 71% of sera from G2 compared to 43% of sera from G1 (Fig. 3B). On the other hand, the peptide 13 was recognized by 70% of sera from G1 compared to 45% of sera from G2 (Fig. 3B), while the peptide 21 was recognized by 95% of sera from G1 compared to 50% of sera from G2 (Fig. 3C).

As the synthesized peptides represent B cell linear epitopes from antigens of the immunodominant antigenic families of *T. gondii*, the mean reactivity to each peptide was then

compared between the two groups of sera with the peptides grouped according to antigenic family (Fig. 4). The mean reactivity to each peptide in the two groups of sera (G1 and G2) was always higher than the mean reactivity of ten negative serum samples, which was used to establish the cut off value for all reactions. For peptides derived from surface antigens (SRS; Pep1-Pep4), there were no significant differences in the mean reactivity between G1 and G2 (Fig. 4A). For peptides derived from rhoptry antigens (ROP; Pep 5 and Pep 7), the mean reactivity of Pep5 (derived from ROP7) was higher in sera of G2 than G1 as determined by Student's *t* test (Fig. 4B). When analyzing peptides derived from microneme antigens (MIC; Pep6, Pep8-Pep12 and Pep21-Pep22), the peptide 6 (derived from MIC1) and the peptides 9 and 10 (both derived from MIC8) showed higher mean reactivity in sera from G2 than G1 (Fig. 4C). For the other peptides derived from MIC proteins, no significant difference was found in the mean reactivity between the groups. Finally, peptides derived from dense granule antigens (GRA; Pep13-Pep20) exhibited the lowest mean reactivity, with no significant differences between the groups.

4 DISCUSSION

Serological assays to determine the presence of specific antibodies in serum samples are still currently the first-line method of diagnosis for recent or past infection caused by *T. gondii* (Sudan et al., 2013). It has been shown that the precise diagnosis of *T. gondii* infection, as well as the definition of the infection stage, is very easy in the presence of seroconversion during follow-up serology. However, some challenges still persist, as how to correctly diagnose the primary infection in pregnant women, or a congenital infection in newborns, or even a primary infection or a reactivation of a latent infection in immunosuppressed patients analyzing a single serum sample (Robert-Gangneux, 2014). Therefore, at this time, important pieces of information concerning serodiagnosis of toxoplasmosis are still lacking, and the results of all new serological tests should be considered, while new approaches are developing (Montoya and Remington, 2008; Robert-Gangneux and Dardé, 2012).

Currently, serological methods for diagnosis of toxoplasmosis utilize total *T. gondii* antigens, which have obvious problems with both specificity and sensitivity, especially for IgM and IgA antibodies, and allow a weak serological distinction between acute and chronic phases of the infection (Murat et al., 2013). In this context, researches have been developed to discover new antigens to overcome these issues in the diagnosis of toxoplasmosis. The present study aimed to identify B cell epitopes within immunodominant antigens of *T. gondii* using bioinformatic approaches, and to evaluate the diagnostic performance of peptides synthesized from these epitopes in immunoassays to detect IgG antibodies to *T. gondii* in serum samples from patients with different serological profiles of the infection.

Bioinformatics plays an important role in predicting protein structure, function and biological characteristics, and has been widely used in the analysis of protein epitopes (Ansari and Raghava, 2010; Bai et al., 2012; Sharma et al., 2013; Zhang et al., 2014). In the present study, the potential B cell epitopes within immunodominant antigens of *T. gondii* were identified using the method Bepipred Linear Epitope Prediction based on the algorithm described by Larsen et al. (2006). Based on the results obtained with this method, four peptides from surface antigens, two from rhoptry, eight from microneme, and eight from dense granule antigens were predicted as B cell epitopes, and chemically synthesized for use in immunoenzymatic assays.

All synthetic peptides were recognized by IgG antibodies of human sera from patients with different serological status of *T. gondii* infection, with mean reactivity higher than the cut off values and good differentiation from seronegative samples. These findings

demonstrate that the regions represented by these peptides are involved in the human humoral immune response to *T. gondii*, indicating that these peptides have potential use to diagnose *T. gondii* infection.

