



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

**SILAS SILVA SANTANA**

**Novas abordagens antigênicas em testes sorológicos  
padronizados para a diferenciação entre os estágios  
parasitários associados à infecção por *Toxoplasma gondii***

UBERLÂNDIA - MG

2016

SILAS SILVA SANTANA

**Novas abordagens antigênicas em testes sorológicos  
padronizados para a diferenciação entre os estágios  
parasitários associados à infecção por *Toxoplasma gondii***

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

UBERLÂNDIA - MG

2016

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

---

S232n  
2016      Santana, Silas Silva, 1987  
Novas abordagens antigênicas em testes sorológicos padronizados para a diferenciação entre os estágios parasitários associados à infecção por *Toxoplasma gondii* / Silas Silva Santana. - 2016.  
114 f. : il.

Orientador: José Roberto Mineo.  
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. Sorodiagnostics - Teses. 4. Peptídeos - Teses. I. Mineo, José Roberto. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. 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

**Silas Silva Santana**

“Novas abordagens antigênicas em testes sorológicos padronizados para a diferenciação entre os estágios parasitários associados à infecção por *Toxoplasma gondii*”

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).

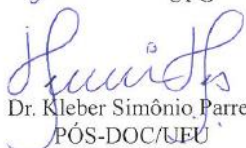
Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:


Uberlândia, 8 de março de 2016.

  
Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira  
UFG

  
Profa. Dra. Angelica de Oliveira Gomes  
UFIM

  
Dr. Kleber Simônio Parreira  
PÓS-DOC/UFU

  
Dra. Carolina Salomão Lopes  
PÓS-DOC/UFU

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

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais, *Antônio e Hilda*,  
por terem sempre me guiado de maneira correta, por terem sido modelos para mim, por se preocuparem sempre com o meu bem-estar, sempre terem entendido minhas escolhas e acreditado em mim se esforçando para que meus objetivos fossem alcançados e em muitos casos se sacrificando para que eu pudesse ter o que eles não tiveram.

À minha namorada e companheira, *Karenn*,  
pelo companheirismo, amizade, apoio, confiança, amor e compreensão em todos os momentos que passamos juntos. Por me apoiar e conseguir extrair o melhor de mim em todas as situações. Pela felicidade que me proporcionou em toda essa caminhada.

Ao meu irmão, *Salles*,  
por ter sido sempre um grande amigo, pelo apoio e por ter sempre sido uma pessoa de fácil convívio. Por acreditar em mim incondicionalmente.

Ao meu tio, *Olival*,  
por ser uma pessoa admirável que sempre me apoiou e acreditou em mim e por sempre ter ajudado a mim e a todos da família. Por juntamente com meus pais, ser um dos responsáveis pela minha trajetória.

Ao meu orientador, *Prof. Dr. José Roberto Mineo*,  
por abrir as portas de seu laboratório para mim, por ter acreditado em meu potencial e fornecido o ambiente para que eu pudesse alcançar o meu verdadeiro potencial. Pelo apoio e por todo aprendizado nestes anos de convívio.

À *Dra. Deise Aparecida de Oliveira Silva* e ao *Prof. Dr. Jair Pereira Cunha Júnior*, por terem contribuído na minha formação científica, desde a iniciação científica ao mestrado.

Aos amigos e colaboradores, *Fernando Reis, Heber Leão, Vinícius Paiva, Patrício Barros, Ana Cláudia e Luiz Carlos Gebrim*, pelo auxílio na execução dos procedimentos experimentais, pelo apoio e amizade, e pelos momentos de descontração.

## AGRADECIMENTOS

Aos professores *Dra. Júlia Maria Costa Cruz, Dr. Jair Pereira Cunha Júnior e Dr. Sydnei Magno da Silva*, pela disposição em participar na banca de qualificação deste trabalho e pelas valiosas contribuições apresentadas.

Ao professor *Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo*, pela confiança no meu trabalho, pelos conhecimentos transmitidos e pela grande colaboração desde a discussão de ideias até a leitura dos manuscritos para a publicação.

Ao professor *Dr. Furio Spano*, por ter contribuído desde a confecção das proteínas recombinantes CCp5A e OWP1 até as correções para envio do *paper* para publicação.

Ao professor *Dr. João Luís Garcia*, pelas contribuições no manuseio dos oocistos de *T. gondii*.

Aos amigos e companheiros de convívio do Laboratório de Imunoparasitologia, *Kléber, Flávia, Eliézer, Vanessa Rezende, Vanessa Miranda, Lydiane, Tamires, Mylla, Maraísa, Murilo, Cristina, Fernanda, Caroline Mota, Carolina Salomão, Zilda e Marley*, pelos bons momentos de convivência no laboratório, pelos conhecimentos compartilhados e pela colaboração.

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.

Aos meus amigos de longa data, *Diego, Diogão, Garcinha, Zezé, Vinícius, Willian, Max e Frederico*, pela amizade durante esses anos e por terem me proporcionado apoio em vários momentos.

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.

“Descobrir consiste em olhar para o que todo mundo está vendo e pensar uma coisa diferente”.

(Roger Von Oech)



## RESUMO

*Toxoplasma gondii* é um parasito intracelular que infecta virtualmente todos os animais de sangue quente, incluindo a espécie humana. Nestes hospedeiros, a infecção geralmente é assintomática em indivíduos imunocompetentes, mas em indivíduos imunocomprometidos e em casos de toxoplasmose congênita, as manifestações podem ser graves. O diagnóstico da toxoplasmose é usualmente realizado por métodos sorológicos, com detecção das imunoglobulinas IgG, IgM e IgA em amostras biológicas. As técnicas sorológicas atuais detectam a exposição ao parasito, mas não apresentam capacidade de diferenciar as vias de infecção, as quais podem ocorrer por ingestão de oocistos ou de cistos teciduais, dificultando a implementação de medidas preventivas para controlar e reduzir a infecção por *T. gondii*. Além disso, tais técnicas sorológicas não apresentam a possibilidade de diferenciar infecção aguda de infecção crônica, o que limita a determinação da fase da infecção, principalmente em indivíduos imunocomprometidos e em gestantes, além dos casos de toxoplasmose congênita. No presente trabalho, as proteínas recombinantes CCp5A e OWP1 de oocistos/esporozoítos de *T. gondii* foram utilizadas em testes sorológicos com o objetivo de diferenciar infecções via ingestão de oocistos ou cistos teciduais do parasito em amostras de soros de animais e humanos. A reatividade destas proteínas foi analisada, em paralelo com o antígeno solúvel de *Toxoplasma* (STAg), utilizando-se de um painel de amostras de soros de animais (galinhas, porcos e camundongos) infectados naturalmente ou por meio de protocolos de infecção experimental, a partir de diferentes estágios infecciosos do parasito. Em adição, estas proteínas foram testadas em amostras de soros de pessoas infectadas por via hídrica (via oocisto) em um surto de toxoplasmose e de gestantes soropositivas (IgM<sup>+</sup>/IgG<sup>+</sup>) para *T. gondii*, cuja via de infecção era desconhecida. Em animais, somente a proteína CCp5A foi capaz de diferenciar o estágio infeccioso de *T. gondii* responsável pela infecção, com reatividade específica para soros de indivíduos infectados por oocistos. Além disso, esta proteína também apresentou maior reatividade em amostras de soros na fase recente de infecção em porcos e camundongos. Em humanos, CCp5A apresentou reatividade preferencial com soros do surto de toxoplasmose, em comparação com soros das gestantes. Esses resultados indicam que a proteína CCp5A pode ser uma nova ferramenta para identificar o estágio infeccioso de *T. gondii* responsável pela infecção (oocisto ou cisto tecidual). Em uma segunda parte deste trabalho, com o intuito de avaliar outras preparações antigênicas visando a determinação das fases da infecção por *T. gondii*, se infecção aguda ou crônica, o peptídeo sintético pMIC8 foi testado, em paralelo com STAg, em imunoensaios utilizando-se amostras de soros de indivíduos em diferentes fases da infecção. Inicialmente, tal peptídeo foi utilizado para avaliar a cinética de anticorpos IgG em camundongos experimentalmente infectados com *T. gondii*. Posteriormente, imunoensaios utilizando pMIC8 e STAg foram realizados para a detecção de anticorpos IgM, IgA e IgG em 124 amostras de soros humanos divididos em 5 grupos, de acordo com a fase da infecção por *T. gondii*: Grupo I (infecção até 4 meses); Grupo II (infecção entre 5 e 8 meses); Grupo III (infecção entre 9 e 12 meses); Grupo IV (infecção acima de 12 meses); e Grupo V (indivíduos soronegativos). No modelo murino, pMIC8 mostrou-se como um marcador em potencial para a caracterização da infecção recente, demonstrando forte reação com anticorpos IgG na fase precoce da infecção. Em humanos, anticorpos IgM e IgA contra pMIC8 apresentaram melhor caracterização do tempo de infecção em amostras de soros de fase aguda (até 12 meses de infecção), quando comparados aos anticorpos dirigidos contra STAg. Por outro lado, a porcentagem de detecção de IgG contra pMIC8 foi maior nas amostras de soros do Grupo I (fase aguda precoce) e menor nas do grupo IV (fase crônica). Este padrão foi inverso ao observado

com STAg, que apresentou menor porcentagem de detecção de IgG no grupo I. Visando caracterizar as diferenças quanto a detecção de IgG quando são utilizadas as preparações antigênicas STAg e pMIC8, foi calculada a razão entre os valores dos Índices ELISA de IgG obtidos nas reações com estes dois antígenos (Razão STAg/pMIC8), que demonstrou ser um parâmetro importante na diferenciação sorológica da fase da infecção. Em síntese, os resultados obtidos neste estudo sugerem que pMIC8 pode ser uma ferramenta relevante na diferenciação entre infecção recente e infecção distante na infecção por *T. gondii*.

**Palavras-chave:** *Toxoplasma gondii*; toxoplasmose; diferenciação de vias de infecção; diferenciação de fases de infecção; sorodiagnóstico; proteínas recombinantes; peptídeos sintéticos.

## ABSTRACT

*Toxoplasma gondii* is an intracellular parasite that infects virtually all warm-blooded animals, including humans. In human beings, the infection is usually asymptomatic in immunocompetent individuals, but can cause severe clinical manifestations in immunocompromised individuals and in cases of congenital toxoplasmosis. The diagnosis of this infection is usually performed by serological methods that detect IgG, IgM and IgA antibodies in biological samples. The conventional serological assays currently available detect only the exposure to parasite, and there is no serological techniques to accurately estimate the source of infection (oocyst or cyst), which hinders the implementation of prevention and control procedures of this infection. In addition, the serological differentiation between recent and chronic phases of the infection is difficult to achieve in the laboratory routine, making difficult the correct diagnosis of toxoplasmosis, mainly in immunocompromised individuals and pregnant women. In the present study, two recombinant proteins (CCp5A and OWP1) from oocyst/sporozoite of *T. gondii* were evaluated in serological tests to differentiate infections occurring by ingestion of oocysts or tissue cysts. The reactivity of these two recombinant proteins was assessed, in parallel with soluble *Toxoplasma* antigen (STAg), against panels of serum samples from animals (chickens, pigs and mice) naturally or experimentally infected by different infective stages of the parasite. Also, we tested sera from humans who have been infected by oocyst during a well-characterized toxoplasmosis outbreak, as well as sera from pregnant women tested IgM<sup>+</sup>/IgG<sup>+</sup> for *T. gondii*, which source of infection was unknown. Only the sporozoite-specific CCp5A protein was able to differentiate the parasite stage that infected chickens, pigs and mice, with specific reactivity for sera from oocyst-infected animals. Furthermore, this protein showed a preferential reactivity for recent infection by oocyst/sporozoite in pigs and mice. In humans, CCp5A showed higher reactivity with serum samples from the outbreak, compared with serum from pregnant women. Altogether, these findings demonstrate the usefulness of the CCp5A protein as a new tool to identify the parasite stage of *T. gondii* responsible for the infection (oocyst or tissue cyst). Also, in order to evaluate an alternative antigenic preparation to differentiate the phases of *T. gondii* infection, whether acute or chronic, a synthetic peptide from the microneme 8 protein (pMIC8) was tested, in parallel with STAg in immunoassays, using serum samples from individuals in different infection phases. Initially, this peptide was used to evaluate the kinetics of IgG antibodies in mice experimentally infected with *T. gondii*. After, immunoassays using pMIC8 and STAg were conducted to detect IgM, IgA and IgG antibodies in 124 human serum samples divided into five groups, according to the phase of *T. gondii* infection: Group I (up to 4 months of infection); Group II (5 to 8 months of infection); Group III (9 to 12 months of infection); Group IV (over 12 months of infection); and Group V (seronegative individuals). In the murine model, pMIC8 showed to be a potential marker of recent infection with strong detection of IgG antibodies in the early phase of infection. In humans, IgM and IgA to pMIC8 showed better characterization of the time of *T. gondii* infection in serum samples from recent phase (up to 12 months of infection), when compared to those tested against STAg. The percentage of IgG detection to pMIC8 was higher in sera from Group I (early acute phase) and lower in sera from Group IV (chronic phase). This pattern was the opposite of those observed to STAg, that showed lower detection percentage in Group I). To underline the differences in IgG detection using pMIC8 and STAg, it was determined a ratio between the ELISA index obtained from both antigenic preparations

(STAg/pMIC8), which showed an accurate parameter to differentiate the phases of infection. Overall, these findings suggest that pMIC8 could be a valuable tool to differentiate recent from chronic *T. gondii* infection.

**Keywords:** *Toxoplasma gondii*; toxoplasmosis; differentiation of sources of infection; differentiation of phases of infection; Serodiagnosis; recombinant proteins; synthetic peptides.

## SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO .....	15
CAPÍTULO I.....	17
1 <i>Toxoplasma gondii</i> .....	18
1.1 Estágios infecciosos .....	19
1.2 Hospedeiros .....	21
1.3 Ciclo de vida .....	22
1.4 Vias de transmissão: Como os seres humanos se infectam? .....	24
1.5 Prevalência da toxoplasmose em humanos.....	29
1.6 Invasão celular e ciclo lítico .....	31
1.7 Resposta imune celular .....	33
1.8 Resposta imune humoral.....	35
1.9 Manifestações clínicas .....	38
1.10 Prevenção e tratamento .....	42
1.11 Diagnóstico .....	46
1.12 Novas abordagens no diagnóstico sorológico da toxoplasmose .....	41
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
CAPÍTULO II.....	59
ABSTRACT .....	61
INTRODUCTION .....	62
MATERIALS AND METHODS .....	64
Study approval.....	64
Proteins .....	65
Serum samples from animals.....	65
Human serum samples .....	67
Western blot analysis.....	67
Enzyme-linked immunosorbent assay .....	68
Statistics .....	68
RESULTS .....	69
Serologic differentiation of <i>T. gondii</i> stages in chicken infections.....	69
Serologic differentiation of <i>T. gondii</i> stages in pig infections .....	69
Serologic differentiation of <i>T. gondii</i> stages involved in mouse infections .....	71
Evaluation of CCp5A as a serologic marker in human sera .....	71
DISCUSSION.....	72
ACKNOWLEDGMENTS .....	77
REFERENCES .....	78

<b>FIGURE LEGENDS</b> .....	86
<b>FIGURES</b> .....	88
<b>CAPÍTULO III</b> .....	92
<b>Abstract</b> .....	94
<b>Introduction</b> .....	95
<b>Materials and Methods</b> .....	97
<b>Production of pMIC8 and Soluble <i>Toxoplasma</i> Antigen (STAg)</b> .....	97
<b>Mouse serum samples</b> .....	97
<b>ELISA</b> .....	98
<b>Statistical analysis</b> .....	99
<b>Results</b> .....	99
<b>Kinetics of IgG antibodies to pMIC8 and STAg in mice experimentally infected with <i>T. gondii</i></b> .....	99
<b>Detection of human IgG antibodies and utilization of a ratio between IgG values for STAg and pMIC8 in the differentiation of serological profile of <i>T. gondii</i> infection</b> .....	101
<b>Algorithm of serological differentiation of infection phases using the ratio STAg/pMIC8</b> .....	102
<b>Discussion</b> .....	103
<b>Acknowledgments</b> .....	106
<b>References</b> .....	107
<b>FIGURES CAPTIONS</b> .....	109
<b>FIGURES</b> .....	111

## APRESENTAÇÃO

A toxoplasmose é uma infecção causada pelo parasito *Toxoplasma gondii*, um protozoário oportunista pertencente ao filo Apicomplexa, que infecta virtualmente todas as espécies de aves e mamíferos, incluindo a espécie humana. O diagnóstico da toxoplasmose na maioria dos casos é realizado utilizando técnicas sorológicas para a detecção de várias classes de imunoglobulinas. A maior parte dos *kits* diagnósticos utilizados na rotina laboratorial utilizam antígenos totais provenientes da lise do parasito, os quais apresentam uma série de limitações, principalmente na diferenciação das fases da toxoplasmose e na detecção do estágio infeccioso responsável pela infecção.

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) avaliar a capacidade de duas proteínas recombinantes de oocistos/esporozoítos de *T. gondii* (CCp5A e OWP1), em comparação com o antígeno solúvel do *Toxoplasma* (STAg), na identificação do estágio infeccioso responsável pela infecção em animais (galinhas, porcos e camundongos) experimentalmente ou naturalmente infectados pelo parasito. Além disso, estas proteínas foram testadas contra amostras de soros humanos de indivíduos infectados durante um surto de toxoplasmose, cuja transmissão foi epidemiologicamente comprovada por meio de oocistos veiculados por água contaminada. Também foram testadas com um painel de soros de gestantes com sorologia positiva para toxoplasmose, porém sem nenhuma informação sobre a forma infecciosa responsável pela infecção; e (2) avaliar o potencial de um peptídeo sintético da proteína MIC8 de *T. gondii* (pMIC8) na diferenciação das fases da infecção (aguda ou crônica) usando soros de cinética de anticorpos de infecção experimental em camundongos e soros humanos de indivíduos com diferentes perfis sorológicos de toxoplasmose.

Esta tese foi subdividida em 3 capítulos, conforme apresentado a seguir:

**Capítulo I – Revisão Bibliográfica** - Apresenta uma revisão de literatura atualizada sobre o protozoário parasita *Toxoplasma gondii*.

**Capítulo II - CCp5A protein from *Toxoplasma gondii* as a serological marker of oocyst-driven infections in humans and domestic animals.** Artigo publicado no periódico *Frontiers in Microbiology*, em 2015, apresentando os resultados da avaliação das proteínas recombinantes CCp5a e OWP1 de oocisto/esporozoíto de *T. gondii* na diferenciação de infecção via oocisto e infecção por cisto tecidual.

**Capítulo III – pMIC8: A new peptide with usefulness in serological tests to differentiate between recent and chronic infection by *Toxoplasma gondii*.** Artigo escrito e formatado para submissão e publicação no periódico *Clinical Microbiology and Infection*, apresentando os resultados obtidos na utilização do peptídeo sintético pMIC8 como ferramenta na diferenciação das fases da infecção por *T. gondii*.



# *CAPÍTULO I*

## *Revisão Bibliográfica*

## 1 *Toxoplasma gondii*

*Toxoplasma gondii* é um parasito intracelular obrigatório que foi descoberto, concomitantemente, em 1908, por Nicolle e Manceaux estudando *Leishmania* no roedor *Ctenodactylus gundi* na Tunísia, e por Splendore estudando formas evolutivas supostamente de *Leishmania* em tecidos de coelhos, no Brasil. Os dois grupos de pesquisa confundiram inicialmente este parasito com formas de *Leishmania*, embora Nicolle e Manceaux posteriormente tenham nomeado este novo parasito como *Toxoplasma gondii* (FERGUSON, 2009). O nome “*Toxoplasma*” significa forma de arco, em grego, e foi utilizado em função da morfologia das formas evolutivas do parasito (WEISS; DUBEY, 2009).

A importância de *T. gondii* em humanos foi inicialmente reconhecida em 1920 em um caso de uma criança infectada congenitamente que apresentava hidrocefalia, retinocoroidite e encefalite. Na década de 80, a toxoplasmose adquiriu uma grande importância decorrente do crescente número de pessoas HIV positivas, representando um grande risco de vida para estes pacientes, em função da encefalite grave ligada a *T. gondii* (LUFT et al., 1983; LUFT; REMINGTON, 1988; 1992). A toxoplasmose também é importante em outros tipos de situações em que se observa imunossupressão, como no tratamento contra o câncer e na prevenção da rejeição a transplantes. Em indivíduos imunocompetentes, a infecção normalmente é assintomática ou leve, com sintomas inespecíficos semelhantes a várias outras doenças. Existe alta dependência do estado da imunidade do hospedeiro para o estabelecimento da patologia de *T. gondii* em seres humanos (DUBEY, 2008).

A infecção por *T. gondii* pode apresentar um grande espectro de sinais e sintomas a depender das espécies infectadas. A toxoplasmose, em algumas espécies de mamíferos aquáticos e em marsupiais, pode ser fatal. Por outro lado, em humanos e em alguns animais utilizados para alimentação humana (porco, ovelha) a infecção congênita é usual, podendo levar a sérios acometimentos para o feto em desenvolvimento. Deste modo, este parasito apresenta grande importância médica e veterinária (DUBEY, 2009b; DUBEY; WELCOME, 1988).

Taxonomicamente, *T. gondii* 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; *Eimeria* spp., agente etiológico da coccidiose em aves; e *Neospora caninum*, causador da neosporose em cães e bovinos (BLADER; SAEIJ, 2009; INNES, 2010).