When considering the global reactivity of the human sera against the peptides, we observed that those derived from surface antigens (Pep1-Pep4) and rhoptry antigens (Pep5 and Pep7) showed high mean reactivity and positivity rates. It can be explained by the fact that these antigens are in close contact with the host immune system during the infection, since surface antigens are exposed by the parasite, and rhoptry antigens are secreted during the early events of the cell invasion by the parasite (Walker et al., 2014).

The results obtained from the mean reactivity of sera from the groups G1 and G2 against the peptides showed that Pep5 (ROP), Pep6 (MIC), Pep9 (MIC) and Pep10 (MIC) were more reactive with sera of G2 compared to G1, indicating that these epitopes can be more strongly recognized by sera from chronic stage of the infection. On the other hand, the results obtained from the positivity of sera from both groups G1 and G2 with each peptide showed that Pep13 (GRA) and Pep21 (MIC) were significantly more recognized by sera from group G1 (70% and 95%, respectively), making these epitopes potential markers of acute phase of the infection. In contrast, the Pep12 (MIC) was significantly more recognized by sera from group G2 (71%), characterizing it as potential chronic marker of infection.

However, one important limitation of this study is the lack of sera from patients with acute phase of toxoplasmosis with precise infection status and known time of infection, since sera of group G1 were characterized as suspected acute infection, only by the presence of specific IgM antibodies as defined by a classical serological method (capture ELISA) using total soluble antigen of *T. gondii*. Thus, these IgM antibodies can be characteristic of a recent infection, or may be persistent IgM from a past infection (Sudan et al. 2013).

Using synthetic peptides, it may be possible to perform immunoenzymatic assays with well-characterized immunodominant components instead of using crude extract and recombinant proteins, eliminating the needs of antigenic purification processes that are time-consuming and have serious problems of yield. In addition, the epitopic region of the antigen does not differ significantly from native molecules, a common problem associated with recombinant antigens because of posttranslational events frequently associated with prokaryotic expression systems (Holec-Gasior, 2013).

In the past, many tools for identification and prediction of B cell epitopes have been developed (Ansari and Raghava, 2010; Sollner et al., 2008), and although the majority of epitopes are conformational, most of the methods and databases have centered on

identification of linear epitopes, as we described in the present study. The conformational epitope selection relies on determination of the tertiary structure of an antigen to identify residues that interact with antibodies, but the experimental techniques required to determine the tertiary structure of the antigen, such as crystallography, are expensive and time consuming compared to linear epitope prediction.

We believe that these results are promising to be used for serodiagnosis of toxoplasmosis, and further research is required with a serum collection taken repeatedly from many donors, including pregnant women with recent seroconversion, as well as children with and without congenital toxoplasmosis. In this context, the synthetic peptides herein described should be used in protocols for investigating other specific antibody isotypes, like IgM, IgA, IgG subclasses, as well as IgG avidity.

In conclusion, the present study showed that synthetic peptides designed from B cell linear epitope prediction and representative of immunodominant *T. gondii* antigens using bioinformatic tools constitute promising antigens to be used in serological assays to diagnose toxoplasmosis as well as differentiate infection phases, as they were recognized by sera from patients in different stages of the infection. Therefore, these peptides possibly represent an alternative to the use of total or recombinant antigens in diagnostic approaches to *T. gondii* infection.

Acknowledgments

We would like to thank the Brazilian Research Agencies (CNPq, FAPEMIG and CAPES) for the financial support.