### 1.1 Estágios infecciosos

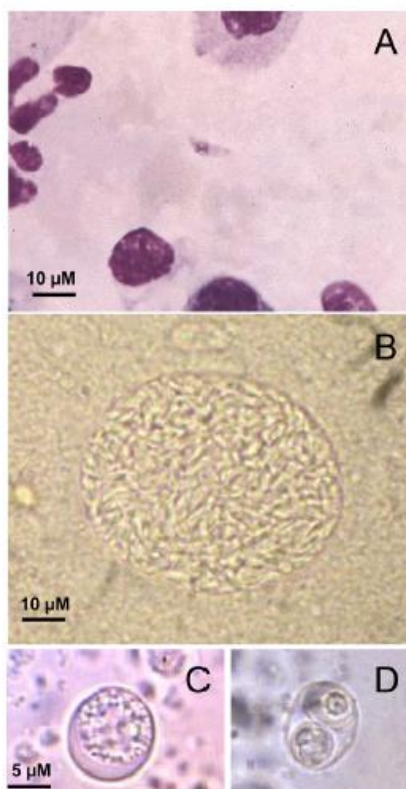
Existem 3 estágios infecciosos que são importantes no estabelecimento da infecção por *T. gondii*: uma forma de divisão rápida denominada taquizoíto; uma forma de divisão lenta contida no interior de cistos teciduais chamada bradizoíto; e um estágio relacionado à contaminação ambiental chamado esporozoíto, que se encontra contido em uma estrutura denominada oocisto (Figura 1). Esses estágios infecciosos apresentam um formato semelhante a um arco ou em forma de “banana” e têm, em média, 2 a 6 µm de comprimento e 4 a 8 µm de largura. Como membro do filo Apicomplexa, *T. gondii* apresenta em sua porção apical uma estrutura complexa especializada que está associada com organelas secretórias como roptrias, micronemas e grânulos densos, formando o complexo apical (DUBEY, 1991;2008; DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; MONTOYA; LIESENFELD, 2004).

Taquizoítos são formas de disseminação rápida capazes de invadir todas as células nucleadas dos vertebrados (Figura 1A), formando o vacúolo parasitóforo. Este vacúolo impede a ação da via degradativa da célula hospedeira pela inibição da fusão do lisossomo, sendo essencial para a sobrevivência do parasito. Taquizoítos estão presentes na fase aguda da infecção, podendo se disseminar para todos os tecidos do hospedeiro. Devido à resposta imune do hospedeiro, taquizoítos se diferenciam em bradizoítos contidos em cistos teciduais, iniciando a fase crônica da infecção. Além disso, essa forma parasitária apresenta grande importância na infecção congênita, por terem a capacidade de cruzar a barreira transplacentária (HALONEN; WEISS, 2013; MONTOYA; LIESENFELD, 2004).

Os bradizoítos são formas resultantes da transformação de taquizoítos e apresentam uma taxa de divisão lenta no interior dos cistos teciduais (Figura 1B). Os cistos apresentam forma esférica ou alongada, tamanho variado, podendo conter poucos a centenas de bradizoítos, e geralmente estão localizados em células nervosas e musculares. O metabolismo dos bradizoítos é lento, sendo ideal para a sobrevivência do parasito por longos períodos em seus hospedeiros, como observado nas infecções crônicas por *T. gondii*. A morte da célula hospedeira pode levar

à ruptura da parede do cisto e à liberação dos bradizoítos, que poderão invadir outras células. Em situações de imunossupressão do hospedeiro, os bradizoítos também podem ser liberados dos cistos, convertendo-se novamente em taquizoítos e determinando a reativação da infecção no hospedeiro (DUBEY, 2009a; MONTOYA; LIESENFELD, 2004).

Os esporozoítos são formas encontradas dentro de oocistos maduros. A parede do oocisto é composta por uma multicamada de membranas extremamente robustas, que protegem o parasito de danos mecânicos e químicos, além de permitir sua sobrevivência por longos períodos. Os oocistos são liberados no ambiente na forma não esporulada (Figura 1C) pelos hospedeiros definitivos infectados e, em condições adequadas de temperatura e umidade, estas estruturas sofrem esporulação. Os oocistos esporulados (Figura 1D) medem aproximadamente 13  $\mu\text{m}$  de comprimento e 11  $\mu\text{m}$  de largura e contêm dois esporocistos elipsoides, cada um medindo 8  $\mu\text{m}$  x 6  $\mu\text{m}$ , e contendo quatro esporozoítos em seu interior. Em solo úmido, os oocistos podem sobreviver até mais de um ano, podendo contaminar o solo, a água e vegetais, constituindo a forma responsável pela contaminação ambiental (HALONEN; WEISS, 2013; INNES, 2010; ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012; TORREY; YOLKEN, 2013).



**Figura 1 – Estágios infecciosos de *Toxoplasma gondii*.** (A) Taquizoítos em lavado broncoalveolar corado pelo método de Giemsa; (B) Cisto cerebral contendo bradizoítos obtido a partir de cérebro de camundongo infectado; (C) Oocisto não esporulado e (D) Oocisto esporulado com dois esporocistos em seu interior.

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

## 1.2 Hospedeiros

A partir da descoberta de *T. gondii*, a infecção causada por este parasito (toxoplasmose) foi observada em todos os animais de sangue quente, incluindo a espécie humana. Este parasito apresenta uma grande capacidade de infecção, podendo infectar aves e mamíferos selvagens, silvestres e domésticos, incluindo mamíferos aquáticos, além de apresentar uma impressionante adaptação aos seus hospedeiros, podendo causar infecção persistente por toda a vida destes. Existem relatos de detecção de anticorpos específicos contra *T. gondii* em animais de sangue frio, como répteis e anfíbios, porém aspectos relacionados à viabilidade do parasito nestes animais e à importância epidemiológica destes possíveis hospedeiros no ciclo biológico do

parasito ainda precisam ser estudados (CONRAD et al., 2005; ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012; TENTER, 2009).

Mamíferos da família *Felidae*, incluindo gatos domésticos e selvagens, são os hospedeiros definitivos do parasito, abrigando seus ciclos assexuado (esquizogonia) e sexuado (gametogonia) de multiplicação. Estes animais liberam oocistos no ambiente, levando à disseminação do parasito. Os hospedeiros intermediários são todos os outros animais de sangue quente, incluindo o homem, os quais abrigam somente o ciclo assexuado de multiplicação do parasito (DABRITZ; CONRAD, 2010; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

*T. gondii* normalmente parasita seus hospedeiros, tanto intermediários quanto definitivos, sem causar infecção grave, embora possam ocorrer muitas variações, dependendo da espécie, do perfil genético e da idade do hospedeiro. Neste sentido, camundongos de qualquer idade são suscetíveis à toxoplasmose, embora algumas linhagens sejam mais suscetíveis que outras. Ratos adultos não apresentam doença grave relacionada à *T. gondii*, enquanto ratos jovens podem morrer por toxoplasmose. Cães e porcos adultos também não apresentam sintomas relacionados à toxoplasmose, enquanto filhotes podem apresentar sintomatologia. Bovinos e cavalos estão entre os hospedeiros mais resistentes à toxoplasmose clínica, enquanto marsupiais são altamente sensíveis à infecção. Os seres humanos são considerados resistentes à infecção, exceto em casos de imunossupressão. Até o momento, não há uma correlação estabelecida entre determinado perfil genético e o desenvolvimento da infecção na espécie humana (HILL, D. E.; CHIRUKANDOTH; DUBEY, 2005; SCHLUTER et al., 2014).

Por apresentar grande dispersão geográfica e persistir por toda a vida do hospedeiro, observa-se uma soroprevalência muito elevada da infecção por *T. gondii* em animais silvestres, em animais usados na alimentação humana e na própria espécie humana. Este aspecto reflete o grande sucesso deste parasito em infectar e se adaptar a uma grande variedade de hospedeiros e ambientes (DUBEY, 1996; DUBEY et al., 2012).

### **1.3 Ciclo de vida**

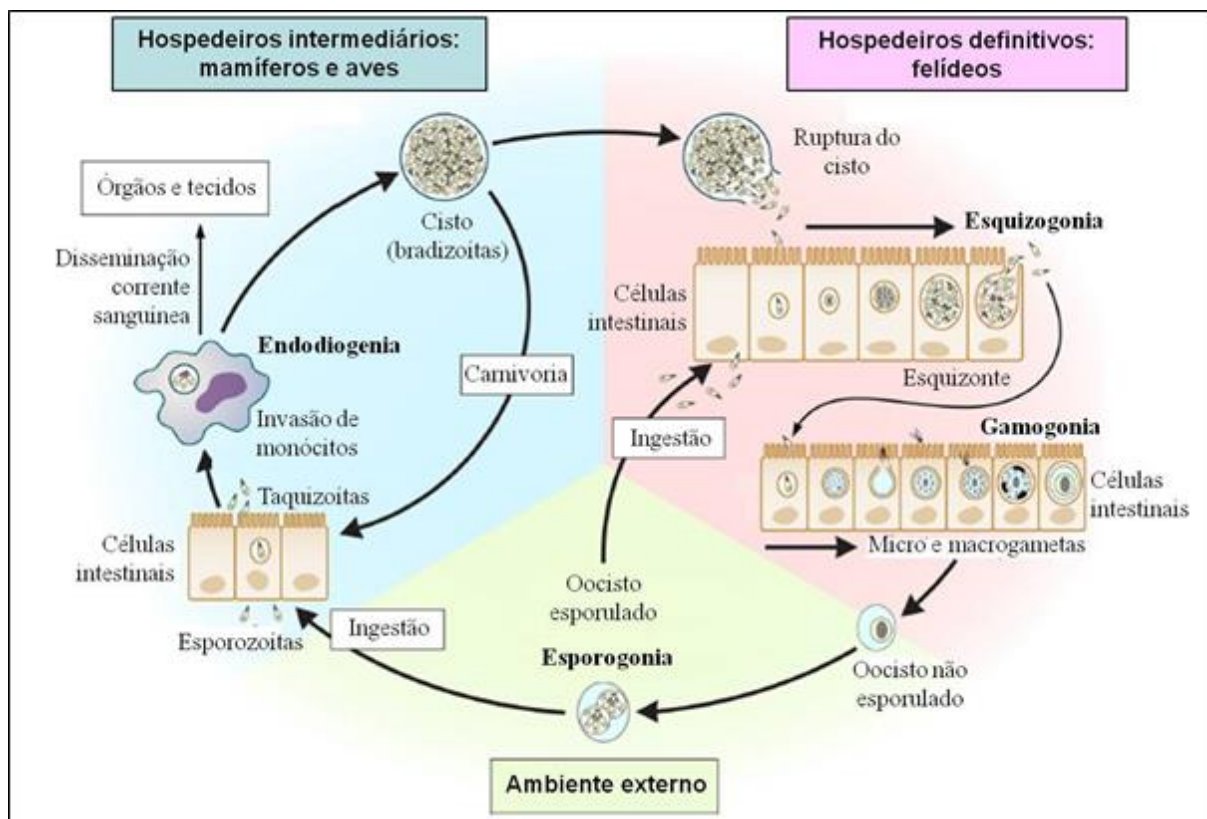
*T. gondii* apresenta ciclo de vida complexo, denominado ciclo heteroxênico. Este ciclo exhibe alternância entre reprodução sexuada, que ocorre exclusivamente nos hospedeiros

definitivos, e reprodução assexuada, que pode ocorrer nos hospedeiros definitivos e intermediários (DUBEY, 2008) (Figura 2).

A reprodução sexuada ocorre exclusivamente nas células intestinais de animais da família *Felidae*, como os gatos domésticos e os felinos selvagens. Após a ingestão, pelo carnivorismo, de cistos presentes nos tecidos dos hospedeiros intermediários, há a liberação dos bradizoítos a partir do rompimento da parede do cisto pelas enzimas líticas do estômago dos hospedeiros definitivos. Os bradizoítos liberados invadem os enterócitos, onde sofrem algumas multiplicações assexuadas, dando origem a merozoítos no interior de esquizontes. Posteriormente, ocorre a reprodução sexuada a partir da diferenciação de gametas masculinos e femininos que, após a fertilização, levam à formação de oocistos, que são liberados na forma não esporulada nas fezes do felino infectado. No ambiente, em condições ideais, ocorre a esporulação, com a formação do oocisto esporulado contendo dois esporocistos com 4 esporozoítos cada. A liberação de oocistos pode contaminar o solo e a água, podendo levar à infecção de outros hospedeiros definitivos (FISHBACK; FRENKEL, 1991; HALONEN; WEISS, 2013; TENTER et al., 2000).

Nos hospedeiros intermediários infectados é observada somente a reprodução assexuada do parasito. Tais hospedeiros podem se infectar de maneira horizontal, por meio da ingestão de cistos contendo bradizoítos, via carnivorismo, ou por meio da ingestão de oocistos presentes no ambiente, contaminando solo, água e alimentos, como os vegetais. Após a ingestão de oocistos, os esporozoítos são liberados no intestino e penetram nas células do epitélio intestinal, onde se diferenciam em taquizoítos, que se multiplicam rapidamente por endodiogenia, invadindo novas células e se disseminando por todos os tecidos do hospedeiro. Com o desenvolvimento da resposta imune do hospedeiro, ocorre conversão dos taquizoítos em bradizoítos, com a formação de cistos teciduais, com grande tropismo pelo cérebro, os quais persistem por toda a vida do hospedeiro. No caso de ingestão de cistos presentes em carne crua ou mal-cozida, há o rompimento desta estrutura durante a passagem pelo trato digestivo, com a consequente liberação de bradizoítos, os quais infectam o trato intestinal do novo hospedeiro, onde se diferenciam em taquizoítos, com distribuição idêntica à observada pela ingestão de oocistos (DUBEY, 2009a; HALONEN; WEISS, 2013; MONTOYA; LIESENFELD, 2004).

Além disso, pode ocorrer a infecção vertical, quando uma mãe se infecta durante a gravidez ou ocorre reativação de infecção latente durante a gestação. Neste caso, os taquizoítos cruzam a placenta e infectam o feto (DUBEY, 1991).



**Figura 2 – Ciclo reprodutivo de *Toxoplasma gondii*.** Ciclo reprodutivo de *T. gondii*, evidenciando as principais etapas da 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).

#### 1.4 Vias de transmissão: Como os seres humanos se infectam?

O ser humano pode se infectar com *T. gondii* de forma horizontal ou vertical. A transmissão horizontal ocorre pela ingestão de cistos contidos em carne crua ou mal-cozida (principalmente porcos e carneiros) ou pela ingestão de água e alimentos contaminados por oocistos. A transmissão vertical é caracterizada pela transmissão congênita, quando taquizoítos



atravessam a barreira placentária e infectam o feto (Figura 3). As variações observadas na soroprevalência e associadas a hábitos de higiene e de alimentação sugerem a grande importância da infecção oral na toxoplasmose (DUBEY, 1991; 2008).

Com relação à infecção por meio de cistos teciduais, a ingestão da carne de qualquer animal de sangue quente infectado pode ser fonte de infecção para o ser humano. O risco associado à infecção pela ingestão de cistos varia de acordo com a espécie de origem da carne contaminada (ovinos, caprinos, bovinos, suínos e aves, como as galinhas) (DUBEY, 1996). Dentre as carnes mais comumente utilizadas na alimentação humana, a carne de porco apresenta a maior probabilidade de levar à transmissão da toxoplasmose. Porém, não há atualmente nenhuma política nacional para identificação de *T. gondii* nestes animais, apesar dos avanços dos processos de industrialização e conservação da carne terem reduzido significativamente a transmissão por consumo de carne de porco nos últimos anos, já que os cistos são destruídos durante o processamento da carne. Porém, com o aumento do interesse por consumo de carne orgânica, proveniente de porcos criados de maneira livre, sem sistema de confinamento, vem representando um grande risco para infecção destes porcos e consequente transmissão para os seres humanos (DAWSON, 2005; DUBEY, 2009b). Já a transmissão por carne bovina é muito baixa, tendo em vista que estes hospedeiros são bastante resistentes à infecção por *T. gondii* (SCHLUTER et al., 2014). A transmissão por galinhas provenientes de criação intensiva é pouco provável, enquanto vários estudos demonstraram alta soroprevalência do parasito em galinhas oriundas de criações extensivas, com amplo contato com o ambiente. Assim como observado para a carne suína, a demanda por carnes orgânicas poderá contribuir para aumento da transmissão pelo consumo de carne de galinhas (DUBEY, 2010). Os carneiros e ovelhas são altamente suscetíveis à infecção por *T. gondii*, de modo que a taxa de transmissão pelo consumo das carnes destes animais é considerada como a maior dentre os animais normalmente utilizados na alimentação humana (BUXTON et al., 2007).

Em relação a importância da criação extensiva dos animais (com contato com o ambiente externo) e intensivo (sem contato, criados em confinamento), um estudo recente avaliou a prevalência de *T. gondii* destes dois tipos de criação em porcos, carneiro, ovelhas e galinhas. Os animais criados de maneira extensiva apresentaram uma alta prevalência quando comparado com animais criados de forma intensiva, com porcos e ovelhas apresentando as maiores prevalências. Esses dados demonstram que a criação de animais de forma extensiva

pode contribuir para a maior transmissão de *T. gondii*, representando uma grande preocupação em na contaminação alimentar (GUO et al., 2016).

Surtos de toxoplasmose provocados pelo consumo de carne contendo cistos de *T. gondii* normalmente envolvem poucos pacientes apresentando infecção aguda (2-20 pessoas) (ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012). Na Austrália, um surto de toxoplasmose aguda e congênita foi associada ao consumo de carne de canguru e de carneiro mal-passadas, que foram servidas em uma festa. O consumo de carne de carneiro mal-passada também foi associado como fonte de infecção aguda (TENTER et al., 2000). Esses dados mostram a importância desta via na transmissão do *T. gondii*. A maior dificuldade em se avaliar quantitativamente o risco da transmissão da toxoplasmose pelo consumo de carnes reside na falta de dados quanto ao número de cistos ingeridos necessários para desencadear uma infecção em humanos, quanto à distribuição e ao número de cistos presentes em diferentes músculos dos diversos hospedeiros, e quanto à infectividade dos cistos eventualmente presentes em produtos disponíveis comercialmente.

Gatos infectados liberam grande número de oocistos (até 10 milhões de oocistos em um único dia) no ambiente, iniciando a excreção cerca de duas semanas após a infecção. Uma vez liberados, os oocistos podem contaminar o ambiente e infectar humanos e outros hospedeiros intermediários. O consumo de vegetais ou frutas não lavados ou a ingestão de água contaminada não filtrada tem sido identificados como importantes fatores na transmissão da toxoplasmose. Além disso, a infecção pode ocorrer por inalação de oocistos durante a troca da caixa de areia para depósito dos dejetos de gatos domésticos, durante atividades de jardinagem ou em atividades recreativas de crianças em solos contaminados, como a areia de parques de diversão (DABRITZ; CONRAD, 2010; ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012). Estudos têm demonstrado que baratas e moscas podem carrear oocistos de *T. gondii* para alimentos desprotegidos (WALLACE, 1971;1972). Existe ainda a possibilidade de donos de cachorros se infectarem pelo contato com oocistos presentes nos pelos de cachorros que rolaram em fezes de gatos (FRENKEL; PARKER, 1996). Como observado, a infecção por oocisto não precisa necessariamente do contato direto com o gato, tendo em vista que os oocistos liberados nas fezes destes animais ainda não estão esporulados e não são infectivos.

A disseminação dos oocistos no ambiente é muito alta, o que pode justificar a alta incidência de toxoplasmose em indivíduos vegetarianos e em animais herbívoros (PROCTOR;

BANERJEE, 1994; RAWAL, 1959; ROGHMANN et al., 1999). Além disso, algumas evidências sugerem que em humanos a infecção por oocisto é clinicamente mais grave do que a infecção transmitida por cistos teciduais (DE MOURA et al., 2006; DUBEY, 2004). A disseminação de oocistos no ambiente está relacionada com hábitos de higiene e com a situação sócio-econômica da região. Em um estudo realizado no Brasil, em que a soroprevalência de *T. gondii* em indivíduos de classe baixa, média e alta foi avaliada, a percentagem de positividade foi de 84% nos indivíduos da classe sócio-econômica mais baixa, de 62% nos indivíduos de classe média e 23% nos indivíduos de classe alta (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003).

Oocistos de *T. gondii* também são responsáveis por vários surtos de toxoplasmose, nos quais geralmente há o acometimento de várias pessoas em uma determinada região, com água contaminada como o principal veículo de transmissão. Um surto de toxoplasmose em uma cidade do Canadá foi ligado à contaminação do reservatório de água local por oocistos. Entre 2.984 a 7.718 pessoas foram consideradas positivas para a infecção por *T. gondii*. Destas, 100 casos de toxoplasmose aguda foram relatados em pacientes com idade entre 6 e 83 anos de idade, dos quais, 37 mulheres foram identificadas pela rotina perinatal. Neste surto, 20 pacientes apresentaram toxoplasmose ocular (BOWIE et al., 1997; BURNETT et al., 1998). Um caso de surto de toxoplasmose ocorreu em Santa Isabel do Ivaí, Paraná, Brasil, envolvendo 426 indivíduos que apresentaram resultados positivos para anticorpos IgG e IgM específicos para *T. gondii*. Nesta ocasião, 155 indivíduos apresentaram toxoplasmose aguda e a fonte de infecção foi atribuída à contaminação de um reservatório de água por fezes de gato (DE MOURA et al., 2006). Diferentemente dos surtos provocados por consumo de carne, os surtos relacionados à via hídrica podem afetar centenas e até milhares de pessoas num curto período de tempo, com possibilidade de ocasionar infecção aguda e até mesmo infecção ocular, mesmo em indivíduos imunocompetentes (JONES; DUBEY, 2010).

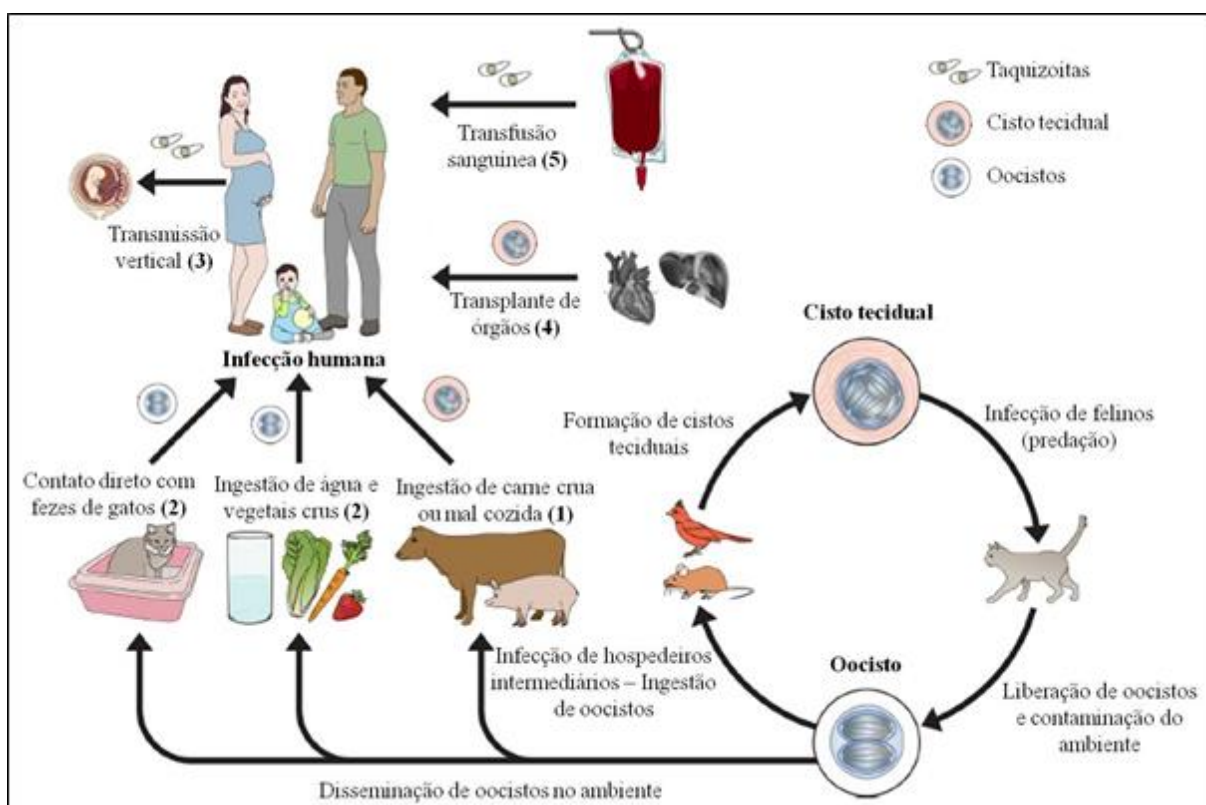
A maior parte dos indivíduos portadores de *T. gondii* não sabem como se infectaram e este fato pode contribuir para a falta de correlação de alguns estudos epidemiológicos com a causa da infecção. Estes dados seriam de grande valor para a melhoria dos estudos epidemiológicos e para a identificação da forma infecciosa do parasita responsável pela infecção, principalmente em casos de surto. Recentemente, dois trabalhos apresentaram contribuições significativas nesta questão. Em 2011, Hill e colaboradores utilizaram uma proteína recombinante de oocisto, TgERP, conseguindo resultados promissores na identificação

do estágio responsável pela infecção (HILL et al., 2011). Em 2015, Santana e colaboradores identificaram a proteína CCp5A com reação exclusiva com anticorpos presentes em soros de animais (galinhas, porcos e camundongos) e humanos infectados com oocistos/esporozoítos (SANTANA et al., 2015). Estes trabalhos podem indicar um caminho para a identificação das vias de infecção, com consequências positivas na prática clínica e em estudos epidemiológicos.

A transmissão vertical de *T. gondii* ocorre quando taquizoítos colonizam os tecidos placentários durante a fase aguda da infecção materna e atingem o feto, determinando a ocorrência da transmissão congênita exógena. Esta forma de transmissão leva à toxoplasmose congênita, considerada a mais importante manifestação da toxoplasmose na espécie humana, pois pode resultar em consequências graves para o feto. Durante a fase crônica da infecção, a gestante pode apresentar algum tipo de imunossupressão, como infecção pelo HIV ou uso de drogas imunossupressoras, o que pode desencadear a reativação do parasito, com conversão de bradizoítos em taquizoítos, com nova disseminação do parasito para a placenta e a potencial transmissão congênita endógena (KRAVETZ, 2013; ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012). Recentemente, foi verificado que gestantes previamente infectadas podem ser reinfectadas por cepas atípicas (FRANCO et al., 2015).

Outra forma de transmissão de *T. gondii* é por meio do transplante de órgãos sólidos, nos quais o parasito pode ser transmitido para um receptor imunocomprometido por meio de um órgão infectado com cistos provenientes de uma infecção crônica adquirida pelo doador em um passado distante. Certos órgãos apresentam maior probabilidade de apresentar cistos do que outros, o que pode ser explicado pelo maior tropismo de *T. gondii* para músculos, cérebro e olhos. O coração é um dos órgãos sólidos com maior probabilidade de transmissão em casos de transplantes (RYNING et al., 1979).

Há ainda o risco de transmissão por transfusão sanguínea, caso o doador tenha adquirido a infecção recentemente e apresente parasitemia no momento da punção sanguínea. Adicionalmente, existe risco de infecção em transplante de medula óssea, caso o doador apresente parasitemia na época da coleta das células de medula (GUY; JOYNSON, 1995). Finalmente, outra forma de infecção são os acidentes laboratoriais, com inoculação das formas parasitárias por material perfurocortante contaminado (HERWALDT, 2001).



**Figura 3 – Vias de transmissão de *Toxoplasma gondii*.** Formas de infecção por *T. gondii*, evidenciando as principais vias em 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).

### 1.5 Prevalência da toxoplasmose em humanos

Desde o desenvolvimento do teste sorológico conhecido como Teste do corante de Sabin-Feldman para o diagnóstico da toxoplasmose (SABIN; FELDMAN, 1948), variados estudos soroepidemiológicos foram conduzidos para se investigar a soroprevalência desta infecção nas diversas populações humanas. Estimativas de prevalência baseadas nestes inquéritos sorológicos indicam que cerca de 25 a 30% da população humana mundial seja infectada por *T. gondii* (ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012). Baixas prevalências (10-30%) são observadas em países da América do Norte, no Sudeste Asiático, no norte da Europa e nos países africanos da região do Deserto do Saara. Prevalência moderada (30-40%) 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 (podendo chegar a 80%) (DUBEY, 1994; HALONEN; WEISS, 2013; ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012).

As diferenças nas taxas de soroprevalência de *T. gondii* nas diferentes regiões são devido a diversos fatores, como as condições climáticas de cada região, que 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; os hábitos alimentares, o nível socioeconômico, os hábitos sociais e culturais, a qualidade da água destinada ao consumo humano e as condições de saneamento básico (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; TENTER, 2009).

Diversos estudos já foram realizados com o intuito de avaliar a soroprevalência da infecção no Brasil. Um destes estudos, avaliando recrutas militares (18 a 21 anos) do Brasil e dos Estados Unidos pela mesma metodologia, detectou anticorpos anti-*T. gondii* em 56% dos recrutas brasileiros e em apenas 13% dos recrutas americanos (LAMB; FELDMAN, 1968). Soroprevalências muito altas são encontradas em gestantes brasileiras (36-92%), revelando uma das maiores soroprevalências do mundo neste grupo populacional (DUBEY et al., 2012). Um estudo bem interessante avaliou a presença de anticorpos anti-*T. gondii* em crianças de 6 a 8 anos de idade no Rio de Janeiro, observando-se uma soroprevalência de 60% neste grupo, cuja transmissão foi apontada como relacionada à ingestão de oocistos (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2001; HILL et al., 2005). Estes dados indicam que a prevalência da infecção no Brasil é muito elevada, com grande parte da população já exposta ao parasito. Além disso, a presença de alto nível de contaminação ambiental por oocistos propicia um ambiente adequado para a ocorrência de surtos de toxoplasmose em larga escala (DUBEY et al., 2012).

A exemplo de países desenvolvidos, a soroprevalência poderia diminuir utilizando medidas como: melhoria nas condições socioeconômicas e nas medidas higiênicas, mudanças nos sistemas de criação de animais para produção de carne e alimentação de gatos com comida esterilizada (DUBEY, 2008; ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012).

## 1.6 Invasão celular e ciclo lítico

O processo de invasão celular por *T. gondii* é um processo ativo, no qual o parasito evita a resposta imune humoral do hospedeiro, penetrando nas células nucleadas, bem como cria um ambiente adequado para a captação de nutrientes e multiplicação celular. Com o intuito de obter sucesso na penetração, o parasito utiliza de proteínas de superfície e de suas organelas situadas no complexo apical (micronemas, roptrias e grânulos densos) (BUXTON; MCALLISTER; DUBEY, 2002; WALKER et al., 2014). Devido a complexidade da organização interna de *T. gondii*, vários fatores relacionados ao tráfego de proteínas são necessários para que as diversas proteínas sejam enviadas para as organelas. *T. gondii* apresenta somente um grupo destes fatores, de modo que a maioria destas moléculas homólogas encontradas em grande parte dos eucariotos foi perdida neste filo (JIMENES-RUIZ et al., 2016).

O primeiro contato com uma potencial nova célula hospedeira ocorre pela superfície celular. O parasito é recoberto de proteínas de superfície ancoradas a glicosilfosfatidilinositol (GPI), conhecidas como SAGs (HE et al., 2002). A estrutura de SAG1 reconhece proteoglicanas sulfatadas nas células hospedeiras. Este modelo é corroborado pela inibição da adesão do parasito às células quando existe uma quantidade reduzida de SAG1 em sua superfície (BISHOP; CRAWFORD; ESKO, 2005).

As proteínas de micronemas são moléculas adesivas, também chamadas de MICs, que medeiam o contato firme do parasito com células hospedeiras e, por consequência, favorecem sua entrada na célula. Estas organelas são as primeiras a liberarem 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. Dentre estas proteínas secretadas pelos micronemas, destacam-se as proteínas da família MIC2 (BLADER et al., 2015; SHARMA; CHITNIS, 2013).

As proteínas de roptrias (ROPs), com auxílio da proteína de micronema AMA1 (MITAL et al., 2005) e também da MIC8 (KESSLER et al., 2008), formam a junção móvel durante a invasão, resultando na entrada do parasito e na formação do vacúolo parasitóforo, que permite a eficiente absorção de nutrientes e a evasão da resposta imune. Além das proteínas ROP tradicionais, alguns estudos identificaram as proteínas da região de "pescoço" das roptrias

(RONs), como também envolvidas em diferentes aspectos da formação da junção móvel. Adicionalmente, as ROPs também são injetadas nas células do hospedeiro, podendo levar a modificações da expressão de genes do hospedeiro e das vias de sinalização (BLADER et al., 2015; YOSHIDA; TYLER; LLEWELLYN, 2011).

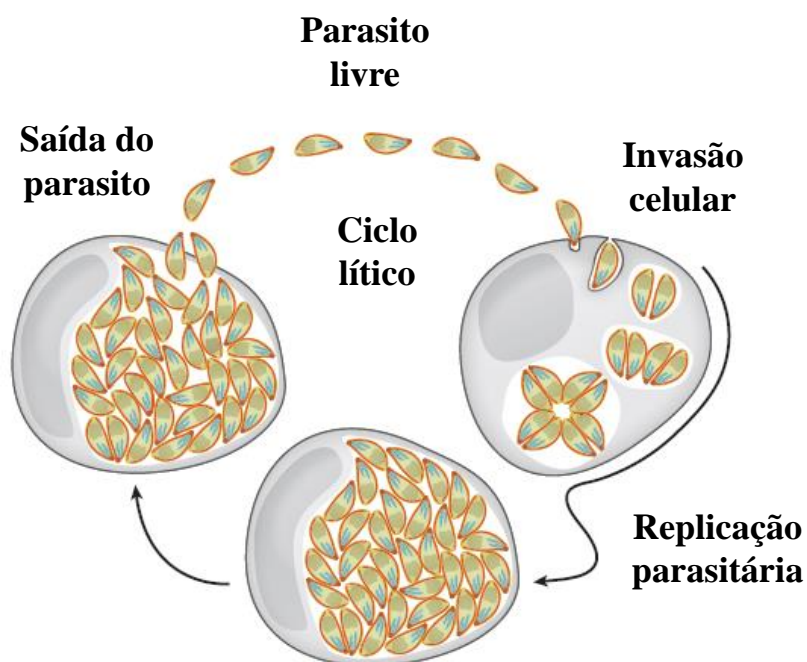
Após esta forte adesão com a célula hospedeira, o parasito inicia a invasão ativa pelo processo conhecido como *gliding*, um organizado sistema de motilidade promovido por interações entre actina e miosina e rearranjos dinâmicos do citoesqueleto do parasito. O processo de movimentação por *gliding* se 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 (SKILLMAN et al., 2011). O complexo de membrana interna dos parasitos membros do filo apicomplexa apresenta grande importância no processo de *gliding*, com papéis na motilidade e invasão celular. As proteínas GAP40 e GAP50 apresentam um papel central na biogênese do complexo de membrana interna (HARDING et al., 2016)

Durante a formação e desenvolvimento do vacúolo parasitóforo, ocorre interação com as organelas do hospedeiro, como mitocôndrias e retículo endoplasmático. Um estudo recente identificou a proteína secretada MYR1 encontrada dentro do vacúolo parasitóforo e na membrana do vacúolo parasitóforo que é necessária para que os taquizoítos modulem várias vias importantes do hospedeiro, incluindo aquelas mediadas pelas proteínas do grânulo denso (GRA16 e GRA24) (FRANCO et al., 2016). Além disso, o parasito modula as vias de apoptose e aspectos relacionados ao transporte vesicular relacionado à aquisição de lipídeos (BLADER et al., 2015). Na sequência final, proteínas dos grânulos densos (GRAs) são liberadas, levando à formação de túbulos que favorecem a nutrição do vacúolo. Algumas GRAs são liberadas no hospedeiro, mais notavelmente a GRA7 (FISCHER et al., 1998).

Dentro do vacúolo parasitóforo os taquizoítos se replicam em um ciclo de 6 a 9 horas, levando à formação de duas células filhas na célula mãe. Estas formas são liberadas da célula hospedeira assim que aproximadamente 64 a 128 parasitos tenham se acumulado no vacúolo parasitóforo. Esta liberação é um processo ativo dependente do aumento de cálcio intracelular, em que o parasito 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. Os novos taquizoítos livres



podem infectar novas células, reiniciando o ciclo lítico (BLADER et al., 2015; CARRUTHERS; SIBLEY, 1997; LOURIDO et al., 2010) (Figura 4).



**Figura 4 – Ciclo lítico de *Toxoplasma gondii*.** Ciclo lítico de *T. gondii*, evidenciando as principais etapas de invasão celular, replicação parasitária e liberação do parasito.

**Fonte:** Adaptado a partir de Blader et al., 2015.

### 1.7 Resposta imune celular

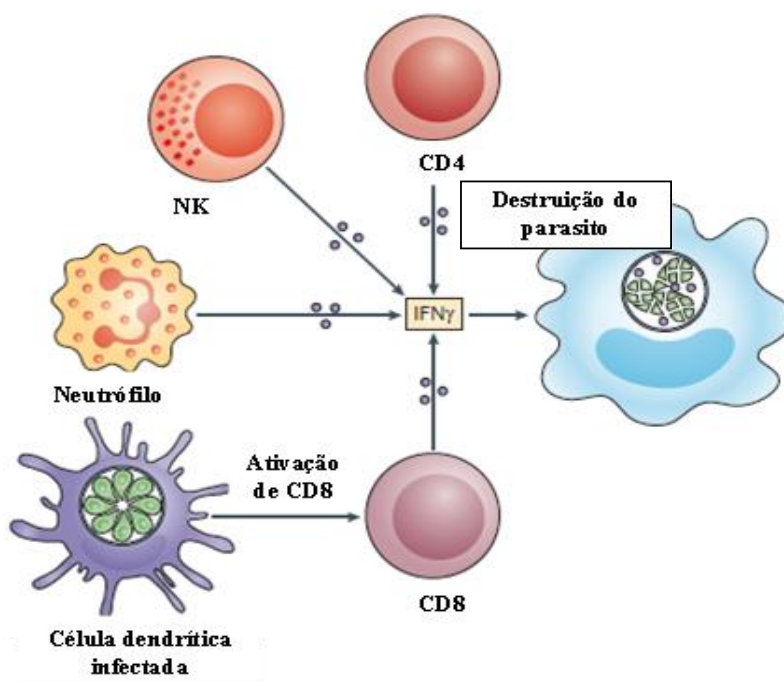
A resposta imune contra *T. gondii* é primariamente mediada por células, tendo em vista que se trata de um microrganismo intracelular obrigatório. A resposta ideal é uma resposta dependente de linfócitos do perfil Th1, com secreção de interleucina 12 (IL-12) e interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (GAZZINELLI; HIENY; et al., 1993). Células dendríticas, macrófagos e neutrófilos, quando infectadas pelo parasito, produzem IL-12, que estimula a produção de IFN- $\gamma$  por células NK e linfócitos (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>). IFN- $\gamma$  é a principal citocina no controle da toxoplasmose aguda e crônica (Figura 5). A resposta imune contra *T. gondii* necessita das vias inata e adaptativa, levando a interações coordenadas entre o parasito e os enterócitos, monócitos, células dendríticas, macrófagos, células NK e neutrófilos do hospedeiro.

A citocina IFN-  $\gamma$  ativa mecanismos efetores anti-*T. gondii* nas células infectadas (hematopoiéticas ou não), sendo essencial para a defesa contra o parasito. Esta citocina ativa macrófagos, potencializando seus mecanismos de resposta, o que leva à inibição da replicação do parasita no interior do vacúolo parasitóforo e à destruição de parasitas intracelulares (DENKERS et al., 2012). A indução da expressão da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) por IFN- $\gamma$  leva à degradação do aminoácido triptofano, levando à redução da sua disponibilidade para parasitos em multiplicação. Como *T. gondii* é um parasita auxotrófico para este aminoácido, sua deficiência nas células inibe a multiplicação parasitária. Ocorre também a indução da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) pelas células infectadas, atuando na produção de reativos intermediários de nitrogênio (RNI), principalmente óxido nítrico (NO), a partir do aminoácido L-arginina. Os efeitos microbicidas dos RNIs são devidos à sua combinação com uma série de proteínas do parasita, modificando sua função e levando à inibição de importantes enzimas metabólicas (JUN et al., 1993; MILLER et al., 2009; REMINGTON; MERIGAN, 1968). IFN- $\gamma$  também atua na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), 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). Além disso, macrófagos ativados por IFN- $\gamma$  secretam altos níveis de TNF- $\alpha$ , que também estimula outras atividades microbicidas, de maneira sinérgica com IFN- $\gamma$  em diversos mecanismos de controle do parasito (ALIBERTI, 2005).

Células T CD8<sup>+</sup> ativadas por IL-12 também contribuem significativamente para o controle da infecção aguda por meio da secreção de IFN- $\gamma$ . Além disso, estas células, em função de sua atividade citotóxica, destroem células infectadas, eliminando parasitas ou liberando taquizoítos 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 (GAZZINELLI; DENKERS; SHER, 1993; VILLARINO; SCHMIDT, 2013)

Em indivíduos imunossuprimidos, como os pacientes HIV positivos, ocorre queda dos níveis de células T CD4<sup>+</sup> e, por conseguinte, dos níveis de IFN- $\gamma$ , com reativação da replicação do parasito presente no cérebro de indivíduos infectados cronicamente. Considerando o indivíduo imunocompetente, a resposta imune dependente de IFN- $\gamma$  é responsável por controlar a infecção aguda e estimular a diferenciação dos taquizoítos em bradizoítos no interior de cistos

teciduais, principalmente no cérebro e nos músculos (PIFER; YAROVINSKY, 2011; ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012).



**Figura 5 – Produção de IFN- $\gamma$ .** Figura esquemática demonstrando as principais células envolvidas na produção de IFN- $\gamma$ , principal citocina envolvida na resposta imune celular ao parasito.  
**Fonte:** Adaptado a partir de Yarovsky (2014).

## 1.8 Resposta imune humoral

A resposta protetora predominante contra *T. gondii* é mediada por células, com dependência de células Th1, mas a resposta imune humoral também participa da eliminação do parasito. A imunidade humoral induzida por *T. gondii* é efetiva contra as formas extracelulares do parasita, como taquizoítos logo após o egresso de uma célula infectada após um ciclo replicativo e antes da invasão ativa de outra célula; bradizoítos eventualmente liberados após o rompimento de um cisto tecidual; e esporozoítos após liberação dos oocistos (CORREA et al., 2007; MONTROYA, 2002).

Anticorpos específicos para *T. gondii* podem ser neutralizantes, impedindo que o parasito se ligue e invada a célula hospedeira. Além disso, os anticorpos podem opsonizar os parasitos, com consequente aumento de fagocitose. Os anticorpos ligados à superfície do parasito podem ativar a via clássica do sistema complemento, o que pode culminar com a lise do parasito. Os anticorpos das classes IgM, IgA, IgE e IgG (e suas subclasses) já foram descritos como moléculas envolvidas na resposta contra *T. gondii* (DUPONT; CHRISTIAN; HUNTER, 2012; MATOWICKA-KARNA; KEMONA, 2014; SANTANA, et al., 2012).