REFERENCES

- Ansari HR, Raghava GP. Identification of conformational B-cell epitopes in an antigen from its primary sequence. *Immunome Res* 2010; 6:6.
- 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 São 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.
- Bai Y, He S, Zhao G, Chen L, Shi N, Zhou H et al. *Toxoplasma gondii*: bioinformatics analysis, cloning and expression of a novel protein TgIMP1. *Exp Parasitol* 2012; 32:458-64.
- Béla SR, Oliveira Silva DA, Cunha-Júnior JP, Pirovani CP, Chaves-Borges FA, 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.
- Buffolano W, Beghetto E, Del Pezzo M, Spadoni A, Di Cristina M, Petersen E et al. Use of recombinant antigens for early postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 2005; 43:5916-24.
- Cardona N, de-la-Torre A, Siachoque H, Patarroyo MA, Gomez-Marin JE. *Toxoplasma gondii*: P30 peptides recognition pattern in human toxoplasmosis. *Exp Parasitol* 2009; 123:199-202.
- Carvalho FR, Silva DA, Cunha-Júnior JP, Souza MA, Oliveira TC, Béla SR et al. Reverse enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies against SAG1-related sequence, SAG2A, and p97 antigens from *Toxoplasma gondii* to detect specific immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgA antibodies in human sera. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15:1265-71.
- Dai J, Jiang M, Wang Y, Qu L, Gong R, Si J. Evaluation of a recombinant multiepitope peptide for serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Vaccine Immunol* 2012; 19:338-42.
- Dai JF, Jiang M, Qu LL, Sun L, Wang YY, Gong LL et al. *Toxoplasma gondii*: enzyme-linked immunosorbent assay based on a recombinant multi-epitope peptide for distinguishing recent from past infection in human sera. *Exp Parasitol* 2013; 133:95-100.
- Drapała D, Holec-Gąsior L, Kur J, Ferra B, Hiszczyńska-Sawicka E, Lautenbach D. A new human IgG avidity test, using mixtures of recombinant antigens (rROP1, rSAG2, rGRA6), for the diagnosis of difficult-to-identify phases of toxoplasmosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014; 79:342-6.

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

Holec-Gasior L. *Toxoplasma gondii* recombinant antigens as tools for serodiagnosis of human toxoplasmosis: current status of studies. Clin Vaccine Immunol 2013; 20:1343-51.

Holec-Gasior L, Ferra B, Drapala D. MIC1-MAG1-SAG1 chimeric protein, a most effective antigen for detection of human toxoplasmosis. Clin Vaccine Immunol 2012; 19:1977-9.

Hurley RA, Taber KH. Latent Toxoplasmosis gondii: emerging evidence for influences on neuropsychiatric disorders. J Neuropsychiatry Clin Neurosci 2012; 24:376-83.

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

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

Larsen JE, Lund O, Nielsen M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. Immunome Res 2006; 2:2.

Liu MM, Yuan ZG, Peng GH, Zhou DH, He XH, Yan C et al. *Toxoplasma gondii* microneme protein 8 (MIC8) is a potential vaccine candidate against toxoplasmosis. Parasitol Res 2010; 106:1079-84.

Maenz M, Schlüter D, Liesenfeld O, Schares G, Gross U, Pleyer, U. Ocular toxoplasmosis past, present and new aspects of an old disease. Prog Ret Eye Res 2014; 39:77-106.

Marcolino PT, Silva DA, Leser PG, Camargo ME, Mineo JR. Molecular markers in acute and chronic phases of human toxoplasmosis: determination of immunoglobulin G avidity by Western blotting. Clin Diagn Lab Immunol 2000; 7:384-9.

McConkey GA, Martin HL, Bristow GC, Webster JP. *Toxoplasma gondii* infection and behaviour - location, location, location? J Exp Biol 2013; 216:113-9.

Montoya JG, Remington JS. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. J Infect Dis 2008; 47:554-66.

Murat JB, Hidalgo HF, Brenier-Pinchart MP, Pelloux H. Human toxoplasmosis: which biological diagnostic tests are best suited to which clinical situations? Expert Rev Anti Infect Ther 2013; 11:943-56.

Nowakowska D, Colón I, Remington JS, Grigg M, Golab E, Wilczynski J et al. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multiplex PCR and peptide-based serological testing of samples from infants in Poland diagnosed with congenital toxoplasmosis. J Clin Microbiol 2006; 44:1382-9.

Oz HS. Maternal and congenital toxoplasmosis, currently available and novel therapies in horizon. Front Microbiol 2014; 5:1-6.