Após 3 a 10 dias de infecção, começam a aparecer níveis detectáveis do anticorpo pentamérico IgM no soro dos indivíduos infectados, com maiores concentrações séricas após aproximadamente 1 mês de infecção (CORREA et al., 2007). 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, com diminuição até níveis indetectáveis por volta de 8 meses após a infecção. A produção de IgM é regulada positivamente pela presença de IL-2, como consequência da estimulação das células T e B (CORREA et al., 2007; ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012). O anticorpo IgM foi inicialmente caracterizado como uma molécula presente exclusivamente na fase aguda da infecção. É de conhecimento geral que esta classe de imunoglobulinas pode ser encontrada por meses ou até anos após a infecção (“arraste de IgM”), especialmente em gestantes ou pacientes que adquiriram a toxoplasmose e apresentaram linfadenopatia. Esse fenômeno acontece com uma certa frequência e pode ser resultado de micro-reativações de cistos dormentes, podendo dificultar o diagnóstico da toxoplasmose aguda nos pacientes (REMYINGTON; THULLIEZ; MONTOYA, 2004).

O anticorpo IgA é considerado um anticorpo de mucosa, tendo em vista sua compartimentalização nestes sítios. Entretanto, pode ser encontrado em outros sítios, como o soro. Durante a fase digestiva da infecção por *T. gondii*, o anticorpo IgA surge precocemente, com meia vida curta, sendo um anticorpo típico de fase aguda (REMYINGTON et al., 2004). 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. Assim como visto com IgM, em alguns casos o anticorpo IgA pode persistir por até 9 meses, dificultando o diagnóstico (MONTOYA; LIESENFELD, 2004; ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012). O grau de duração de IgA se mostra extremamente variável em adultos e recém-nascidos infectados congenitamente. A produção de anticorpos IgA é favorecida por IL-

10 e TGF- $\beta$ . A ausência de IgA e IgM com presença de IgG normalmente indica uma fase crônica. Apesar de ser secretada no colostro e ser transferida ao lactante por meio do aleitamento materno, IgA não atravessa a barreira placentária (CORREA et al., 2007; HEGAB; AL-MUTAWA, 2003).

Os anticorpos IgE são geralmente associados com respostas alérgicas e contra helmintos. Na infecção por *T. gondii*, estes anticorpos são detectados durante a fase aguda, embora sejam induzidos por IL-4 (CORREA et al., 2007). Um estudo detectou anticorpos IgE em 86% de indivíduos adultos que apresentaram soroconversão e tinham menos de 4 meses de infecção, embora estes anticorpos tenham apresentado persistência em indivíduos com toxoplasmose grave e linfadenopatia (PINON et al., 1990). Os anticorpos IgE são produzidos por alguns recém-nascidos infectados e são marcadores de uma má adesão ao tratamento da toxoplasmose congênita. Tendo em vista que a resposta necessária ao combate ao parasito difere dos estímulos para produção de IgE, a presença desta imunoglobulina é infrequente (CORREA et al., 2007). Um problema na detecção de IgE é que o sinal das reações pode ser muito variável, de modo que a detecção deste anticorpo não é realizada na rotina laboratorial (MATOWICKA-KARNA; KEMONA, 2014).

A síntese de IgG geralmente começa 1 a 3 semanas após o aparecimento de anticorpos IgM, atingindo a concentração máxima em 4 a 6 meses. Depois, há uma ligeira queda nos títulos destes anticorpos, embora persistam como títulos residuais durante toda a vida do paciente. Este anticorpo representa a principal imunoglobulina da resposta humoral contra *T. gondii* e pode ser transferido através da placenta, protegendo o feto. A produção de IgG é induzida por IFN- $\gamma$  e é considerado um marcador de fase crônica, na ausência de IgM e IgA. Este anticorpo é o mais utilizado em testes diagnósticos como marcador de exposição a *T. gondii*. A presença persistente de IgG durante toda a vida do paciente dificulta a diferenciação de uma infecção aguda de uma infecção crônica pelo parasito (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003; ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012).

Em relação às subclasses de IgG, IgG1 e IgG3 são induzidas por IFN- $\gamma$  e aumentadas por IL-10 e TGF- $\beta$ ; IgG2 é estimulada por IL-2 e tem sua produção aumentada por IL-6; e IgG4 é induzida por IL-4 e IL-13 (CORREA et al., 2007). Alguns estudos indicam que IgG1 é produzida precocemente durante a infecção e corresponde à subclasse predominante na resposta a *T. gondii* (BELA et al., 2008; EE; SINGH; YAP, 1989; HUSKINSON et al., 1989). Por

outro lado, em outro estudo foi verificado que a detecção de IgG3 contra a proteína SAG2A de *T. gondii* apresentava um comportamento mais precoce quando comparado com IgG1 (SANTANA, et al., 2012)

Os anticorpos IgM, IgA e IgG podem bloquear a entrada do parasito nas células a nível sistêmico e de mucosa (CHARDES et al., 1990; MACK; MCLEOD, 1992; MINEO et al., 1993). Anticorpos IgM, bem como IgG1 e IgG3 ativam a via clássica do complemento e promovem a inflamação. Além disso, IgA pode ativar a via alternativa do complemento (DARCY et al., 1988; KANEKO et al., 2004). As subclasses IgG1 e IgG3 estimulam macrófagos e neutrófilos pela ligação ao receptor de IgG, podendo levar à citotoxicidade dependente de anticorpos (ADCC) (FADUL; CHANNON; KASPER, 1995; YONETO et al., 2001).

## 1.9 Manifestações clínicas

A infecção por *T. gondii* pode levar a variados achados clínicos, dependendo principalmente do estado imune do indivíduo. As principais formas características da infecção são: infecção adquirida em indivíduo imunocompetente, toxoplasmose congênita, toxoplasmose ocular (adquirida ou congênita) e toxoplasmose cerebral (infecções reativadas em pacientes imunossuprimidos) (ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012).

A toxoplasmose aguda adquirida em indivíduos imunocompetentes é assintomática em 80% dos casos (LUFT; REMINGTON, 1992). Nos pacientes que apresentam doença clínica, o sinal mais frequente é a linfadenopatia na região do pescoço, embora também possa envolver os linfonodos axilares, inguinais e mesentéricos. A linfadenopatia pode também estar acompanhada por febre, dor de garganta, mal-estar, exantema e hepato- esplenomegalia. Após 2 a 3 semanas de infecção, em função da resposta imune efetiva do hospedeiro, os taquizoítos desaparecem da circulação e se diferenciam em bradizoítos em cistos teciduais. Na fase crônica, os bradizoítos encontram-se encistados, persistindo por longos períodos. A infecção aguda em geral protege o indivíduo de uma reinfecção e a infecção crônica é usualmente assintomática. Em alguns casos, pode ocorrer doença grave, como infecção ocular, mesmo em indivíduos imunocompetentes. Geralmente este fenômeno está associado à presença de cepas mais

patogênicas e é frequente em surtos de toxoplasmose por via hídrica (HALONEN; WEISS, 2013; MASUR et al., 1978; MONTOYA; LIESENFELD, 2004).

A infecção congênita ocorre em decorrência de uma infecção primária durante a gestação, com passagem transplacentária de taquizoítos para o feto (MONTOYA; REMINGTON, 2008). A transmissão uterina varia de acordo com o período de gestação, sendo baixa quando a infecção ocorre no primeiro trimestre (5-25%) e aumenta até alcançar 90% de transmissão quando a infecção ocorre no último trimestre de gestação (MCLEOD et al., 2009). O acometimento fetal é mais grave quando a toxoplasmose é transmitida no primeiro trimestre de gestação, podendo levar a aborto ou danos neurológicos graves no feto. Por outro lado, a infecção no terceiro trimestre de gravidez geralmente é assintomática, com possível desenvolvimento de coriorretinite em um período tardio após o nascimento (MONTOYA; LIESENFELD, 2004). A infecção congênita ocorre usualmente em mães soronegativas que apresentaram infecção aguda durante a gravidez. Uma das exceções é nos casos em que a gestante sofre algum tipo de imunossupressão, levando à reativação de uma infecção latente (MONTOYA; REMINGTON, 2008; ROSSO et al., 2008). Outra exceção é a reinfecção de gestantes com cepas atípicas, como as encontradas no Brasil (FRANCO et al., 2015). Fetos infectados congenitamente podem apresentar a tríade clássica da toxoplasmose congênita (coriorretinite, calcificações intracranianas e hidrocefalia), além de outros sintomas, que podem incluir febre, hepato- esplenomegalia, anemia e icterícia. Adicionalmente, podem ocorrer sequelas neurológicas, tais como retardo mental e epilepsia, além de cegueira na infância ou em períodos mais tardios. Nenhum dos sinais descritos anteriormente em recém-nascidos com doença congênita é patognomônico para toxoplasmose, uma vez que pode ocorrer com outras infecções congênitas, como citomegalovírus, vírus herpes simples, rubéola e sífilis (CARLIER et al., 2012; MONTOYA; LIESENFELD, 2004).

A toxoplasmose ocular pode ser adquirida congenitamente, por infecção pós-natal ou por reativação da doença crônica em indivíduos imunossuprimidos (JONES,; ALEXANDER; ROBERTS, 2006). A doença se desenvolve com coriorretinite, com episódios recorrentes, e posterior cura, podendo ocorrer anos após a infecção aguda. Algumas manifestações da toxoplasmose ocular são visão borrada, fotofobia, perda de visão central e cegueira (MONTOYA; REMINGTON, 1996; VADALA, 1951). O parasito infecta a retina, porém a coroide e a câmara anterior do olho também podem ser envolvidas. Esta infecção é

caracterizada por retinopatia necrotizante causada pela ativação de cistos dormentes localizados dentro da retina ou no nervo óptico (COMMODARO et al., 2009). Coriorretinite toxoplásmica é uma manifestação muito comum 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). Indivíduos imunocomprometidos apresentam a forma mais grave da toxoplasmose ocular, com necrose multifocal da retina. Em alguns casos de surto de toxoplasmose por via hídrica, foi relatado um alto índice de toxoplasmose ocular, mesmo em indivíduos imunocompetentes (COMMODARO et al., 2009; MASUR et al., 1978; MCALLISTER, 1964).

A toxoplasmose cerebral é caracterizada por encefalite cerebral ocasionada pela reativação de uma infecção prévia em pessoas com imunossupressão, como portadores do HIV ou pacientes em terapia imunossupressora (LUFT et al., 1984; LUFT; REMINGTON, 1992). Em pacientes HIV positivos, a ocorrência de comprometimento neurológico associado à toxoplasmose está relacionada à contagem de células T CD4<sup>+</sup>, com risco muito elevado quando a contagem destas células é reduzida a 100 células/ $\mu$ L de sangue. A encefalite é muito comum nesses pacientes e pode desencadear vários sintomas (ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012). As lesões podem ser uni ou multifocais e as manifestações clínicas dependem da localização e do número de lesões. Algumas manifestações clínicas observadas são: dor de cabeça, febre, convulsões, confusão mental, ataxia, letargia e alterações visuais. Além disso, podem ser observadas disfunções cognitivas, aumento da pressão intracraniana e movimentos involuntários (HALONEN; WEISS, 2013). Com a implementação da terapia antirretroviral (HAART), a incidência de toxoplasmose cerebral diminuiu consideravelmente, embora esta forma da doença ainda seja uma causa importante de morbidade e mortalidade em pacientes com HIV (HALONEN; WEISS, 2013; RUSKIN; REMINGTON, 1976; SAADATNIA; GOLKAR, 2012).



### 1.10 Prevenção e tratamento

As drogas tipicamente utilizadas no tratamento da toxoplasmose incluem pirimetamina em combinação com sulfadiazina. Essas drogas, quando administradas durante a fase aguda da infecção, apresentam efeito significativo sobre os parasitos em multiplicação. Apesar de apresentar boa atividade nesta fase, estes fármacos não conseguem erradicar o parasito e apresentam pouco efeito em infecções subclínicas. Geralmente a combinação com ácido folínico é utilizada para prevenir a supressão da medula óssea causada pela pirimetamina. A clindamicina é uma droga que pode ser utilizada quando a sulfadiazina não pode ser tolerada pelo paciente. Atovaquona é uma droga utilizada em pacientes que não conseguem tolerar sulfadiazina e clindamicina. Já a espiramicina é recomendada para o tratamento de gestantes, pois este fármaco atinge altas concentrações na placenta, embora não apresente boa penetração no sistema nervoso central (HALONEN; WEISS, 2013; MONTOYA; LIESENFELD, 2004; MONTOYA; REMINGTON, 2008; ROBERT-GANGNEUX, 2014).

O tratamento profilático em indivíduos com doença crônica é indicado somente em pacientes de alto risco, pois nenhuma dessas drogas é capaz de destruir bradizoítos presentes no interior de cistos teciduais. Em pacientes com AIDS e infectados por *T. gondii*, a combinação de trimetoprim/sulfametoxazol tem demonstrado bons resultados em prevenir a toxoplasmose cerebral (FUNG; KIRSCHENBAUM, 1996; ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012).

A prevenção da toxoplasmose em seres humanos pode ser feita com várias medidas básicas com o objetivo de reduzir a incidência desta doença. A toxoplasmose adquirida pela ingestão de cistos pode ser prevenida pela lavagem das mãos de pessoas que manipulam alimentos, lavagem de facas e tábuas de cortar carne e outros materiais que possam contaminar alimentos. Além disso, os cistos teciduais podem ser destruídos por exposição a temperaturas muito elevadas, como o aquecimento a temperaturas acima de 67°C, ou muito baixas, como o congelamento a temperaturas inferiores a -13°C. A sobrevivência dos cistos teciduais em baixas temperaturas depende da duração do congelamento. O cozimento da carne por um tempo prolongado pode ser necessário para matar todos os cistos teciduais presentes em todas as partes da carne. Um problema existente na utilização de micro-ondas para cozimento ou aquecimento das carnes é que este método geralmente não é suficiente para destruir todos os cistos presentes

no alimento (HALONEN; WEISS, 2013; JONES, J. L.; DUBEY, 2012; OPSTEEGH et al., 2015).

Com relação à prevenção da transmissão por oocistos, deve-se evitar contato direto com o solo contaminado, usando-se luvas durante a jardinagem, por exemplo. Donos de gatos e que pertencem a grupos de risco, como gestantes não imunes e pessoas imunocomprometidas, devem ter seus gatos examinados quanto à infecção por *T. gondii*. A caixa de areia dos dejetos dos gatos deve ser esvaziada todos os dias, evitando que gestantes façam essa tarefa. Deve-se também evitar que crianças brinquem no solo, pelo perigo de contaminação por oocistos (especialmente no Brasil). Corroborando a importância da contaminação do solo, a geofagia foi associada com um surto de toxoplasmose aguda envolvendo 6 crianças em idade pré-escolar que brincavam no quintal da casa da avó de uma das crianças, no qual a presença de gatos era comum (STAGNO et al., 1980). Vegetais e alimentos devem ser lavados cuidadosamente pelo perigo de contaminação por oocistos. O sistema de fornecimento de água deve ser adequado, de modo que ocorra uma vigilância da água que chega às casas e reservatórios (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003; OPSTEEGH et al., 2015; SCHLUTER et al., 2014; TORREY; YOLKEN, 2013).

A prevenção da toxoplasmose depende de boas práticas de higiene e mudanças de alguns hábitos perigosos para o desenvolvimento da infecção. Em alguns locais, como a França, há o costume de comer carne mal-cozida, fato que pode aumentar o risco de infecção (HILL, D.; DUBEY, 2002; MONTOYA; LIESENFELD, 2004). Uma medida que poderia ser importante na prevenção da toxoplasmose seria o desenvolvimento de uma vacina eficaz (OPSTEEGH et al., 2015). Existem alguns trabalhos que apresentam resultados promissores, porém ainda são necessárias mais avaliações da viabilidade destas preparações como medidas preventivas (BOUT et al., 2002; CHEN et al., 2014; MIN et al., 2012).

Por fim, o conhecimento prévio da via de infecção (ingestão de oocisto ou de cisto tecidual) mais prevalente em determinada população ou área geográfica pode ajudar a implementação as medidas preventivas mais adequadas para o controle da infecção, com consequente realização de campanhas de conscientização e educação da população.

### 1.11 Diagnóstico

A toxoplasmose pode se manifestar de variadas formas, dependendo do estado imunológico do indivíduo, do inóculo de parasito, da fase de infecção (aguda ou crônica) e da cepa do parasito responsável pela infecção. Além disso, alguns trabalhos têm associado a via de infecção (ingestão de oocistos ou de cistos teciduais) a sintomas mais graves ou mais amenos da infecção. Normalmente, os sintomas da toxoplasmose são inespecíficos, de modo que o diagnóstico baseado somente na avaliação clínica do paciente é complicado. Dessa maneira, no decorrer dos anos, várias técnicas laboratoriais foram desenvolvidas para facilitar o diagnóstico diferencial da toxoplasmose (LIU et al., 2015; MONTOYA, 2002; MONTOYA; LIESENFELD, 2004).

Existem técnicas de detecção direta do parasito, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), com amplificação de material genético do parasito; a demonstração histológica do parasito ou dos seus antígenos pela técnica de imunohistoquímica; o isolamento do parasito a partir de amostras biológicas com a inoculação em animais de laboratório ou em cultura de células. As técnicas de detecção direta não são utilizadas rotineiramente no diagnóstico em indivíduos imunocompetentes, embora apresentem papel chave no diagnóstico de indivíduos imunocomprometidos (MONTOYA; LIESENFELD, 2004; REMINGTON et al., 2004; ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012).

O diagnóstico da toxoplasmose em indivíduos imunocompetentes é realizado rotineiramente utilizando técnicas de detecção indireta. Essas técnicas se baseiam na detecção de vários isótipos de anticorpos específicos contra o parasito. Variados testes diagnósticos são utilizados para detectar diferentes anticorpos, que possuem padrões únicos de comportamento após a infecção (MONTOYA; LIESENFELD, 2004; REMINGTON et al., 2004). Geralmente, o diagnóstico é feito por uma combinação de técnicas sorológicas, com o intuito de identificar se o indivíduo apresenta a fase aguda ou a fase crônica da infecção. A grande importância do diagnóstico sorológico da toxoplasmose encontra-se na toxoplasmose congênita, em que um diagnóstico rápido e efetivo pode evitar medidas desnecessárias e invasivas (como amniocentese) (MONTOYA; REMINGTON, 2008).

Uma das primeiras técnicas a ser utilizada em larga escala para o diagnóstico da infecção por *T. gondii* foi o teste do corante de Sabin-Feldman. Este método avalia a lise de taquizoítos vivos na presença de complemento e anticorpo específico presente na amostra do paciente.

Quando lisado, o parasito não se cora com o corante azul de metileno, indicando que a amostra do indivíduo testado apresenta anticorpos anti-*T. gondii* (SABIN; FELDMAN, 1948). Desde a implementação deste teste como referência, muitas outras técnicas foram desenvolvidas, visando o melhor diagnóstico da infecção. Entre elas, as técnicas mais utilizadas são: o teste de aglutinação (muito utilizadas em inquéritos epidemiológicos para animais e humanos, tendo a vantagem de não utilizar anticorpos secundários); teste de imunofluorescência indireta (utilizado no diagnóstico da toxoplasmose em animais e humanos, em que taquizoítos fixados e imobilizados em lâminas de vidro para microscopia apresentam fluorescência periférica e brilhante após incubação com amostras de soro contendo anticorpos anti-*T. gondii* e anticorpos secundários marcados com fluorocromos); reações de *Immunoblotting* (utiliza de um passo de separação eletroforética de antígenos do parasito e transferência para membrana de nitrocelulose ou PVDF, com posterior reação com soros e anticorpos secundários); técnicas de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), que são as técnicas mais difundidas na rotina laboratorial e se baseiam na detecção de anticorpo específico presente na amostra testada, a partir de sua ligação a antígeno parasitário imobilizado nos poços das placas de reação, a qual é evidenciada pela adição de um conjugado imunoenzimático, o substrato enzimático e um cromógeno (CAMARGO et al., 1978; LIU et al., 2015; MONTOYA; LIESENFELD, 2004; ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012).

As imunoglobulinas detectadas na rotina laboratorial são IgG, IgM, IgA e, em menor escala, IgE. Os anticorpos IgG são os mais usualmente detectados, indicando exposição a *T. gondii*. Nos testes utilizados, IgG usualmente é detectada com 1 a 2 semanas de infecção, persistindo durante toda a vida do indivíduo infectado (MONTOYA, 2002; ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012). Este fato inviabiliza a utilização desta classe de anticorpos como marcador de infecção primária. Em recém-nascidos, IgG específica pode ser detectada sem que este apresente doença congênita, tendo em vista que esses anticorpos são oriundos da mãe por passagem transplacentária (CORREA et al., 2007; HALONEN; WEISS, 2013).

Uma opção interessante para detectar infecção aguda utilizando IgG é a técnica de avidéz de IgG, que avalia o somatório das forças de afinidade do anticorpo IgG com os antígenos parasitários (avidéz). Nesta técnica, são utilizados agentes desnaturantes, como uréia, para romper a ligação de anticorpos de menor avidéz com os antígenos parasitários presentes na placa de reação. Como os anticorpos de fase aguda apresentam menor avidéz, há uma

diferença maior entre a quantidade de anticorpos detectados na ausência e na presença do agente desnaturante, em função do rompimento de maior quantidade de interações entre anticorpos e antígenos por este agente. Já os anticorpos de fase crônica apresentam maior avidez, com menor rompimento de sua interação com os antígenos parasitários a partir da utilização do agente desnaturante, de modo que a diferença entre a quantidade de anticorpos detectados na ausência e na presença do agente desnaturante é menor nesta fase da infecção. Infelizmente, esta técnica pode apresentar problemas, pois a maturação de afinidade dos anticorpos IgG contra os antígenos utilizados rotineiramente pode ser muito variada entre os indivíduos, levando a variações de avidez que não condizem com o status imunológico do paciente (MONTTOYA, 2002; MONTTOYA; HUFFMAN; REMINGTON, 2004; SENSINI, 2006).

Os anticorpos IgM, considerados marcadores sorológicos de fase aguda, podem ser detectados por várias técnicas imunológicas. Com o conhecimento atual sobre a persistência de IgM durante a fase crônica, é imperativo a análise cautelosa deste marcador. Um grupo de pesquisadores revelou que anticorpos IgM podem ser detectados até 12 anos após a infecção aguda em alguns indivíduos (LIESENFELD et al., 1997). A persistência de IgM parece não ter correlação clínica com a doença, mas um paciente com resultado positivo para IgM pode ser erroneamente classificado como portador de infecção aguda, quando pode se tratar de um indivíduo cronicamente infectado. Neste sentido, um resultado positivo para IgM pode ser interpretado como um caso verdadeiramente positivo, com infecção na fase aguda, como um caso positivo, mas na fase crônica da infecção (podendo ser erroneamente diagnosticado como portador de fase aguda), ou um caso de falso positivo (decorrente de limitações das técnicas atuais de detecção de IgM) (MONTTOYA; LIESENFELD, 2004; MONTTOYA; REMINGTON, 2008).

Os anticorpos IgA podem ser detectados no soro de adultos infectados e de crianças infectadas congenitamente. Como observado com IgM, este anticorpo pode persistir por um longo período após a infecção, complicando o diagnóstico. Por esta razão, em adultos a detecção de IgA mostra-se de pouco auxílio na diferenciação de fase aguda e crônica, com os antígenos rotineiramente utilizados. Por outro lado, a detecção de IgA em casos de toxoplasmose congênita é bastante útil, pois em casos em que o recém-nascido não apresenta IgM, a detecção de IgA associada com IgG pode ser útil para o estabelecimento do diagnóstico de infecção congênita (STEPICK-BIEK et al., 1990).

Os anticorpos IgE podem ser detectados em adultos com infecção aguda, em recém-nascidos congenitamente infectados e em crianças com coriorretinite. A duração da soropositividade de anticorpos IgE é mais breve do que a observada para IgM e IgA, com potencial na identificação de toxoplasmose aguda. Porém, o fato desta classe de anticorpos nem sempre ser detectada pelas técnicas atuais de diagnóstico impede seu uso rotineiro no diagnóstico da toxoplasmose (PINON et al., 1990; WONG et al., 1993).

### **1.12 Novas abordagens no diagnóstico sorológico da toxoplasmose**

O diagnóstico preciso da infecção por *T. gondii* é um passo chave em casos de suspeita de toxoplasmose. O diagnóstico clínico é bastante difícil pelo fato da infecção mimetizar sintomas de outras doenças, de modo que os testes sorológicos são uma opção largamente difundida. Infelizmente, as técnicas sorológicas rotineiras apresentam várias limitações que dificultam o diagnóstico correto da toxoplasmose (MONTROYA, 2002). A maior parte dos kits diagnósticos utilizados na rotina utilizam antígenos nativos preparados a partir de taquizoítos mantidos na cavidade peritoneal de camundongos ou cultivados em cultura celular. O método de produção destes antígenos pode variar em cada laboratório, levando a flutuações na composição antigênica e nos resultados obtidos nos ensaios de cada laboratório. Além disso, as preparações antigênicas podem estar contaminadas com antígenos extra-parasitários, oriundos da cultura celular ou das células do camundongo, levando a dificuldades na padronização dos testes ou à diminuição de sua especificidade (HOLEC-GASIOR, 2013; KOTRESHA; NOORDIN, 2010). Vários trabalhos demonstraram que estas preparações antigênicas não apresentam capacidade de diferenciar fase aguda de fase crônica ou de diferenciar vias de infecção (ingestão de cisto tecidual ou oocisto) (BELA et al., 2008; HILL, D. et al., 2011; SANTANA et al., 2015; SANTANA et al., 2012).

Neste sentido, a pesquisa por novas preparações antigênicas se mostra de grande importância no diagnóstico da toxoplasmose. Nas últimas décadas, com a implementação de técnicas de bioinformática, como predição de epítomos, e o desenvolvimento da proteômica novas alternativas antigênicas tem se tornado viáveis (BELLI; WALKER; FLOWERS, 2005; KIM; WEISS, 2008). Essas estratégias são fundamentais para o desenho racional de novas técnicas diagnósticas, permitindo a escolha de antígenos mais antigênicos e específicos de uma

fase da infecção (fase aguda ou crônica) ou de uma via de infecção (antígenos exclusivos de cistos ou de oocistos). Deste modo, a produção de antígenos recombinantes e peptídeos sintéticos ganhou força nas últimas décadas, com vários trabalhos abordando o potencial de utilização destes compostos no diagnóstico diferencial da infecção por *T. gondii* (KOTRESHA; NOORDIN, 2010; MURRAY et al., 1993).

As maiores vantagens da utilização destes compostos para o diagnóstico de *T. gondii* são: o conhecimento preciso da composição do antígeno no teste; a possibilidade de utilização de mais de um antígeno, aumentando a sensibilidade e mantendo a especificidade do teste; a facilidade de padronização do método; e diminuição dos custos de produção do antígeno, que podem ser mais baratos que a manutenção do parasito vivo em camundongos ou em cultura celular. Além dessas características, podem ser escolhidos antígenos específicos de cada estágio infeccioso (taquizoíto, bradizoíto ou esporozoíto), permitindo a potencial diferenciação das fases da infecção e/ou das vias de infecção (HOLEC-GASIOR, 2013; SANTANA et al., 2015).

A determinação da fase de infecção (aguda ou crônica) é de grande importância em gestantes, tendo em vista que nesta fase o feto encontra-se sob risco aumentado de transmissão congênita do parasito, com possibilidade de ocorrência de consequências graves. Por esta razão, é de suma importância a busca pelo desenvolvimento de novas técnicas que permitam diferenciar melhor as fases de infecção. Alguns trabalhos têm relatado a utilização de proteínas recombinantes, como as proteínas de superfície, de micronemas, de roptrias e de grânulos densos do parasito, em testes sorológicos, as quais tem apresentado resposta mais significativa quando reagem com soros considerados de fase aguda, quando comparados com soros de fase crônica (HARNING et al., 1996; HOLEC-GASIOR et al., 2012; HOLEC-GASIOR; KUR; HISZCZYNSKA-SAWICKA, 2009; JACOBS; VERCAMMEN; SAMAN, 1999). Por outro lado, não existem muitos trabalhos avaliando a utilização de peptídeos no diagnóstico da toxoplasmose e na diferenciação das fases de infecção. Um dos poucos trabalhos utilizando peptídeos para a diferenciação de fases da infecção por *T. gondii* avaliou um peptídeo multi-epitopo (rMEP) na tentativa de diferenciar soros de fase aguda de soros da fase crônica, com resultados promissores (DAI et al., 2013).

O problema em alguns desses trabalhos é a falta de uma melhor caracterização do tempo de infecção, de modo que os soros são considerados de fase aguda somente pela avaliação dos métodos tradicionais de diagnóstico. Na prática do diagnóstico laboratorial da toxoplasmose,

apesar de já existirem trabalhos muito promissores, nenhum grupo de pesquisa ainda conseguiu desenvolver preparações antigênicas que possam substituir os antígenos parasitários totais. Este fato mostra que ainda são necessários novos estudos que avaliem variados alvos do parasito com o intuito de encontrar uma ou mais moléculas com potencial de utilização em testes sorológicos com alta sensibilidade e especificidade.

## 2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BAHIA-OLIVEIRA, L.M. et al. Toxoplasmosis in southeastern Brazil: an alarming situation of highly endemic acquired and congenital infection. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 133-136, 2001.

BAHIA-OLIVEIRA, L. M. et al. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, p. 55-62, 2003.

BELA, S. R. 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. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 62, p. 245-254, 2008.

BELLI, S. I.; WALKER, R. A.; FLOWERS, S. A. Global protein expression analysis in apicomplexan parasites: current status. **Proteomics**, v. 5, p. 918-924, 2005.

BISHOP, J. R.; CRAWFORD, B. E.; ESKO, J. D. Cell surface heparan sulfate promotes replication of *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 5395-5401, 2005.

BLADER, I. J. et al. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 Years Later. **Annual Review of Microbiology**, v. 69, p. 463-485, 2015.

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, p. 458-476, 2009.

BOUT, D. T. et al. Prospects for a human *Toxoplasma* vaccine. **Current drug targets. Immune, Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 2, p. 227-234, 2002.

BOWIE, W. R. et al. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. The BC *Toxoplasma* Investigation Team. **Lancet**, v. 350, p. 173-177, 1997.



BURNETT, A. J. et al. Multiple cases of acquired toxoplasmosis retinitis presenting in an outbreak. **Ophthalmology**, v. 105, p. 1032-1037, 1998.

BUXTON, D. et al. Ovine toxoplasmosis: transmission, clinical outcome and control. **Parasitologia**, v. 49, p. 219-221, 2007.

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

CAMARGO, M. E. et al. Immunoglobulin G and immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays and defined toxoplasmosis serological patterns. **Infection and Immunity**, v. 21, p. 55-58, 1978.

CARLIER, Y. et al. Congenital parasitic infections: a review. **Acta Tropica**, v. 121, p. 55-70, 2012.

CARRUTHERS, V. B.; SIBLEY, L. D. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. **European Journal of Cell Biology**, v. 73, p. 114-123, 1997.

CHARDES, T. et al. Antibody responses to *Toxoplasma gondii* in sera, intestinal secretions, and milk from orally infected mice and characterization of target antigens. **Infection and Immunity**, v. 58, p. 1240-1246, 1990.

CHEN, J. et al. Protective efficacy of *Toxoplasma gondii* calcium-dependent protein kinase 1 (TgCDPK1) adjuvated with recombinant IL-15 and IL-21 against experimental toxoplasmosis in mice. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, p. 487, 2014.

COMMODARO, A. G. et al. Ocular toxoplasmosis: an update and review of the literature. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 345-350, 2009.

CONRAD, P. A. et al. Transmission of *Toxoplasma*: clues from the study of sea otters as sentinels of *Toxoplasma gondii* flow into the marine environment. **International Journal for Parasitology**, v. 35, p. 1155-1168, 2005.

CORREA, D. et al. Congenital and acquired toxoplasmosis: diversity and role of antibodies in different compartments of the host. **Parasite Immunology**, v. 29, p. 651-660, 2007.

DABRITZ, H. A.; CONRAD, P. A. Cats and *Toxoplasma*: implications for public health. **Zoonoses and Public Health**, v. 57, p. 34-52, 2010.

DAI, J. F. et al. *Toxoplasma gondii*: enzyme-linked immunosorbent assay based on a recombinant multi-epitope peptide for distinguishing recent from past infection in human sera. **Experimental Parasitology**, v. 133, p. 95-100, 2013.

DARCY, F. et al. Induction of a protective antibody-dependent response against toxoplasmosis by in vitro excreted/secreted antigens from tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. **Parasite Immunology**, v. 10, p. 553-567, 1988.

DAWSON, D. Foodborne protozoan parasites. **International Journal of Food Microbiology**, v. 103, p. 207-227, 2005.

DE MOURA, L. et al. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, p. 326-329, 2006.

DENKERS, E. Y. et al. Phagocyte responses to protozoan infection and how *Toxoplasma gondii* meets the challenge. **PLoS Pathogens**, v. 8, p. e1002794, 2012.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis--an overview. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 22 Suppl, p. 88-92, 1991.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 205, p. 1593-1598, 1994.

DUBEY, J. P. Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and humans. **Veterinary Parasitology**, v. 64, p. 65-70, 1996.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**, v. 126, p. 57-72, 2004.

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

DUBEY, J. P. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 877-882, 2009a.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis in pigs--the last 20 years. **Veterinary Parasitology**, v. 164, p. 89-103, 2009b.

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

DUBEY, J. P. et al. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, v. 139, 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**, v. 11, p. 267-299, 1998.

DUBEY, J. P.; WELCOME, F. L. *Toxoplasma gondii*-induced abortion in sheep. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 193, p. 697-700, 1988.

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

EE, T. Y.; SINGH, M.; YAP, E. H. The determination of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in different IgG subclasses of human sera by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public health**, v. 20, p. 71-79, 1989.

FADUL, C. E.; CHANNON, J. Y.; KASPER, L. H. Survival of immunoglobulin G-opsonized *Toxoplasma gondii* in nonadherent human monocytes. **Infection and Immunity**, v. 63, p. 4290-4294, 1995.

FERGUSON, D. J. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 133-148, 2009.

FISCHER, H. G. et al. GRA7, an excretory 29 kDa *Toxoplasma gondii* dense granule antigen released by infected host cells. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 91, p. 251-262, 1998.

FISHBACK, J. L.; FRENKEL, J. K. Toxoplasmosis. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery**, v. 6, p. 219-226, 1991.

FRANCO, M. et al. A novel secreted protein, MYR1, is central to *Toxoplasma*'s manipulation of host cells. **Mbio**, v. 7, e02231-15, 2016.

FRENKEL, J. K.; PARKER, B. B. An apparent role of dogs in the transmission of *Toxoplasma gondii*. The probable importance of xenosmophilia. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 791, p. 402-407, 1996.

FUNG, H. B.; KIRSCHENBAUM, H. L. Treatment regimens for patients with toxoplasmic encephalitis. **Clinical Therapeutics**, v. 18, p. 1037-1056; discussion 1036, 1996.

GAZZINELLI, R. T.; DENKERS, E. Y.; SHER, A. Host resistance to *Toxoplasma gondii*: model for studying the selective induction of cell-mediated immunity by intracellular parasites. **Infectious Agents and Disease**, v. 2, p. 139-149, 1993.

GAZZINELLI, R. T. et al. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p. 6115-6119, 1993.

GUO et al. A systematic meta-analysis of *Toxoplasma gondii* prevalence in food animals in the United States. **Foodborne Pathogens Diseases**, *in press*, 2016.

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, p. 319-322, 1995.

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

HARDING, C. R. et al. Gliding associates proteins play essential roles during the formation of the inner membrane complex of *Toxoplasma gondii*. **Plos Pathogens**, v. 4, e1005403, 2016.

HARNING, D. et al. Recombinant *Toxoplasma gondii* surface antigen 1 (P30) expressed in *Escherichia coli* is recognized by human *Toxoplasma*-specific immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 3, p. 355-357, 1996.

HE, X. L. et al. Structure of the immunodominant surface antigen from the *Toxoplasma gondii* SRS superfamily. **Nature Structural Biology**, v. 9, p. 606-611, 2002.

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

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

HILL, D. et al. Identification of a sporozoite-specific antigen from *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Parasitology**, v. 97, p. 328-337, 2011.

HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 8, p. 634-640, 2002.

HILL, D. E.; CHIRUKANDOTH, S.; DUBEY, J. P. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. **Animal Health Research Reviews**, v. 6, p. 41-61, 2005.

HOLEC-GASIOR, L. *Toxoplasma gondii* recombinant antigens as tools for serodiagnosis of human toxoplasmosis: current status of studies. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 20, p. 1343-1351, 2013.

HOLEC-GASIOR, L. et al. A new MIC1-MAG1 recombinant chimeric antigen can be used instead of the *Toxoplasma gondii* lysate antigen in serodiagnosis of human toxoplasmosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, p. 57-63, 2012.

HOLEC-GASIOR, L.; KUR, J.; HISZCZYNSKA-SAWICKA, E. GRA2 and ROP1 recombinant antigens as potential markers for detection of *Toxoplasma gondii*-specific

immunoglobulin G in humans with acute toxoplasmosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 16, p. 510-514, 2009.

HUSKINSON, J. et al. *Toxoplasma* antigens recognized by immunoglobulin G subclasses during acute and chronic infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, p. 2031-2038, 1989.

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

JACOBS, D.; VERCAMMEN, M.; SAMAN, E. Evaluation of recombinant dense granule antigen 7 (GRA7) of *Toxoplasma gondii* for detection of immunoglobulin G antibodies and analysis of a major antigenic domain. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 6, p. 24-29, 1999.

JIMENEZ-RUIZ, E. et al. Vacuolar protein sorting mechanisms in apicomplexan parasites. **Molecular and Biochemical Parasitology**, *in press*, 2016.

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

JONES, J. L.; DUBEY, J. P. Foodborne toxoplasmosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, p. 845-851, 2012.

JONES, L. A.; ALEXANDER, J.; ROBERTS, C. W. Ocular toxoplasmosis: in the storm of the eye. **Parasite Immunology**, v. 28, p. 635-642, 2006.

JUN, C. D. et al. Nitric oxide mediates the *Toxoplasma* static activity of murine microglial cells in vitro. **Immunological Investigations**, v. 22, p. 487-501, 1993.

KANEKO, Y. et al. Natural IgM antibodies in sera from various animals but not the cat kill *Toxoplasma gondii* by activating the classical complement pathway. **Parasitology**, v. 128, p. 123-129, 2004.

KESSLER, H. et al. Microneme protein 8--a new essential invasion factor in *Toxoplasma gondii*. **Journal of Cell Science**, v. 121, p. 947-956, 2008.

KIM, K.; WEISS, L. M. *Toxoplasma*: the next 100 years. **Microbes and infection**, v. 10, p. 978-984, 2008.

KOTRESHA, D.; NOORDIN, R. Recombinant proteins in the diagnosis of toxoplasmosis. **APMIS : Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v. 118, p. 529-542, 2010.

KRAVETZ, J. Congenital toxoplasmosis. **Clinical Evidence**, v. 2013, 2013.

LAMB, G. A.; FELDMAN, H. A. A nationwide serum survey of Brazilian military recruits, 1964. 3. *Toxoplasma* dye test antibodies. **American Journal of Epidemiology**, v. 87, p. 323-328, 1968.

LIESENFELD, O. et al. False-positive results in immunoglobulin M (IgM) *Toxoplasma* antibody tests and importance of confirmatory testing: the Platelia Toxo IgM test. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 174-178, 1997.

LIU, Q. et al. Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. **Parasites & Vectors**, v. 8, p. 292, 2015.

LOURIDO, S. et al. Calcium-dependent protein kinase 1 is an essential regulator of exocytosis in *Toxoplasma*. **Nature**, v. 465, p. 359-362, 2010.

LUFT, B. J. et al. Toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immune deficiency syndrome. **Jama**, v. 252, p. 913-917, 1984.

LUFT, B. J. et al. Primary and reactivated *Toxoplasma* infection in patients with cardiac transplants. Clinical spectrum and problems in diagnosis in a defined population. **Annals of Internal Medicine**, v. 99, p. 27-31, 1983.

LUFT, B. J.; REMINGTON, J. S. AIDS commentary. Toxoplasmic encephalitis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 157, p. 1-6, 1988.

LUFT, B. J.; REMINGTON, J. S. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. **Clinical Infectious Diseases**, v. 15, p. 211-222, 1992.

MACK, D. G.; MCLEOD, R. Human *Toxoplasma gondii*-specific secretory immunoglobulin A reduces *T. gondii* infection of enterocytes in vitro. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 90, p. 2585-2592, 1992.

MASUR, H. et al. Outbreak of toxoplasmosis in a family and documentation of acquired retinochoroiditis. **The American Journal of Medicine**, v. 64, p. 396-402, 1978.

MATOWICKA-KARNA, J.; KEMONA, H. IgE antibodies in toxoplasmosis. **Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczałnej**, v. 68, p. 597-602, 2014.

MCALLISTER, R. A. An Outbreak of Toxoplasmosis in an Ontario Chinchilla Herd. **Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science**, v. 28, p. 53-56, 1964.

MCLEOD, R. et al. Why prevent, diagnose and treat congenital toxoplasmosis? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 320-344, 2009.

MILLER, C. M. et al. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 23-39, 2009.

- MIN, J. et al. Enhancement of protective immune responses induced by *Toxoplasma gondii* dense granule antigen 7 (GRA7) against toxoplasmosis in mice using a prime-boost vaccination strategy. **Vaccine**, v. 30, p. 5631-5636, 2012.
- MINEO, J. R. et al. Antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (SAG-1, P30) inhibit infection of host cells and are produced in murine intestine after peroral infection. **Journal of Immunology**, v. 150, p. 3951-3964, 1993.
- MITAL, J. et al. Conditional expression of *Toxoplasma gondii* apical membrane antigen-1 (TgAMA1) demonstrates that TgAMA1 plays a critical role in host cell invasion. **Molecular Biology of the Cell**, v. 16, p. 4341-4349, 2005.
- MONTOYA, J. G. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 185 Suppl 1, p. S73-82, 2002.
- MONTOYA, J. G.; HUFFMAN, H. B.; REMINGTON, J. S. Evaluation of the immunoglobulin G avidity test for diagnosis of toxoplasmic lymphadenopathy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 4627-4631, 2004.
- MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**, v. 363, p. 1965-1976, 2004.
- MONTOYA, J. G.; REMINGTON, J. S. Toxoplasmic chorioretinitis in the setting of acute acquired toxoplasmosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 23, p. 277-282, 1996.
- MONTOYA, J. G.; REMINGTON, J. S. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, p. 554-566, 2008.
- MUNOZ-ZANZI, C. et al. Detection of oocyst-associated toxoplasmosis in swine from southern Chile. **Zoonoses and Public Health**, v. 59, p. 389-392, 2012.
- MUNOZ, M.; LIESENFELD, O.; HEIMESAAT, M. M. Immunology of *Toxoplasma gondii*. **Immunological Reviews**, v. 240, p. 269-285, 2011.
- MURRAY, A. et al. Multiple B-cell epitopes in a recombinant GRA2 secreted antigen of *Toxoplasma gondii*. **Applied Parasitology**, v. 34, p. 235-244, 1993.
- OPSTEEGH, M. et al. Intervention strategies to reduce human *Toxoplasma gondii* disease burden. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, p. 101-107, 2015.
- PIFER, R.; YAROVINSKY, F. Innate responses to *Toxoplasma gondii* in mice and humans. **Trends in Parasitology**, v. 27, p. 388-393, 2011.
- PINON, J. M. et al. Detection of specific immunoglobulin E in patients with toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 1739-1743, 1990.