- Pietkiewicz H, Hiszczyńska-Sawicka E, Kur J, Petersen E, Nielsen HV, Stankiewicz M et al. Usefulness of *Toxoplasma gondii*-specific recombinant antigens in serodiagnosis of human toxoplasmosis. J Clin Microbiol 2004; 42:1779-81.
- Remington JS, Thulliez P, Montoya JG. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. J Clin Microbiol 2004; 42:941-5.
- Robert-Gangneux F. It is not only the cat that did it: How to prevent and treat congenital toxoplasmosis. J Infect 2014; 68:S125-33.
- Robert-Gangneux F, Dardé ML. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. Clin Microbiol Rev 2012; 25:264-96.
- Roberts A, Hedman K, Luyasu V, Zufferey J, Bessi eres 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.
- Saadatnia G, Golkar M. A review on human toxoplasmosis. Scand J Infect Dis 2012; 44:805-11.
- Sensini A. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy: opportunities and pitfalls of serological diagnosis. Clin Microbiol Infect 2006; 12:504-12.
- Sharma M, Tiwari A, Sharma S, Bhorla P, Gupta V, Gupta A et al. Fibrotic remodeling of the extracellular matrix through a novel (engineered, dual-function) antibody reactive to a cryptic epitope on the N-terminal 30 kDa fragment of fibronectin. PLoS One 2013; 8:e69343.
- Sollner J, Grohmann R, Rapberger R, Perco P, Lukas A, Mayer B. Analysis and prediction of protective continuous B-cell epitopes on pathogen proteins. Immunome Res 2008; 4:1.
- Sousa S, Ajzenberg D, Vilanova M, Costa J, Dard  ML. Use of GRA6-derived synthetic polymorphic peptides in an immunoenzymatic assay to serotype *Toxoplasma gondii* in human serum samples collected from three continents. Clin Vaccine Immunol 2008; 15:1380-6.
- Sudan V, Jaiswal AK, Shanker D. Recent trends in the diagnosis of toxoplasmosis. Clin Rev Opinions 2013; 5:11-7.
- Sukthana Y. Toxoplasmosis: beyond animals to humans. Trends Parasitol 2006; 22:137-42.
- Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int J Parasitol 2000; 30:1217-58.
- Walker DM, Oghumu S, Gupta G, McGwire BS, Drew ME, Satoskar AR. Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. Cell Mol Life Sci 2014; 71:1245-63.
- Wang Y, Wang G, Zhang D, Yin H, Wang M. Identification of novel B cell epitopes within *Toxoplasma gondii* GRA1. Exp Parasitol 2013; 135:606-10.
- Weiss LM, Dubey JP. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. Int J Parasitol 2009; 39:895-901.

Zhang J, Zhao X, Sun P, Gao B, Ma Z. Conformational B-cell epitopes prediction from sequences using cost-sensitive ensemble classifiers and spatial clustering. *Biomed Res Int* 2014; 2014:689219.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 - Prediction of B cell linear epitopes within immunodominant antigens of *T. gondii*. The complete amino acid sequence of 16 major antigens of *T. gondii* was searched for the presence of B cell linear epitopes using the method Bepipred Linear Epitope Prediction available at Immune Epitope Database and Analysis Resource (IEDB). **(A-P)** Prediction scores from amino acids of the complete sequence of each antigen of *T. gondii*, as indicated in each curve. The dashed lines indicate the score threshold (> 1.5), and the rectangles include the regions with higher prediction scores, whose amino acid sequences were used to synthesize the peptides (Pep), as indicated.

Figure 2 - Distribution of the 84 human sera in two groups according to the results obtained from indirect ELISA-IgG and capture ELISA-IgM for the detection of antibodies to soluble antigen of *Toxoplasma gondii* (STAg). **(A)** Group 1 (G1) - sera from patients with a suspected acute phase of infection defined by positive IgG and IgM antibodies to *T. gondii* ($n = 42$); **(B)** Group 2 (G2) - sera from patients with chronic infection defined by positive IgG, but negative IgM antibodies to *T. gondii* ($n = 42$). Antibody levels are expressed in ELISA index (EI), the dashed lines indicate the cut off value ($EI > 1.2$) and the horizontal bars represent the mean of EI values.

Figure 3 - Reactivity and positivity of IgG antibodies to 22 synthetic peptides representative of predicted B cell epitopes from 16 immunodominant antigens of *Toxoplasma gondii* determined by indirect ELISA in human sera of acute (G1, $n = 42$) and chronic (G2, $n = 42$) phases of infection. **(A)** Peptides 1-8; **(B)** Peptides 9-15; **(C)** Peptides 16-22. Antibody levels are expressed in liquid absorbance (405 nm), and the dashed line indicates the cut off the reaction. Asterisks indicate statistically significant differences between G1 and G2 positivity determined by the Fisher's exact test.

Figure 4 - Comparison of the reactivity of IgG antibodies to 22 synthetic peptides, representative of predicted B cell epitopes of antigens of *T. gondii*, grouped according to parasite immunodominant antigenic families in human sera of acute (G1, $n = 42$) and chronic (G2, $n = 42$) phases of infection. **(A)** Peptides from SAG-related sequences (SRS); **(B)** Peptides from rhoptry antigens (ROP); **(C)** Peptides from microneme antigens (MIC); **(D)** Peptides from dense granules antigens (GRA). Bars represent the mean and standard deviation

of reactivity for each peptide, expressed in liquid absorbance (405 nm). The dashed line indicates the cut off value, which was established as the mean reactivity of ten negative serum samples plus three standard deviations. Statistical significance was determined by the Student *t* test (***) $p < 0.001$).

TABLES AND FIGURES

Table 1 - Amino acid sequences from synthetic peptides representative of predicted B cell epitopes from immunodominant antigens of *Toxoplasma gondii*

Peptide	Antigen (total number of amino acids)	Start and end position	Amino acid sequence
Pep1	SRS16C - BSR4 (398 aa)	336 - 350 aa	BSA-CPEDPKKDKESGTETG
Pep2	SRS49A - SAG2Y (367 aa)	296 - 310 aa	BSA-CPPNPPSGGSGRTGTP
Pep3	SRS49C - SAG2D (196 aa)	156 - 170 aa	BSA-CKPEAETPATPEPSRG
	SRS49D - SAG2C (364 aa)	324 - 338 aa	
Pep4	SRS52A (297 aa)	123 - 137 aa	BSA-CAPTGDPSQNSDGNRG
Pep5	ROP 7 (542 aa)	528 - 542 aa	BSA-CGTLTGDDDMPPPET
Pep6	MIC 1 (440 aa)	248 - 262 aa	BSA-CGGPPSQPPMQPAD
Pep7	ROP 2 (407 aa)	100 - 114 aa	BSA-CGGSDGGGEPPQTPRP
Pep8	MIC 6 (349 aa)	250 - 264 aa	BSA-CSQEPEGSTPDSQQSR
Pep9	MIC 8 (666 aa)	27 - 41 aa	BSA-CAKLKEPPDPDDENSW
Pep10		652 - 666 aa	BSA-CIPSAPAPPPSGGIWS
Pep11	MIC 14 (968 aa)	910 - 924 aa	BSA-CKAEEGEGPDEDAEPE
Pep12		946 - 960 aa	BSA-CESEQDASDSESGSDD
Pep13	GRA 4 (325 aa)	40 - 54 aa	BSA-CPYPYADGQQGSPPPQ
Pep14		176 - 190 aa	BSA-CPGTTSTPTPPRPASY
Pep15	GRA 6 (224 aa)	178 - 192 aa	BSA-CSPQEPSGGGGGNDAG
Pep16	GRA 10 (894 aa)	590 - 604 aa	BSA-CSRVPPPPPPPPGSVG
Pep17		674 - 688 aa	BSA-CGLRGDPGEPSNPYLG
Pep18		283 - 297 aa	BSA-CASATPSPPERPQNFR
Pep19	GRA 15 (550 aa)	370 - 384 aa	BSA-CSQSPAGGPPTDSRTP
Pep20		492 - 506 aa	BSA-CPGPPRTENPRQPQVP
Pep21	MIC2-associated protein - M2AP (308 aa)	208 - 222 aa	BSA-CPHSPPAGEEPSLPSP
Pep22		260 - 274 aa	BSA-CPVPPQDGENPDSPQN