PROCTOR, E. M.; BANERJEE, S. N. The seroepidemiology of toxoplasmosis in the lower Fraser Valley of British Columbia. **The Canadian Journal of Infectious Diseases**, v. 5, p. 218-223, 1994.

RAWAL, B. D. Toxoplasmosis; a dye-test survey on sera from vegetarians and meat eaters in Bombay. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 53, p. 61-63, 1959.

REMYINGTON, J. S.; MERIGAN, T. C. Interferon: protection of cells infected with an intracellular protozoan (*Toxoplasma gondii*). **Science**, v. 161, p. 804-806, 1968.

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

ROBERT-GANGNEUX, F. It is not only the cat that did it: how to prevent and treat congenital toxoplasmosis. **The Journal of Infection**, v. 68 Suppl 1, p. S125-133, 2014.

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

ROGHMANN, M. C. et al. Decreased seroprevalence for *Toxoplasma gondii* in Seventh Day Adventists in Maryland. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, p. 790-792, 1999.

ROSSO, F. et al. Prevalence of infection with *Toxoplasma gondii* among pregnant women in Cali, Colombia, South America. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, p. 504-508, 2008.

RUSKIN, J.; REMINGTON, J. S. Toxoplasmosis in the compromised host. **Annals of Internal Medicine**, v. 84, p. 193-199, 1976.

RYNING, F. W. et al. Probable transmission of *Toxoplasma gondii* by organ transplantation. **Annals of Internal Medicine**, v. 90, p. 47-49, 1979.

SAADATNIA, G.; GOLKAR, M. A review on human toxoplasmosis. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 44, p. 805-814, 2012.

SABIN, A. B.; FELDMAN, H. A. Dyes as Microchemical Indicators of a New Immunity Phenomenon Affecting a Protozoon Parasite (*Toxoplasma*). **Science**, v. 108, p. 660-663, 1948.

SANTANA, S. S. et al. CCp5A protein from *Toxoplasma gondii* as a serological marker of oocyst-driven infections in humans and domestic animals. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015.



SANTANA, S. S. et al. 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.

SCHLUTER, D. et al. Animals are key to human toxoplasmosis. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, p. 917-929, 2014.

SENSINI, A. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy: opportunities and pitfalls of serological diagnosis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, 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, p. 432-437, 2013.

SKILLMAN, K. M. et al. Evolutionarily divergent, unstable filamentous actin is essential for gliding motility in apicomplexan parasites. **PLoS Pathogens**, v. 7, p. e1002280, 2011.

STAGNO, S. et al. An outbreak of toxoplasmosis linked to cats. **Pediatrics**, v. 65, p. 706-712, 1980.

STEPICK-BIEK, P. et al. IgA antibodies for diagnosis of acute congenital and acquired toxoplasmosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 162, p. 270-273, 1990.

TENTER, A. M. *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 364-369, 2009.

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

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

VADALA, A. J. Ocular toxoplasmosis. **Medical bulletin. United States. Army. European Command. Medical Division**, v. 8, p. 267-270, 1951.

VILLARINO, N.; SCHMIDT, N. W. CD8 T cell responses to and intracellular parasites. **Current Immunology Reviews**, v. 9, p. 169-178, 2013.

WALKER, D. M. et al. Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, p. 1245-1263, 2014.

WALLACE, G. D. Experimental transmission of *Toxoplasma gondii* by filth-flies. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 20, p. 411-413, 1971.

WALLACE, G. D. Experimental transmission of *Toxoplasma gondii* by cockroaches. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 126, p. 545-547, 1972.

WEISS, L. M.; DUBEY, J. P. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 895-901, 2009.

WONG, S. Y. et al. Role of specific immunoglobulin E in diagnosis of acute *Toxoplasma* infection and toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, p. 2952-2959, 1993.

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

YONETO, T. et al. A critical role of Fc receptor-mediated antibody-dependent phagocytosis in the host resistance to blood-stage *Plasmodium berghei* XAT infection. **Journal of Immunology**, v. 166, p. 6236-6241, 2001.

YOSHIDA, N.; TYLER, K. M.; LLEWELLYN, M. S. Invasion mechanisms among emerging food-borne protozoan parasites. **Trends in Parasitology**, v. 27, p. 459-466, 2011.

## *CAPÍTULO II*

*CCp5A Protein from Toxoplasma gondii as a  
Serological Marker of Oocyst-Driven Infections in  
Humans and Domestic Animals.*

**CCp5A protein from *Toxoplasma gondii* as a serological marker of oocyst-driven infections in humans and domestic animals**

Silas S. Santana<sup>1</sup>, Luiz C. Gebrim<sup>1</sup>, Fernando R. Carvalho<sup>1</sup>, Heber S. Barros<sup>1</sup>, Patrício C. Barros<sup>1</sup>, Ana C. A. M. Pajuaba<sup>1</sup>, Valeria Messina<sup>2</sup>, Alessia Possenti<sup>2</sup>, Simona Cherchi<sup>2</sup>, Edna M. V. Reiche<sup>3</sup>, Italmar T. Navarro<sup>4</sup>, João L. Garcia<sup>4</sup>, Edoardo Pozio<sup>2</sup>, Tiago W. P. Mineo<sup>1</sup>, Furio Spano<sup>2</sup>, and José R. Mineo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> *Laboratory of Immunoparasitology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, Brazil,*

<sup>2</sup> *Department of Infectious, Parasitic and Immunomediated Diseases, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy,*

<sup>3</sup> *Department of Clinical Medicine, State University of Londrina - University Hospital, Londrina, Brazil,*

<sup>4</sup> *Department of Preventive Veterinary Medicine, State University of Londrina, Londrina, Brazil.*

**Running title:** *T. gondii* oocyst molecular marker.

\* 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: 55-34-3225-8668. Fax: 55-34-3218-2333.

E-mail: jrmineo@ufu.br.

## ABSTRACT

Considering that the current immunoassays are not able to distinguish the infective forms that cause *Toxoplasma gondii* infection, the present study was carried out to evaluate the reactivity of two recombinant proteins (CCp5A and OWP1) from oocyst/sporozoite, in order to differentiate infections occurring by ingestion of oocysts or tissue cysts. The reactivity of the recombinant proteins was assessed against panels of serum samples from animals (chickens, pigs, and mice) that were naturally or experimentally infected by different infective stages of the parasite. Also, we tested sera from humans who have been infected by oocysts during a well-characterized toxoplasmosis outbreak, as well as sera from pregnant women tested IgM<sup>+</sup>/IgG<sup>+</sup> for *T. gondii*, which source of infection was unknown. Only the sporozoite-specific CCp5A protein was able to differentiate the parasite stage that infected chickens, pigs and mice, with specific reactivity for oocyst-infected animals. Furthermore, the CCp5A showed preferential reactivity for recent infection by oocyst/sporozoite in pigs and mice. In humans, CCp5A showed higher reactivity with serum samples from the outbreak, compared with serum from pregnant women. Altogether, these findings demonstrate the usefulness of the CCp5A protein as a new tool to identify the parasite stage of *T. gondii* infection, allowing its application for diagnosis and epidemiological investigations in animals and humans. The identification of parasite infective stage can help to design effective strategies to minimize severe complications in immunocompromised people and, particularly, in pregnant women to prevent congenital infection.

**Keywords:** *Toxoplasma gondii*; oocyst-sporozoite antigen; molecular marker of infection; human toxoplasmosis; animal toxoplasmosis; food security.

## INTRODUCTION

*Toxoplasma gondii* is an apicomplexan ubiquitary intracellular parasite that can infect all warm-blooded animals, including humans (Tenter et al., 2000; Dubey et al., 2012; Franco et al., 2015). The infection caused by this parasite is usually asymptomatic for immunocompetent individuals, but it causes severe consequences for immunocompromised individuals, like HIV-AIDS patients. Also, when pregnant women acquire primary infection and the parasite crosses the placental barrier, the fetus could be severely affected, which may lead to abortion, neonatal death, or significant postnatal complications (Halonen and Weiss, 2013).

The definitive hosts of this parasite are members of the Felidae family, while the intermediate hosts are countless warm-blooded animals. All three parasite stages are able to infect the hosts: the bradyzoites present in tissue cysts, the sporozoites contained in the oocysts and the tachyzoites (Innes, 2010). The oral route is the most frequent form of postnatal transmission of toxoplasmosis in humans. The infection can occur through ingestion of infective oocysts shed with cat feces, which are present in the environment, on vegetables, water and litter boxes, or by ingestion of raw/ undercooked meat (from pork, lamb, chicken, or goat) containing tissue cysts. The prevalence of infections is strictly related to cultural habits, food quality, hygiene, and socio-economic status (Dubey, 1986, 2009; Aramini et al., 1999; Bahia-Oliveira et al., 2003; Innes et al., 2009; Innes, 2010).

The oocyst stage of *T. gondii* is highly resistant to disinfectants or freezing, although heat above 55°C may kill the sporozoites (Hill and Dubey, 2002; Schluter et al., 2014), and contaminated drinking water sources may cause outbreaks of toxoplasmosis worldwide. Thus, oocysts are considered an important source of environmental contamination (Dubey, 2004; Jones and Dubey, 2010). Until a few years ago, waterborne toxoplasmosis had been considered rare, but this assertion can be considered inappropriate nowadays, because there have been several outbreaks in recent years linked to *T. gondii* transmission by water (Dubey et al., 2012). In 1979, a toxoplasmosis outbreak occurred among US military members, who were doing training in Panama. It was attributed to the water contaminated by feces from wild cats as the source of infection, considering that the soldiers were fed only by controlled foods (Sulzer et al., 1986). In 1995, an extensive outbreak in Victoria, Canada, was connected to water infection

via oocyst (Bowie et al., 1997; Burnett et al., 1998). Since 1990, oocysts have been implicated as infective stage in toxoplasmosis outbreaks in Brazil. In Santa Isabel do Ivaí, from 426 individuals presenting anti-*Toxoplasma* IgM and IgG, 176 fulfilled the criteria to be defined as cases, and 155 of these patients showed symptoms of acute toxoplasmosis. In this outbreak, the patients were infected by *T. gondii* oocysts excreted by feces from domestic cats, which contaminated an underground reservoir containing unfiltered water (de Moura et al., 2006).

In view of the great medical importance of toxoplasmosis, many methods have been developed in the last decades to improve the accuracy and sensitivity of serological assays. Whole tachyzoite extracts have been used as antigen in various protocols, resulting in significant limitations for standardization of the serological assays. For this reason, selected *T. gondii* recombinant proteins have great potential as immunoreagents (Beghetto et al., 2003; Buffolano et al., 2005; Kotresha and Noordin, 2010; Hill et al., 2011; Santana et al., 2012). The use of these proteins makes possible to design new diagnostic tests based on well-characterized antigens. Additional advantages include the relative low cost, high degree of purity, and the possibility to select specific antigens for a given infective stage of the parasite (Pietkiewicz et al., 2004, 2007; Pfrepper et al., 2005; Kotresha and Noordin, 2010; Hill et al., 2011).

Currently, there is no stage-specific serological assay for toxoplasmosis to estimate the sources of infection worldwide. The lack of this information hampers the accomplishment of procedures to prevent and control *T. gondii* infection, as the evidences of infection via oocyst is exclusively based on epidemiological surveillance studies, which can be inaccurate in many situations. These facts have also restricted the implementation of educational programs to reduce or minimize the risk factors associated with toxoplasmosis (Hill et al., 2011; Munoz-Zanzi et al., 2012).

Recent proteomic studies have shed light on the repertoire of proteins expressed by a so far poorly characterized stage of *T. gondii*, the oocyst/sporozoite (Possenti et al., 2010, 2013; Fritz et al., 2012a, b). Some of the stage-specific components identified by this strategy can be considered as potential targets for the development of novel diagnostic immunoassays able to identify oocyst-driven infections. In this context, the major aim of the present study was to assess the antigenic reactivity of TgOWP1 and TgCCp5A, two polypeptides specifically expressed by *T. gondii* oocysts or sporozoites, respectively. Recombinant forms of these molecules were assayed, in parallel with soluble tachyzoite antigen, against panels of serum

samples from the following hosts: chickens (naturally infected by oocysts, experimentally immunized with tachyzoite antigen, or experimentally infected with tissue cysts); pigs (naturally infected or experimentally infected with oocysts or tachyzoites); mice (experimentally infected with cysts or oocysts); and humans (pregnant women positive for anti-*T. gondii* IgM/IgG and individuals infected by oocysts during an outbreak of toxoplasmosis). It was found that the CCp5A recombinant polypeptide was able to efficiently differentiate the parasite stage in infected chickens, pigs and mice, since stage-specific antibodies were detected only in the sera from oocyst-infected animals. In addition, human serum samples from individuals who acquired infection by oocyst ingestion showed higher IgM and IgG antibody levels to CCp5A in comparison with serum samples from pregnant women. Together, these findings indicate that CCp5A is a good molecular marker to differentiate the *T. gondii* infective stages responsible for infection.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Study approval**

The maintenance and care of experimental animals complied with the National Institutes of Health guidelines for the human use of laboratory animals. The Ethics Committee for Animal Experimentation from Federal University of Uberlândia (CEUA-UFU) approved all procedures. Hens and mice were maintained in individual cages at animal facilities from this institution, and they received food and water *ad libitum*. Pigs were randomly allocated in separate stables and all procedures involving these animals were approved for the Ethics Committee for Animal Experimentation of State University of Londrina, Paraná, Brazil. Concerning the experiments analyzing human sera, the study was approved by the Ethical Committee Involving Humans from the State University of Londrina (CEP-UEL) and all patients signed the consent term prior they have been enrolled in this investigation.



## **Proteins**

### **Soluble *Toxoplasma* Antigen (STAg)**

Parasite suspensions from RH strain were adjusted to  $1 \times 10^8$  tachyzoites/ml and submitted to freeze-thawing and sonication cycles in the presence of protease inhibitors (Mineo et al., 1980; Marcolino et al., 2000). The preparation was centrifuged at  $10.000 \times g$  for 15 min at 4°C, and the supernatants were collected. Subsequently, the protein content was determined (Bradford, 1976) and aliquots of 100 ml were stored at -20°C until being tested.

### **Recombinant proteins**

Recombinant CCp5A and OWP1 possessing an N-terminal tail of six histidines were produced according to the strategy described previously (Possenti et al., 2010). Proteins were purified by nickel affinity chromatography and their contents quantified (Bradford, 1976). Aliquots of 100 µL were stored at -20°C until being used. The integrity of recombinant proteins and STAg were assessed by electrophoresis on 12% minigels.

## **Serum samples from animals**

### **Chicken serum samples**

Chicken serum samples were obtained from animals naturally infected by oocyst, experimentally immunized with STAg or experimentally infected with tissue cysts. Serum samples from naturally infected chickens were collected from chickens raised extensively ( $n = 113$ ) in various suburban areas from Uberlândia city, MG, Brazil. Chickens raised extensively that were seropositive to *T. gondii* were considered naturally infected. For serum samples of animals that were experimentally infected or immunized, hens of a commercial strain were used. The hens were derived from chickens immunized against the various pathogens, but they were seronegative to *T. gondii* infection. Serum samples from chickens immunized with STAg were collected after immunization of hens with emulsion composed of STAg and Freund's adjuvant by muscular route. Primary immunization was performed with 100 µg of STAg in 250 µL of PBS and equal volume of Freund's complete adjuvant (Sigma Chem, Co., St. Louis, MO, USA). Two boosters were performed at 15-days intervals, with 100 µg of STAg plus Freund's

incomplete adjuvant, as described elsewhere (Ferreira-Júnior et al., 2012). Serum samples from experimentally infected chickens with cysts were obtained after oral infection of hens with 100 cysts of *T. gondii* (VEG strain), as previously described (Kaneto et al., 1997).

### **Pig serum samples**

Serum samples were obtained from three groups of pigs, i.e., naturally infected by oocyst, experimentally infected with tachyzoites or experimentally infected with oocysts. Samples from naturally infected pigs were collected from 44 castrated male pigs with the same genetic background. These animals were weaned when they were 21-days-old and maintained at Piracaíba farm, Araguari, MG, Brazil. For the serum samples of animals that were experimentally infected, six mixed-breed pigs from 6.5 to 7.5 weeks of age, including females and castrated males, were randomly allocated in separate stables. The animals were acclimatized for 6 days. All pigs were seronegative to *T. gondii* until the day of infection. The pigs were experimentally infected with  $1 \times 10^6$  tachyzoites of RH strain by intramuscular injection ( $n = 3$ ) or by  $1.5 \times 10^4$  oocysts of VEG strain by the oral route ( $n = 3$ ), as previously described (Garcia et al., 2005). Serum samples of these animals were collected and analysed on days 0, 7, 14, 21, and 28 post-infection.

### **Mouse serum samples**

Sera were obtained from mice experimentally infected with *T. gondii* tissue cysts or oocysts. All experiments were carried out with 8-12 weeks-old female Balb/c mice maintained under standard conditions in the Bioterism Center and Animal Experimentation, Federal University of Uberlândia, MG, Brazil. Briefly, two groups of five animals were infected with 50 oocysts or 50 cysts of *T. gondii* (VEG strain) by oral route, as described elsewhere (Hill et al., 2011). Serum samples were collected and analyzed on days 0, 15, 30, 45, and 60 post-infection.

## **Human serum samples**

### **Serum samples from outbreak**

A total of 78 serum samples from a toxoplasmosis outbreak was collected from individuals living in the municipalities of Ouro Preto do Oeste, Jaru and Ji-Paraná in the state of Rondônia, Brazil (Sociedade Brasileira de Parasitologia, 2011). This well-documented toxoplasmosis outbreak occurred between July and August from 2011 and the source of infection was water containing *T. gondii* oocysts, due to an accident that took place 3 weeks before, which contaminated the water resources from the cities. All infected individuals started with symptoms such as fever, prostration, muscle pain, joint and head, onset of swelling in the lymph nodes, especially in the neck region. Ocular disease was observed in some cases. All samples were seropositive for *T. gondii* infection by commercial immunoassays. The epidemiological investigations concluded that the source of infection was water contaminated by oocysts.

### **Pregnant women**

A total of 78 serum samples from pregnant women with IgM and IgG against *T. gondii* was analyzed. These samples came from the Outpatient Reference Centre for Pediatric Infectious Diseases, which is the reference service for congenital toxoplasmosis at the Outpatient Clinical Hospital, State University of Londrina, Paraná State, Brazil.

### **Western blot analysis**

#### **Electrophoretic transfer**

For Western blot analysis, 2 µg of each antigen (recombinant proteins or STAg) in sample buffer (Tris-HCl 100 mM [pH 6.8]; 4% SDS; 20% glycerol, bromophenol blue 0.2%) were incubated for 5 min at 100°C and resolved by 12% SDS-PAGE. After electrophoretic separation, proteins were transferred to nitrocellulose membrane using electrotransfer system (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cel, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The

nitrocellulose membranes were cut into approximately 3 mm wide strips and placed in channels for the reaction.

### **Immunoblotting of serum samples**

Strips were blocked with PBS plus 0.05% Tween 20 (PBS-T) supplemented with 5 or 8% skimmed milk for 2 h at room temperature. After washing with PBS-T, the strips were incubated for 18 h at 4°C with serum samples from chickens, pigs or mice, as described elsewhere (Dubey, 2010). After washing with PBS-T, strips were incubated with secondary antibody specific to each species conjugated to peroxidase (Sigma) for 2 h at room temperature. The membranes were washed again with PBS-T and developed by adding 3,3'-diaminobenzidine (DAB) at 1 mg/ml in 20 mM Tris-HCl (pH 7.2) and 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### **Enzyme-linked immunosorbent assay**

The immunoenzymatic assays were carried out to detect antibody reactivity against STAg or recombinant proteins in serum samples from chickens, pigs, mice, and humans. Briefly, high affinity polystyrene microtiter plates (Corning 3590 Laboratories, Inc., New York, NY, USA) were coated with STAg (10 µg/ml) or recombinant proteins (2 µg/ml) in carbonate-bicarbonate buffer 0.06 M (pH 9.6) for 18 h at 4°C. Plates were incubated with serum samples and subsequently with secondary antibody specific to each species conjugated to peroxidase (Sigma). The assay was revealed by adding the enzyme substrate (0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 2,2-azino-bis-3-ethyl-benzothiazoline sulfonic acid [ABTS, Sigma] in 0.07 M citrate phosphate buffer, pH 4.2). The cut off of the reaction was calculated as the mean OD of negative control sera plus 3 standard deviations. The negative control sera consisted of a pool of 10 serum samples tested negative for *T. gondii* infection. Antibody titers were expressed as ELISA index (EI), according to the following formula:  $EI = OD \text{ sample} / OD \text{ cut off}$ , as previously described (Silva et al., 2002). Samples with EI values  $\geq 1.2$  were considered positive.