Figure 1

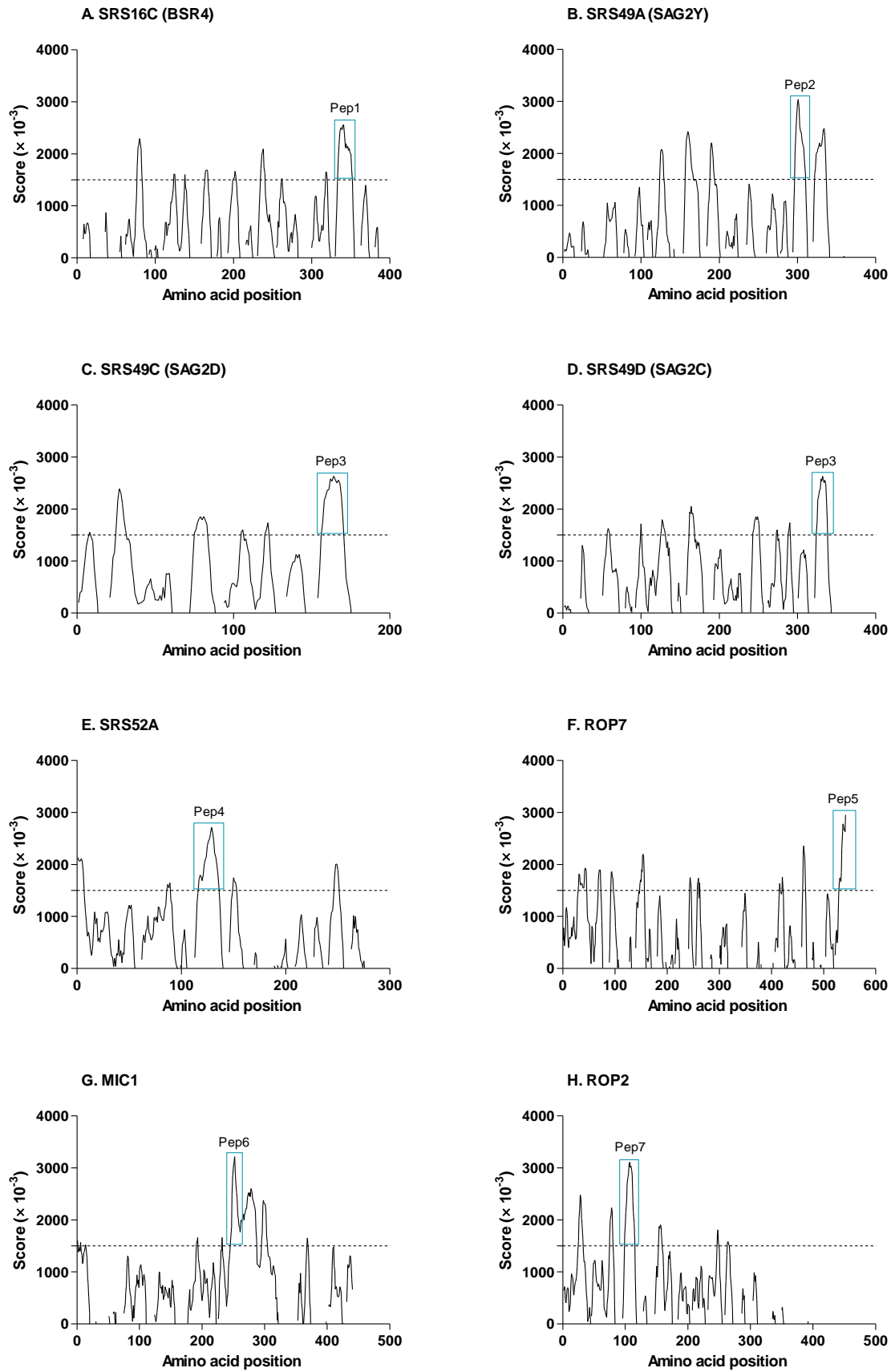


Figure 1 - Continued

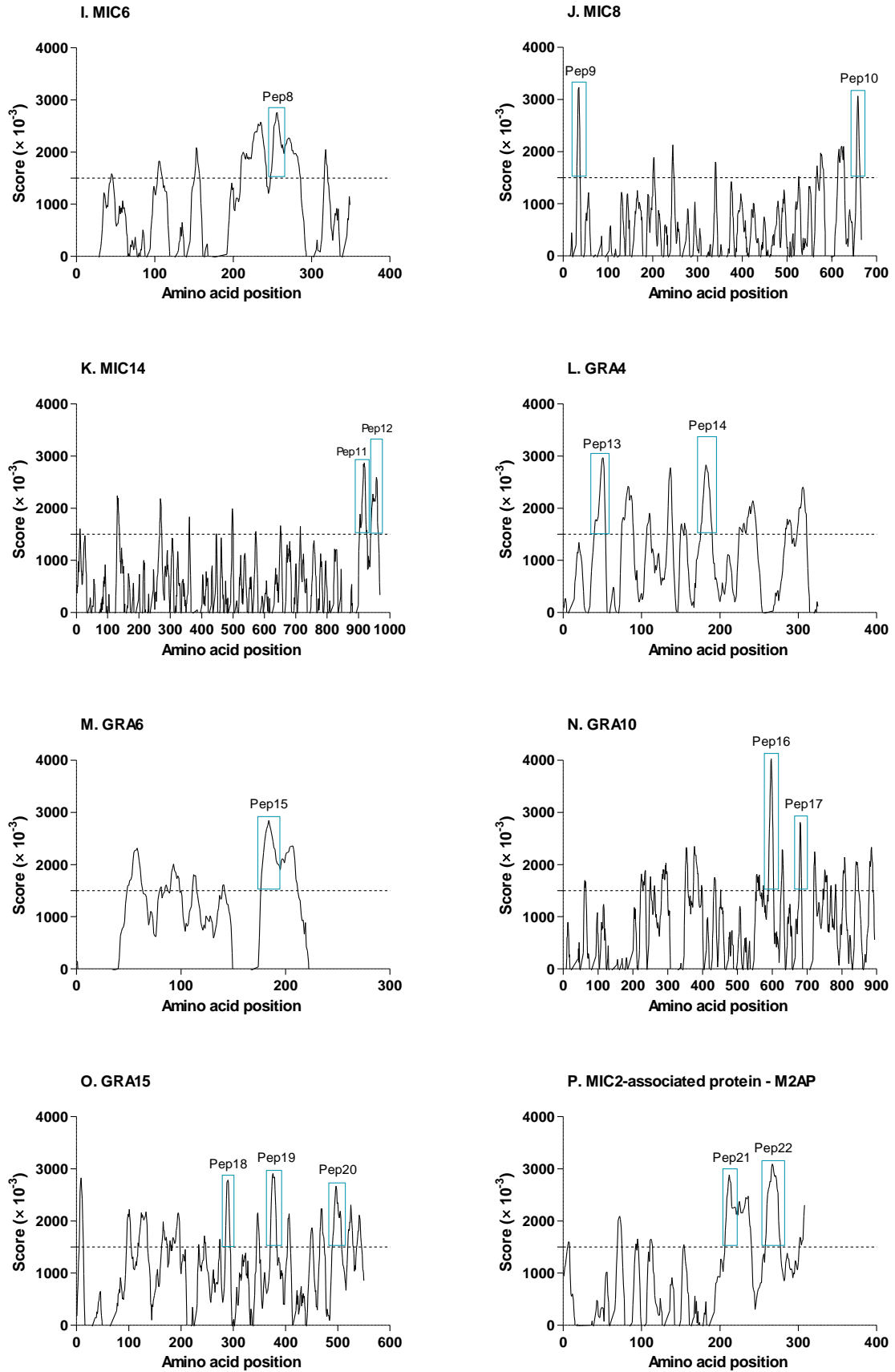


Figure 2

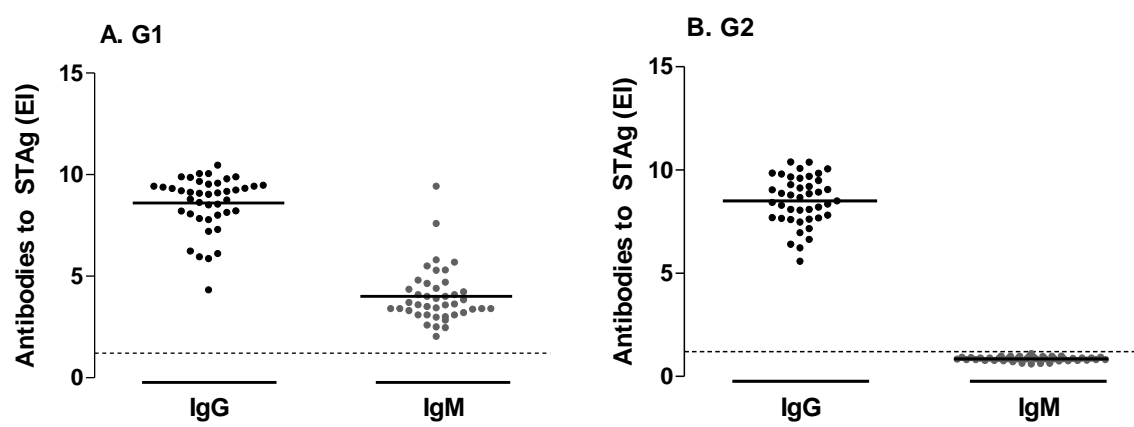