### **Statistics**

Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism v. 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Antibody levels were compared between the recombinant

proteins and STAg using one-way ANOVA with Bonferroni post-test. Student's *t*-test was used to assess differences in the antibody kinetics analyses. Positivity rates for antigen preparations were analyzed by Fisher exact test. Values of  $P < 0.05$  were considered statistically significant.

## RESULTS

### Serologic differentiation of *T. gondii* stages in chicken infections

In order to identify a *T. gondii* protein potentially able to differentiate infections driven by distinct parasite infective stages, it was analyzed serum samples from chickens by Western blot analysis on the selected *T. gondii* proteins. It was included recombinant polypeptides belonging to distinct parasite proteins whose expression suggested an oocyst/sporozoite-specific profile, as determined by proteomic analyses reported in the ToxoDB database. Chicken sera were assessed against the recombinant polypeptides in comparison with STAg. When serum samples from different group of chickens were tested against the recombinant antigens, a differential reactivity was observed for CCp5A and OWP1 polypeptides (Figure 1A). Both proteins were recognized exclusively by sera from naturally infected chickens, with the CCp5A protein fragment showing the highest reactivity among all analyzed recombinant proteins.

To confirm whether the recombinant fragments from CCp5A and OWP1 could work as serological markers of infection via oocysts, it was performed an ELISA against the recombinant proteins in comparison with STAg, using 113 individual sera from free-range chickens. The levels of IgY antibodies were expressed by ELISA index (EI) for each antigen. The STAg reactivity showed an EI mean of 1.7, as compared to CCp5A and OWP1, which displayed EI means of 1.7 and 2.0, respectively (Figure 1B). The positivity rates were 80% for STAg, 70% for CCp5A, and 74% for OWP1 (Figure 1C). Based on these results, CCp5A and OWP1 showed characteristics of oocyst markers for chicken infection.

### Serologic differentiation of *T. gondii* stages in pig infections

To distinguish sources of *T. gondii* infection in pigs, it was assessed the recombinant proteins analyzed for chicken serum samples. As shown in Figure 2A, CCp5A showed

exclusive reactivity for serum samples from pigs infected by oocysts, whereas OWP1 showed no reactivity for all serum samples analyzed. As expected, the STAg antigen presented reactivity for all serum samples, no matter the source of infection. As only recombinant CCp5A was able to differentiate the infective stages in pigs, it was used this antigen to evaluate its performance in the kinetics of IgG production in pigs experimentally infected by either oocysts or tachyzoites. Serum samples were collected on days 0, 7, 14, and 28 post-infection and analyzed by ELISA. As shown in Figure 2B, the kinetics of IgG to CCp5A in serum samples from pigs infected with oocysts showed increasing levels until day 7 post-infection (EI = 1.6). After this time point, it was observed a slight decline until day 28 post-infection (EI = 1.3). In contrast, when analyzing the kinetics of IgG to CCp5A in serum samples from tachyzoite-infected pigs, EI mean values were below the cut off (EI = 1.2) for all time points analyzed (Figure 2C). Also, significant differences between the sources of infection were observed on day 7 and 14 post-infection, with detection of higher levels in serum samples from pigs infected with oocysts, in comparison with serum samples from pigs infected with tachyzoites. The early detection of anti-CCp5A IgG in pigs infected with oocysts suggested that this recombinant polypeptide might be considered a serological marker of recent oocyst-driven *Toxoplasma* infection in pigs. The production of IgG against STAg in serum samples from oocyst- infected pigs raised at day 7 post infection and increased at all times points ( Figure 2C), showing highest levels on day 28 post- infection ( EI= 6.8). Similarly, the kinetics assay for IgG to STAg in serum samples from pigs experimentally infected with tachyzoites increased over time with highest levels on day 28 post-infection (EI = 4.5; Figure 2C). Unlike oocyst-driven infection, positive EI values were observed only from day 14 onward. Significant differences between oocyst and tachyzoite as sources of infection were observed for all time points analyzed, with higher levels for serum samples infected by oocysts ( $P < 0.0001$ ).

In order to assess the diagnostic value of the CCp5A recombinant polypeptide in a population of naturally infected pigs, serum samples from animals raised extensively ( $n = 44$ ) were tested against CCp5A and STAg by ELISA. As shown in Figure 2D, 100% of positivity was observed for both antigenic preparations and no significant difference was observed in the levels of IgG antibodies between CCp5A and STAg. The seropositivity against CCp5A strongly suggests the oocysts as the probable source of infection in naturally infected pigs.

### **Serologic differentiation of *T. gondii* stages involved in mouse infections**

In order to assess the stage-specificity of the humoral response directed against CCp5A in a more controlled animal model, Balb/c mice were infected by oocysts or tissue cysts. As shown in Figure 3A, Western blot analysis revealed that CCp5A is exclusively recognized by serum samples from oocyst-infected mice, whereas STAg showed reactivity to serum samples from both oocyst- and cyst-infected mice. In agreement with the findings observed in pigs, these results confirm the ability of CCp5A to differentiate *T. gondii* stages responsible for the infection.

Aiming to further evaluate the serological characteristics of CCp5A in comparison with STAg, kinetics assays for both IgM and IgG isotypes were carried out, using serum samples from mice infected by oocysts. As shown in Figures 3B, C, the kinetics of IgM synthesis toward CCp5A and STAg presented different profiles. Interestingly, the kinetics of IgM for CCp5A showed a peak at day 15 post-infection (EI = 2.0), followed by a marked drop of the antibody titer reaching values below the cut off at day 45 post-infection (EI = 1.1). Significant differences between day 0 and day 15 ( $P < 0.0001$ ) and day 0 and day 30 ( $P < 0.05$ ) were observed. In contrast, IgM antibodies to STAg was found to increase over time, and the highest levels were reached at day 60 post-infection. Significant differences between day 0 and all other post-infection time points were observed ( $P < 0.0001$ ). The kinetics of anti-CCp5A IgG production showed that the antibody titers increased over time, reaching a peak on day 45 (EI = 3.7). From day 45 post-infection, a slight decrease was observed until day 60 post-infection (EI = 3.1; Figure 3D). The kinetics of anti-STAg IgG showed that this isotype level increased over time, reaching a peak at day 60 post-infection (EI = 7.8; Figure 3E). Significant differences between day 0 and other time points were observed ( $P < 0.05$ ;  $P < 0.0001$ ). The kinetics of IgM production against CCp5A points out to this protein as a parasite component associated with an early stage of infection in oocyst-infected mice.

### **Evaluation of CCp5A as a serologic marker in human sera**

As the CCp5A polypeptide resulted a stage-specific serological marker of infection in the animal species, the next step was to evaluate its performance with two different panels of human serum samples, in comparison with STAg. As shown in Figure 4A, the levels of IgM

antibodies against CCp5A polypeptide were higher in serum samples from patients involved in toxoplasmosis outbreak (EI = 1.6), when compared with sera from pregnant women (EI = 1.0;  $P < 0.0001$ ). Interesting, the IgM positivity rate of serum samples from the toxoplasmosis outbreak (80%) was markedly higher, when compared with serum samples from pregnant women (16%;  $P < 0.0001$ ). We also evaluated the IgM levels and positivity rates to STAg. As shown in Figure 4B, the levels of IgM were significantly higher in serum samples from the outbreak (EI = 4.6), when compared with sera from pregnant women (EI = 1.4;  $P < 0.0001$ ). However, it was observed no significant difference between the positivity rates of sera from the outbreak (92%) and pregnant women (76%).

Next, it was evaluated the IgG levels and reactivity to the CCp5A recombinant fragment (Figure 4C). As observed for IgM, the IgG antibody levels were higher in serum samples from the outbreak (EI = 2.4), when compared with serum samples from pregnant women (EI = 1.2). Significant difference between the positivity rate of outbreak (82%) and pregnant women (52%) serum samples was observed ( $P < 0.001$ ). In contrast, the analysis of IgG antibodies to STAg demonstrates higher levels of antibodies in sera from pregnant women (EI = 6.6), when compared with serum from the *Toxoplasma* outbreak (EI = 4.4), as shown in Figure 4D ( $P < 0.0001$ ). The positivity rates for both groups of sera were 100%. Overall, these results suggest that CCp5A is able to detect both IgM and IgG antibodies in human sera from patients who have been infected by *T. gondii* oocysts. Additionally, it was observed that in serum samples from pregnant women with serological evidence of recent exposure to the parasite, anti-CCp5A IgM antibodies were detected in 80% of samples, indicating a high prevalence of oocyst-driven infection.

## DISCUSSION

Toxoplasmosis has emerged as a waterborne disease of significant medical importance, considering its probability to cause outbreaks, with serious consequences even for immunocompetent people, who may develop severe ocular disease (Aramini et al., 1998, 1999; Burnett et al., 1998; Dubey, 2004). In these situations, oocysts shed by feces from felids, either from urban or rural areas can contaminate water reservoirs and infect humans and domestic animals (Aramini et al., 1999; de Moura et al., 2006; Schluter et al., 2014). The clinical



importance of toxoplasmosis and the possibility of causing outbreaks worldwide has led to its classification as Category B priority agent by The National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID; Kim and Weiss, 2008).

Previous studies have shown that, in intermediate hosts, the infection by oocysts is considered clinically more severe when compared to infections caused by cysts (Dubey, 2004). These findings are reinforced by the fact that many cases of human infections caused by oocysts exhibit clinical symptoms, even in immunocompetent individuals (Montoya and Liesenfeld, 2004; Innes, 2010). In addition to these relevant outcomes, oocysts are able to contaminate the environment as shown by serologic surveys conducted on herbivorous animals and vegetarian people (Rawal, 1959; Dubey, 2010; Ahmad and Qayyum, 2014). Taking into account the central role of oocysts in the *T. gondii* transmission, the identification of proteins that are expressed exclusively by oocysts/sporozoitcs may help to reveal parasite targets for the development of novel stage-specific serologic assays (Fritz et al., 2012b; Possenti et al., 2013).

The search for specific proteins from *T. gondii* oocysts/sporozoitcs has been investigated since the 80's (Kasper and Ware, 1985; Kasper, 1989), but only recently oocyst/sporozoitc-specific proteins have been characterized with potential use in vaccine design and diagnosis (Radke et al., 2004; Possenti et al., 2010; Boyer et al., 2011; Hill et al., 2011; Dorskaya et al., 2014). In the present study, it was investigated the serologic application of *T. gondii* polypeptides specific from oocysts/sporozoitcs by using reference serum samples from animals (chickens, pigs, and mouse) and humans, in order to determine which parasite stage was involved in the infection. First, the entire panel of recombinant proteins was tested against sera from chickens, naturally infected by oocysts, experimentally infected with tissue cysts, or experimentally immunized with tachyzoite antigen. Based on the results obtained by Western blot and ELISA, the proteins CCp5A and OWP1 were selected to be further analysed by ELISA against 113 serum samples from naturally infected chickens. These proteins showed ability to detect antibodies preferentially in sera from animals infected by *T. gondii* oocysts, reinforcing the results obtained by Western blot. High positivity rates of naturally infected chicken sera were found for CCp5A (70%), and OWP1 (74%), demonstrating the high level of environmental contamination with oocysts in the region.

To our knowledge, this is the first work using sera from hens in order to differentiate infective stages of *T. gondii*. Moreover, the majority of studies performed to analyze antibody

response in chickens against *T. gondii* used total antigens of the parasite (Zhu et al., 2008; Barakat et al., 2012; Zhao et al., 2012). It was described in the literature just a single work evaluating the use of recombinant proteins from *T. gondii* oocysts against serum samples from chickens (Hotop et al., 2014). However, the authors only evaluated the correlation between the immune response toward those recombinant proteins and the dose of oocysts experimentally inoculated in chickens. In contrast, our study focused on the identification of the parasite stage responsible for infection, indicating that recombinant CCp5A and OWP1 showed predominant reactivity with sera from chickens infected by oocysts. Next, we probed the recombinant proteins CCp5A and OWP1 with sera from pigs in order to assess the ability to differentiate the infective forms of *T. gondii* in a mammalian model that is known to be a significant source of *Toxoplasma* infections in humans (Dubey, 2009; Schluter et al., 2014). Only CCp5A showed reactivity with serum samples from experimentally infected pigs. The lack of reactivity of OWP1 with serum samples from pigs may be due to differences in the immune system of mammals and birds (Sharma and Tizard, 1984; Butler et al., 2009). Thus, our data indicate that CCp5A may be used to identify sera from chickens and pigs infected with oocysts.

When the kinetics of IgG in serum samples from pigs infected with oocysts was analysed, the CCp5A protein showed higher reactivity to this antibody isotype at day 7 post-infection. From this early phase onward, the kinetics assays showed a tendency to decrease over the time. On the other hand, the kinetics assays for IgG detection to CCp5A in serum samples from animals infected with tachyzoites showed no reactivity, as all EI values were below the cut off at all time points. These results strengthen the specificity of CCp5A to detect anti-*Toxoplasma* antibodies in pigs infected with oocysts and indicate that it could be considered a molecular marker for acute phase of infection. In contrast, the IgG kinetics to STAg increased over time for sera from animals experimentally infected by oocysts or tachyzoites. Taken into account that these differences in the kinetics of IgG production are likely due to the type of infective stage, the early detection of IgG against CCp5A observed in our study might be due to the expression of this protein only by sporozoites, whose stage-specific antigens are exposed to the host immune system exclusively at the beginning of the infection (Dubey et al., 1998). Accordingly, CCp5A, which contains a LCCL domain (Trexler et al., 2000), a common feature of various secreted proteins among apicomplexan parasites (Tosini et al., 2006), including *T. gondii*, is expressed only in the oocyst stage (Fritz et al., 2012a). It was described in the

literature that a recombinant protein from *T. gondii* sporozoites (TgERP) is able to differentiate infection by cysts or oocysts in serum samples from pigs by Western blot (Hill et al., 2011). It was observed that this antigen preparation was able to selectively detect the presence of specific antibodies to TgERP in pigs infected with oocysts until 6-8 months after infection. In our work, however, the highest level of anti-CCp5A IgG antibodies in oocyst-infected pigs was detected at day 7 post-infection, followed by a gradual decrease until day 28. These observations confirm the importance of the antigenic preparations to evaluate antibody kinetics, particularly whether they are prepared from sporozoite, bradyzoite, or tachyzoite parasites. In addition, our data showed 100% of positivity to CCp5A and STAg in samples from pigs raised extensively, resulting in naturally infected animals and indicating that the causative agent was the oocyst and suggesting a high level of environmental contamination by oocysts on the farm, where they had been raised. Similar results were observed using the TgERP protein in pig samples from slaughterhouses in Chile (80% of positivity; Munoz-Zanzi et al., 2012). These observations show the impact of the environmental contamination by oocysts in infected animals, which are used as food resources for humans, making clear that the identification of the infective form responsible for the infection is important.

The reactivity of CCp5A protein assessed in the mouse model was confirmed with sera from animals infected with oocysts, as a strong staining by Western blot was observed in the present study. The kinetics approaches for IgM and IgG antibodies to STAg in mice infected with oocysts revealed increasing levels over time. In contrast, the kinetics of IgM and IgG antibodies to CCp5A presented different profiles, with IgG antibodies to CCp5A reaching the highest level at 45 days after infection. As noticed for the kinetics of IgG antibodies in pigs infected with oocysts, the kinetics of anti-CCp5A IgM production in mice showed an early peak of reactivity, at day 15 post-infection. In agreement with our results, a previous study assessing the kinetics of mouse IgM antibodies against a recombinant protein from *T. gondii* sporozoites (SporoSAG), showed a peak of reactivity from 10 to 15 days post-infection in mice infected with oocysts (Doskaya et al., 2014), reinforcing the hypothesis that the use of proteins expressed exclusively by oocysts/sporozoites is critical to identify the early phase of oocyst-driven *T. gondii* infection.

A major obstacle to carry out procedures against toxoplasmosis in humans is the lack of information concerning the infective form of *T. gondii* responsible for the infection in a given

population. In order to overcome this difficulty, we have selected the CCp5A protein by screening panels of serum samples from various intermediate hosts, including a panel of human sera. This latter came from patients involved in a toxoplasmosis outbreak, which epidemiological investigations revealed that the affected individuals were likely infected by ingestion of oocysts in water. Also, this panel included serum samples from pregnant women showing positivity for IgM and IgG antibodies to *T. gondii*, but whose source of infection was unknown. When these serum samples were assessed for IgM antibodies against STAg, no significant differences were observed in the percentages of positivity between both groups (92% for outbreak-related sera and 76% for serum samples from pregnant women), although the reactivity levels were higher in serum samples from the outbreak. For IgG antibodies, the percentage of positivity was 100% for both groups of infected individuals, being these results in accordance with those observed for animal sera (chickens, pigs, and mouse), in which the STAg could not differentiate the infective forms of the parasite. However, when we screened for IgM and IgG directed to CCp5A, it was observed higher antibody levels and positivity rates in serum samples from the outbreak, as compared with samples from pregnant women. When analyzing the IgM antibodies, it was observed that 80% of the serum samples showed reactivity to CCp5A, whereas only 16% of sera from pregnant women were positive. These results suggest that the majority of the patients from the outbreak, who were presenting clinical manifestations of acute infection, were actually infected by oocysts, supporting the hypothesis that CCp5A shows characteristics of a molecular marker for recent infection by *T. gondii*. When it was compared the percentage of IgM positivity between STAg (76%) and CCp5A (16%) in serum samples from pregnant women, a significant difference could be confirmed. This difference may be due to the fact that STAg presents a mixture of various proteins, which may lead to detection of IgM antibodies beyond the acute phase. On the other hand, the lower detection of anti-CCp5A IgM observed in serum samples from pregnant women infected by an unknown parasite stage, can be explained by the fact that a single protein was employed. The use of a single, well-defined antigen like CCp5A can reduce the frequency of false positive results, which are frequently observed in conventional immunoassays. For IgG analysis, 82% of outbreak serum samples were positive for CCp5A, while 52% of pregnant women sera were positive. These results indicate that the majority of the outbreak serum samples came from patients that were actually infected by oocysts, while

18% of serum samples came from patients infected by other parasite stages. The serologic analysis of sera from pregnant women showed that 52% of samples reacted with CCp5A. These results indicate that pregnant women in this population might be infected by oocysts or tissue cysts with equal probability, showing the importance to prevent the infection during pregnancy not only by avoiding the ingestion of undercooked meat, but also preventing contact with oocysts present the environment.

In a previous study using the recombinant protein from sporozoite (TgERP) against human serum samples infected with oocysts, Hill et al. (2011) evaluated 17 serum samples infected by oocysts, being six samples from laboratory employees that were accidentally exposed to oocysts and 11 serum samples from outbreak of toxoplasmosis. All six infected individuals presented IgM and IgG antibodies to TgERP and 9 out of 11 (82%) individuals infected with oocysts had detectable antibodies to TgERP. These results are in agreement with the present study, although we have used a higher number of serum samples from outbreak to observe our results.