Figure 3

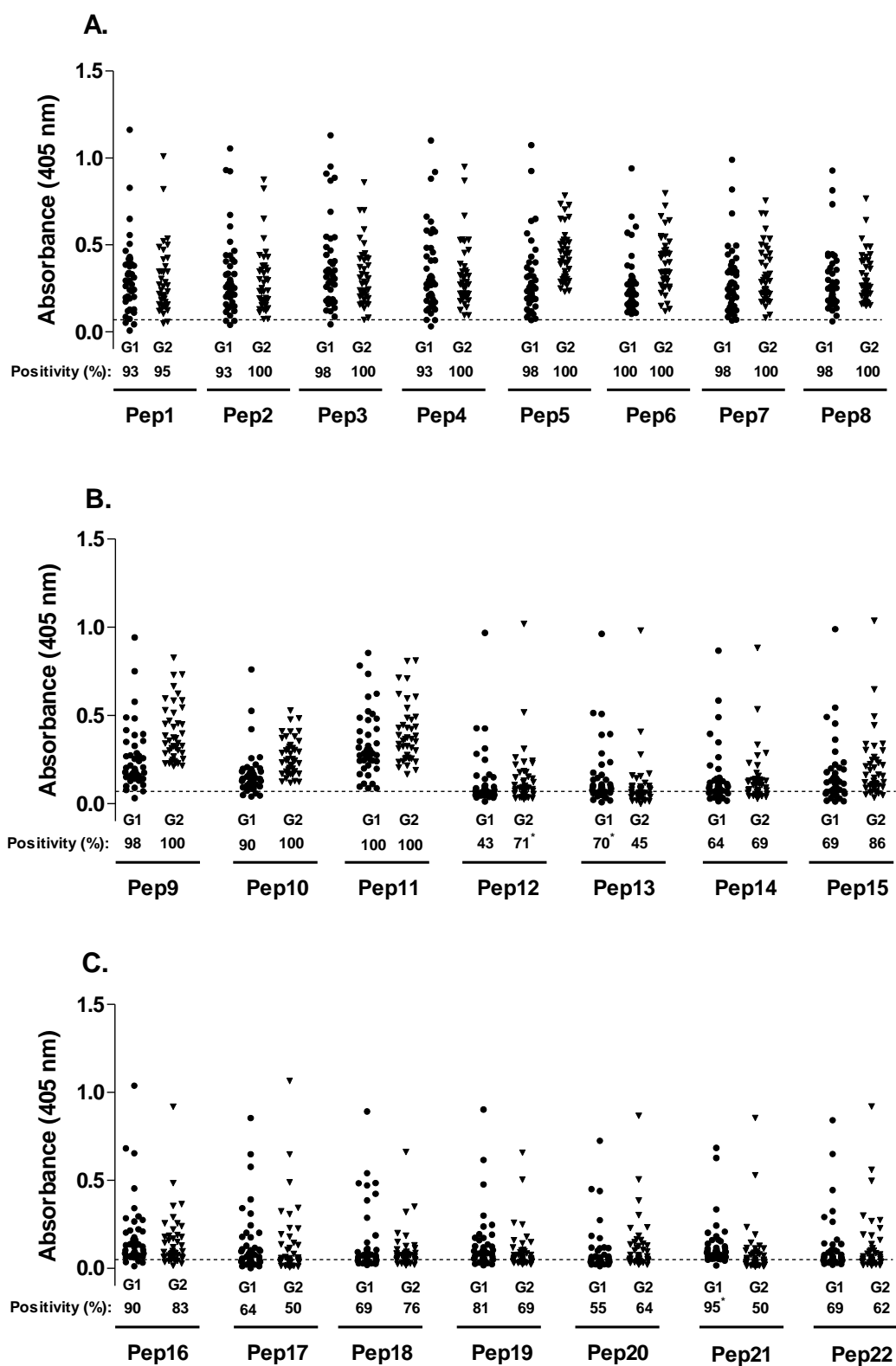


Figure 4