In summary, we have demonstrated that CCp5A is a new serologic tool capable to identify oocysts/sporozoites as the causative agent for *T. gondii* infection. This parasite sporozoite-specific protein can be considered a new molecular marker to be used in diagnosis and epidemiological studies in order to identify the source of infection for animals and humans. The identification of the infective stage of *T. gondii* responsible for the infection can help to design effective strategies to minimize parasite transmission and to prevent severe complications, mainly in immunocompromised people and pregnant women. Furthermore, these findings contribute to identify the source and parasite stage responsible for *T. gondii* infection in cases of toxoplasmosis outbreaks. Future studies should be done to evaluate the immunogenic ability of the CCp5A protein in vaccination protocols.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Brazilian Research Agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG); and Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## REFERENCES

- Ahmad, N., and Qayyum, M. (2014). Seroprevalence and risk factors for toxoplasmosis in large ruminants in northern Punjab, Pakistan. *J. Infect. Dev. Ctries.* 8, 1022-1028. doi: 10.3855/jidc.4405
- Aramini, J. J., Stephen, C., and Dubey, J. P. (1998). *Toxoplasma gondii* in Vancouver Island cougars (*Felis concolor vancouverensis*): serology and oocyst shedding. *J. Parasitol.* 84, 438-440. doi: 10.2307/3284508
- Aramini, J. J., Stephen, C., Dubey, J. P., Engelstoft, C., Schwantje, H., and Ribble, C. S. (1999). Potential contamination of drinking water with *Toxoplasma gondii* oocysts. *Epidemiol. Infect.* 122, 305-315. doi: 10.1017/S0950268899002113
- Bahia-Oliveira, L. M., Jones, J. L., Azevedo-Silva, J., Alves, C. C., Orefice, F., and Addiss, D. G. (2003). Highly endemic waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 55-62. doi: 10.3201/eid0901.020160
- Barakat, A. M., Salem, L. M., El-Newishy, A. M., Shaapan, R. M., El-Mahllawy, and E. K. (2012). Zoonotic chicken toxoplasmosis in some Egyptians governorates. *Pak. J. Biol. Sci.* 15, 821-826. doi: 10.3923/pjbs.2012.821.826
- Beghetto, E., Buffolano, W., Spadoni, A., Del Pezzo, M., Di Cristina, M., Minenkova, O., Petersen, E., Felici, F., and Gargano, N. (2003). Use of an immunoglobulin G avidity assay based on recombinant antigens for diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *J Clin Microbiol.* 41, 5414-5418. doi: 10.1128/JCM.41.12.5414-5418.2003
- Bowie, W. R., King, A. S., Werker, D. H., Isaac-Renton, J. L., Bell, A., Eng, S. B., and Marion, S. A. (1997). Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. The BC Toxoplasma Investigation Team. *Lancet* 350, 173-177. doi: 10.1016/S0140-6736(96)11105-3

Boyer, K., Hill, D., Mui, E., Wroblewski, K., Karrison, T., Dubey, J. P., Sautter, M., Noble, A. G., Withers, S., Swisher, C., Heydemann, P., Hosten, T., Babiarz, J., Lee, D., Meier, P., and McLeod, R. (2011). Unrecognized ingestion of *Toxoplasma gondii* oocysts leads to congenital toxoplasmosis and causes epidemics in North America. *Clin. Infect. Dis.* 53, 1081-1089. doi: 10.1093/cid/cir667

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248-254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3

Buffolano, W., Beghetto, E., Del Pezzo, M., Spadoni, A., Di Cristina, M., Petersen, E., and Gargano, N. (2005). Use of recombinant antigens for early postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* 43, 5916-5924. doi: 10.1128/JCM.43.12.5916-5924.2005

Burnett, A. J., Shortt, S. G., Isaac-Renton, J., King, A., Werker, D., and Bowie, W. R. (1998). Multiple cases of acquired toxoplasmosis retinitis presenting in an outbreak. *Ophthalmology* 105, 1032-1037. doi: 10.1016/S0161-6420(98)96004-3

Butler, J. E., Lager, K. M., Splichal, I., Francis, D., Kacskovics, I., Sinkora, M., Wertz, N., Sun, J., Zhao, Y., Brown, W. R., DeWald, R., Dierks, S., Muyldermans, S., Lunney, J. K., McCray, P. B., Rogers, C. S., Welsh, M. J., Navarro, P., Klobasa, F., Habe, F., and Ramsoondar, J. (2009). The piglet as a model for B cell and immune system development. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 128, 147-170. doi: 10.1016/j.vetimm.2008.10.321

de 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., and Garrett, D. O. (2006). Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 326-329. doi: 10.3201/eid1202.041115

Doskaya, M., Caner, A., Can, H., Gülçe, İz S., Gedik, Y., Doşkaya, A. D., Kalantari-Dehaghi, M., and Gürüz, Y. (2014). Diagnostic value of a Rec-ELISA using *Toxoplasma gondii*

recombinant SporoSAG, BAG1, and GRA1 proteins in murine models infected orally with tissue cysts and oocysts. *PLoS One* 9, e108329. doi: 10.1371/journal.pone.0108329 doi: 10.1016/0304-4017(86)90070-1

Dubey, J. P. (1986). A review of toxoplasmosis in pigs. *Vet. Parasitol.* 19, 181-223. doi: 10.1016/0304-4017(86)90070-1

Dubey, J. P. (2004). Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. *Vet. Parasitol.* 126, 57-72. doi: 10.1016/j.vetpar.2004.09.005

Dubey, J. P. (2009). Toxoplasmosis in pigs - the last 20 years. *Vet. Parasitol.* 164, 89-103. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.05.018

Dubey, J. P. (2010). *Toxoplasma gondii* infections in chickens (*Gallus domesticus*): prevalence, clinical disease, diagnosis and public health significance. *Zoonoses Public Health* 57, 60-73. doi: 10.1111/j.1863-2378.2009.01274.x

Dubey, J. P., Lago, E. G., Gennari, S. M., Su C., and Jones, J. L. (2012). Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology* 139, 1375-1424. doi: 10.1017/S0031182012000765

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

Ferreira-Júnior, Á., Santiago, F. M., Silva, M. V., Ferreira, F. B., Macêdo Júnior, A. G., Mota, C. M., Faria, M. S., Silva Filho, H.H., Silva, D. A., Cunha-Júnior, J. P., Mineo, J. R., and Mineo, T. W. (2012). Production, characterization and applications for *Toxoplasma gondii*-specific polyclonal chicken egg yolk immunoglobulins. *PLoS ONE*. 7, e40391. doi: 10.1371/journal.pone.0040391



Franco, P. S., da Silva, N. M., de Freitas Barbosa, B., de Oliveira Gomes, A., Ietta, F., Shwab, E. K., Su, C., Mineo, J. R., and Ferro, E. A. (2015). *Calomys callosus* chronically infected by *Toxoplasma gondii* clonal type II strain and reinfected by Brazilian strains is not able to prevent vertical transmission. *Front. Microbiol.* 6, 181. doi: 10.3389/fmicb.2015.00181

Fritz H. M., Bowyer P. W., Bogyo, M., Conrad, P. A., and Boothroyd J. C. (2012). Proteomic analysis of fractionated *Toxoplasma* oocysts reveals clues to their environmental resistance. *PLoS ONE* 7, e29955. doi: 10.1371/journal.pone.0029955

Fritz, H. M., Buchholz, K. R., Chen, X., Durbin-Johnson, B., Rocke, D. M., Conrad, P. A., and Boothroyd, J. C. (2012a). Transcriptomic analysis of toxoplasma development reveals many novel functions and structures specific to sporozoites and oocysts. *PLoS ONE* 7, e29998. doi: 10.1371/journal.pone.0029998.

Garcia, J. L., Gennari, S. M., Navarro, I. T., Machado, R. Z., Sinhorini, I. L., Freire, R. L., Marana, E. R., Tsutsui, V., Contente, A. P., and Begale, L. P. (2005). Partial protection against tissue cysts formation in pigs vaccinated with crude rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. *Vet. Parasitol.* 129, 209-217. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.01.006

Halonen, S. K., and Weiss, L. M. Toxoplasmosis. (2013). *Handb. Clin. Neurol.* 114, 125-145. doi: 10.1016/B978-0-444-53490-3.00008-X.

Hill, D., Coss, C., Dubey, J. P., Wroblewski, K., Sautter, M., Hosten, T., Muñoz-Zanzi, C., Mui, E., Withers, S., Boyer, K., Hermes, G., Coyne, J., Jagdis, F., Burnett, A., McLeod, P., Morton, H., Robinson, D., and McLeod, R. (2011). Identification of a sporozoite-specific antigen from *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* 97, 328-337. doi: 10.1645/GE-2782.1

Hill, D. and Dubey, J. P. (2002). *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin. Microbiol. Infect.* 8, 634-640. doi: 10.1046/j.1469- 0691.2002.00485.x

Hotop, A., Buschtöns, S., Bangoura, B., Zöller, B., Koethe, M., Spekker-Bosker, K., Hotop, S. K., Tenter, A. M., Däubener, W., Straubinger, R. K., and Groß, U. (2014). Humoral immune responses in chickens and turkeys after infection with *Toxoplasma gondii* by using recombinant antigens. *Parasitol. Res.* 113, 1473-1480. doi: 10.1007/s00436-014-3788-x.

Innes, E. A. (2010). A brief history and overview of *Toxoplasma gondii*. *Zoonoses Public Health* 57, 1-7. doi: 10.1111/j.1863-2378.2009.01276.x.

Innes, E. A., Bartley, P. M., Buxton, D., and Katzer, F. (2009). Ovine toxoplasmosis. *Parasitology* 136, 1887-1894. doi: 10.1017/S0031182009991636.

Jones, J. L. and Dubey, J. P. (2010). Waterborne toxoplasmosis - recent developments. *Exp. Parasitol.* 124, 10-25. doi: 10.1016/j.exppara.2009.03.013.

Kaneto, C. N., Costa, A. J., Paulillo, A. C., Moraes, F. R., Murakami, T. O., and Meireles, M. V. (1997). Experimental toxoplasmosis in broiler chicks. *Vet. Parasitol.* 69, 203-210. doi: 10.1016/S0304-4017(96)01126-0

Kasper, L. H. (1989). Identification of stage-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun.* 57, 668-672.

Kasper, L. H, and Ware, P. L. (1985). Recognition and characterization of stage-specific oocyst/sporozoite antigens of *Toxoplasma gondii* by human antisera. *J. Clin. Invest.* 75, 1570-1577. doi: 10.1172/JCI111862

Kim, K., and Weiss, L. M. (2008). *Toxoplasma*: the next 100 years. *Microbes Infect.* 10, 978-984. doi: 10.1016/j.micinf.2008.07.015

Kotresha, D., and Noordin, R. (2010). Recombinant proteins in the diagnosis of toxoplasmosis. *APMIS.* 118, 529-542. doi: 10.1111/j.1600-0463.2010.02629.x.

Marcolino, P. T., Silva, D. A., Leser, P. G., Camargo, M. E., and Mineo, J. R. (2000). Molecular markers in acute and chronic phases of human toxoplasmosis: determination of immunoglobulin G avidity by Western blotting. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7, 384-389. doi: 10.1128/cdli.7.3.384-389.2000

Mineo, J. R., Camargo, M. E., and Ferreira, A.W. (1980). Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Toxoplasma gondii* polysaccharides in human toxoplasmosis. *Infect. Immun.* 27, 283-287.

Montoya, J. G., and Liesenfeld, O. (2004). Toxoplasmosis. *Lancet* 363, 1965-1976. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16412-X

Munoz-Zanzi, C., Tamayo, R., Balboa, J., and Hill, D. (2012). Detection of oocyst-associated toxoplasmosis in swine from southern Chile. *Zoonoses Public Health* 59, 389-392. doi: 10.1111/j.1863-2378.2012.01471.x

Pfreppe, K. I., Enders, G., Gohl, M., Krczal, D., Hlobil, H., Wassenberg, D., and Soutschek, E. (2005). Seroreactivity to and avidity for recombinant antigens in toxoplasmosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12, 977-982. doi: 10.1128/cdli.12.8.977-982.2005

Pietkiewicz, H., Hiszczyńska-Sawicka, E., Kur, J., Petersen, E., Nielsen, H. V., Stankiewicz, M., Andrzejewska, I., and Myjak, P. (2004). Usefulness of *Toxoplasma gondii*-specific recombinant antigens in serodiagnosis of human toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1779-1781. doi: 10.1007/s00436-006-0265-1

Pietkiewicz, H., Hiszczyńska-Sawicka, E., Kur, J., Petersen, E., Nielsen, H. V., Paul, M., Stankiewicz, M., and Myjak, P. (2007). Usefulness of *Toxoplasma gondii* recombinant antigens (GRA1, GRA7 and SAG1) in an immunoglobulin G avidity test for the serodiagnosis of toxoplasmosis. *Parasitol. Res.* 100, 333-337. doi: 10.1007/s00436-006-0265-1

Possenti, A., Cherchi, S., Bertuccini, L., Pozio, E., Dubey, J. P., and Spano, F. (2010). Molecular characterisation of a novel family of cysteine-rich proteins of *Toxoplasma gondii* and ultrastructural evidence of oocyst wall localisation. *Int. J. Parasitol.* 40, 1639-1649. doi: 10.1016/j.ijpara.2010.06.009.

Possenti, A., Fratini, F., Fantozzi, L., Pozio, E., Dubey, J. P., Ponzi, M., Pizzi, E., and Spano, F. (2013). Global proteomic analysis of the oocyst/sporozoite of *Toxoplasma gondii* reveals commitment to a host-independent lifestyle. *BMC Genomics.* 14, 183. doi: 10.1186/1471-2164-14-183.

Radke, J. R., Gubbels, M. J., Jerome, M. E., Radke, J. B., Striepen, B., and White, M. W. (2004). Identification of a sporozoite-specific member of the *Toxoplasma* SAG superfamily via genetic complementation. *Mol. Microbiol.* 52, 93-105. doi: 10.1111/j.1365-2958.2003.03967.x

Rawal, B. D. (1959). Toxoplasmosis; a dye-test survey on sera from vegetarians and meat eaters in Bombay. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 53, 61-63. doi: 10.1016/0035-9203(59)90084-7

Santana, S. S., Silva, D. A., Vaz, L. D., Pirovani, C. P., Barros, G. B., Lemos, E. M., Dietze, R., Mineo, J. R., and Cunha-Junior, J. P. (2012). Analysis of IgG subclasses (IgG1 and IgG3) to recombinant SAG2A protein from *Toxoplasma gondii* in sequential serum samples from patients with toxoplasmosis. *Immunol. Lett.* 143, 193-201. doi: 10.1016/j.imlet.2012.02.008

Schluter, D., Daubener, W., Schares, G., Gross, U., Pleyer, U., and Luder, C. (2014). Animals are key to human toxoplasmosis. *Int. J. Med. Microbiol.* 304, 917-929. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.09.002

Sharma, J. M., and Tizard, I. (1984). Avian cellular immune effector mechanisms - a review. *Avian Pathol.* 13, 357-376. doi: 10.1080/03079458408418541

Silva, D.A., Silva, N. M., Mineo, T. W., Pajuaba Neto, A. A., Ferro, E. A., and Mineo J. R. (2002). Heterologous antibodies to evaluate the kinetics of the humoral immune response in

dogs experimentally infected with *Toxoplasma gondii* RH strain. *Vet. Parasitol.* 107, 181-195. doi: 10.1016/S0304-4017(02) 00132-2

Sociedade Brasileira de Parasitologia. 2011. Surto de toxoplasmose na região central de Rondônia. <https://blogdeparasitologia.wordpress.com/2011/10/06/surto-de-toxoplasmose-na-regiao-central-de-rondonia>. Assessed July 3, 2015.

Sulzer, A. J., Franco, E. L., Takafuji, E., Benenson, M., Walls, K. W., and Greenup, R. L. (1986). An oocyst-transmitted outbreak of toxoplasmosis: patterns of immunoglobulin G and M over one year. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35, 290-296.

Tenter, A. M., Heckeroth, A. R., and Weiss, L. M. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int. J. Parasitol.* 30, 1217-1258. doi: 10.1016/S0020- 7519(00)00124-7

Tosini, F., Trasarti, E., and Pozio E. (2006). Apicomplexa genes involved in the host cell invasion: the Cpa135 protein family. *Parassitologia* 48, 105-107.

Trexler, M., Banyai, L., and Patthy, L. (2000). The LCCL module. *Eur. J. Biochem.* 267, 5751-5757. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01641.x

Zhao, G., Shen, B., Xie, Q., Xu, L. X., Yan, R. F., Song, X. K., Hassan, I. A., and Li, X. R. (2012). Detection of *Toxoplasma gondii* in free-range chickens in China based on circulating antigens and antibodies. *Vet. Parasitol.* 185, 72-77. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.10.031

Zhu, J., Yin, J., Xiao, Y., Jiang, N., Ankarlev, J., Lindh, J., and Chen, Q. (2008). A sero-epidemiological survey of *Toxoplasma gondii* infection in free-range and caged chickens in northeast China. *Vet. Parasitol.* 158, 360-363. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.09.024

## FIGURE LEGENDS

**FIGURE 1** - Serologic analysis of chicken sera using oocyst/sporozoite-specific proteins of *Toxoplasma gondii*. (A) Two recombinant proteins from *T. gondii* oocyst/sporozoite (CCp5A and OWP1) and whole tachyzoite soluble antigen (STAg) were tested by Western blot using serum samples from chickens immunized with STAg (left panel), experimentally infected with *T. gondii* tissue cysts (central panel) or naturally infected by oocysts (right panel). The arrowheads indicate the detected protein bands and the molecular weight markers (MW) are represented in kDa at the left side of left panel. Levels of IgY antibodies (B) and positivity (C) were evaluated using ELISA in serum samples from free range chickens collected in suburban areas of Uberlândia, MG, Brazil ( $n = 113$ ). The results were expressed as ELISA index (EI) and values higher than 1.2 were considered positive. The dashed line indicates the cut off of the reactions. Significant differences among IgY levels against recombinant proteins and STAg were determined by one-way ANOVA, while the differences among positivity rates were evaluated using Fisher's exact test.

**FIGURE 2** - Detection of anti-*Toxoplasma* antibodies in pig sera using the oocyst/sporozoite specific protein CCp5A. (A) The recombinant proteins CCp5A and OWP1 and STAg were tested by Western blot using serum samples from pigs experimentally infected with oocysts or tachyzoites. The arrowhead indicates the detected protein band and the molecular weight markers (MW) are represented in kDa at the left side of left panel. Kinetics of IgG production to *T. gondii* determined by ELISA using recombinant CCp5A (B) or STAg (C) in sera from pigs experimentally infected with oocysts (blank squares) or tachyzoites (black circles). (D) Levels of IgG antibodies and positivity rates were evaluated using ELISA in serum samples from free range pigs created in Piracaíba farm in Araguari, MG, Brazil. The results were expressed as ELISA index (EI) and values higher than 1.2 were considered positive. The dashed line indicates the cut off of the reactions. Significant differences between sources of infection were determined by the Student's *t*-test for each time point or Fisher's exact test to compare positivity rates. \* $P < 0.05$ .

**FIGURE 3** - Detection of anti-*Toxoplasma* antibodies in mouse sera using the oocyst/sporozoite-specific protein CCp5A. (A) The CCp5A recombinant protein and STAg were tested by Western blot using serum samples from mice experimentally infected with *T. gondii* oocysts or tissue cysts. The arrowhead indicated the detected protein bands and the molecular weight markers (MW) are represented in kDa at the left side of left panel. Kinetics of IgM (B,C) or IgG (D,E) production to recombinant CCp5A (B,D) or STAg (C,E) were determined by ELISA in sera from mice experimentally infected with oocysts at different time points after infection. The results were expressed as ELISA index (EI) and values higher than 1.2 were considered positive. Dashed line indicates the cut off of the reaction. Significant differences between day 0 and other time points were determined by paired Student's *t*-test in each time point. \* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.0001$ .

**FIGURE 4** - Reactivity of recombinant CCp5A with human sera from a toxoplasmosis outbreak. Recombinant CCp5A was used to screen human sera from patients involved in a waterborne toxoplasmosis outbreak or from pregnant women with anti-*T. gondii* IgG antibodies. The levels of IgM (A, B) of IgG (C, D) to recombinant CCp5A (A,C) or STAg (B,D) were evaluated by ELISA. The results were expressed as ELISA index (EI) and values higher than 1.2 were considered positive. Dashed line indicates the cut off of the reactions. Significant differences among serum samples levels were determined by Student's *t*-test. \*\*\* $P < 0.0001$ .

FIGURES

Figure 1

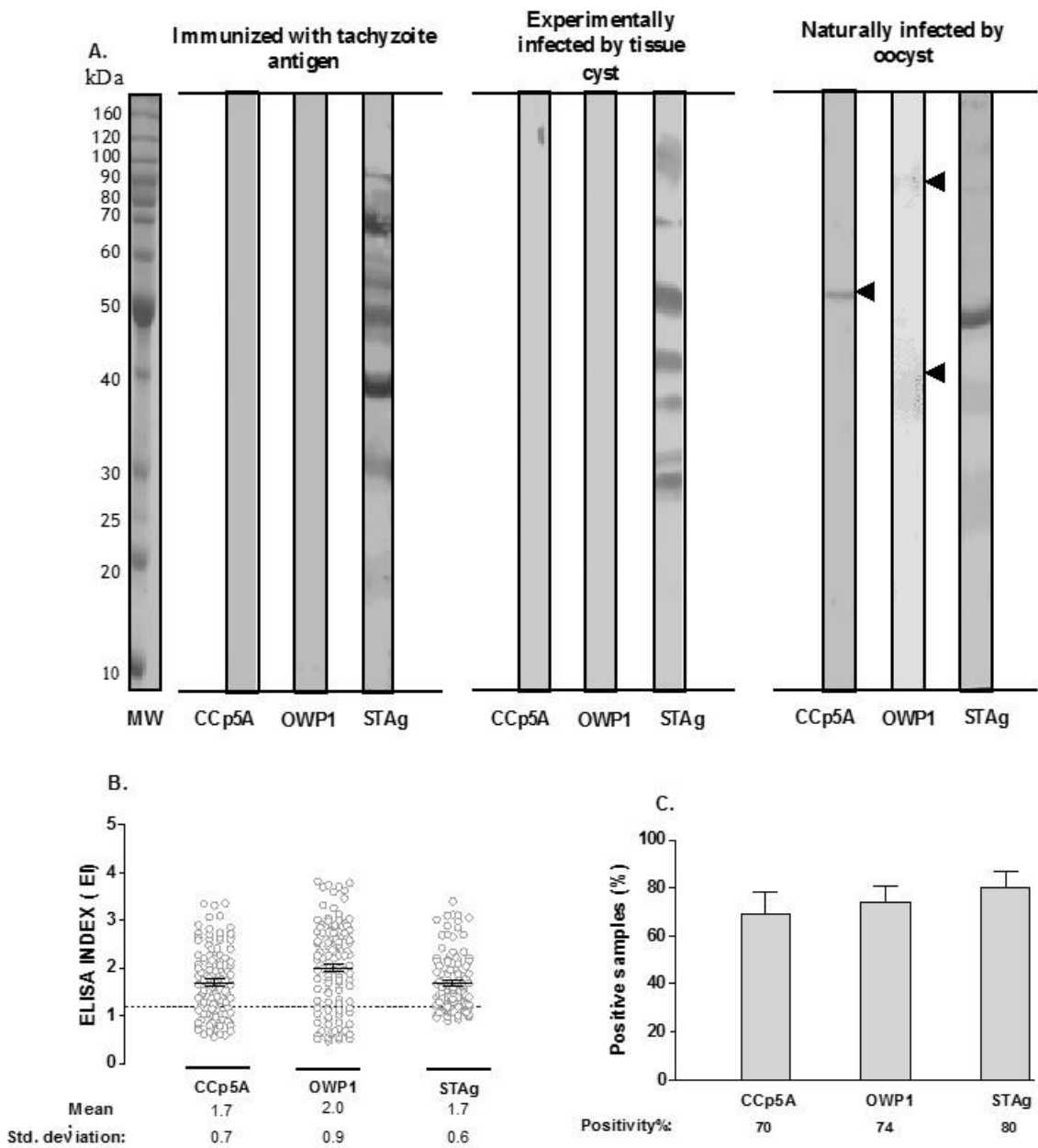




Figure 2

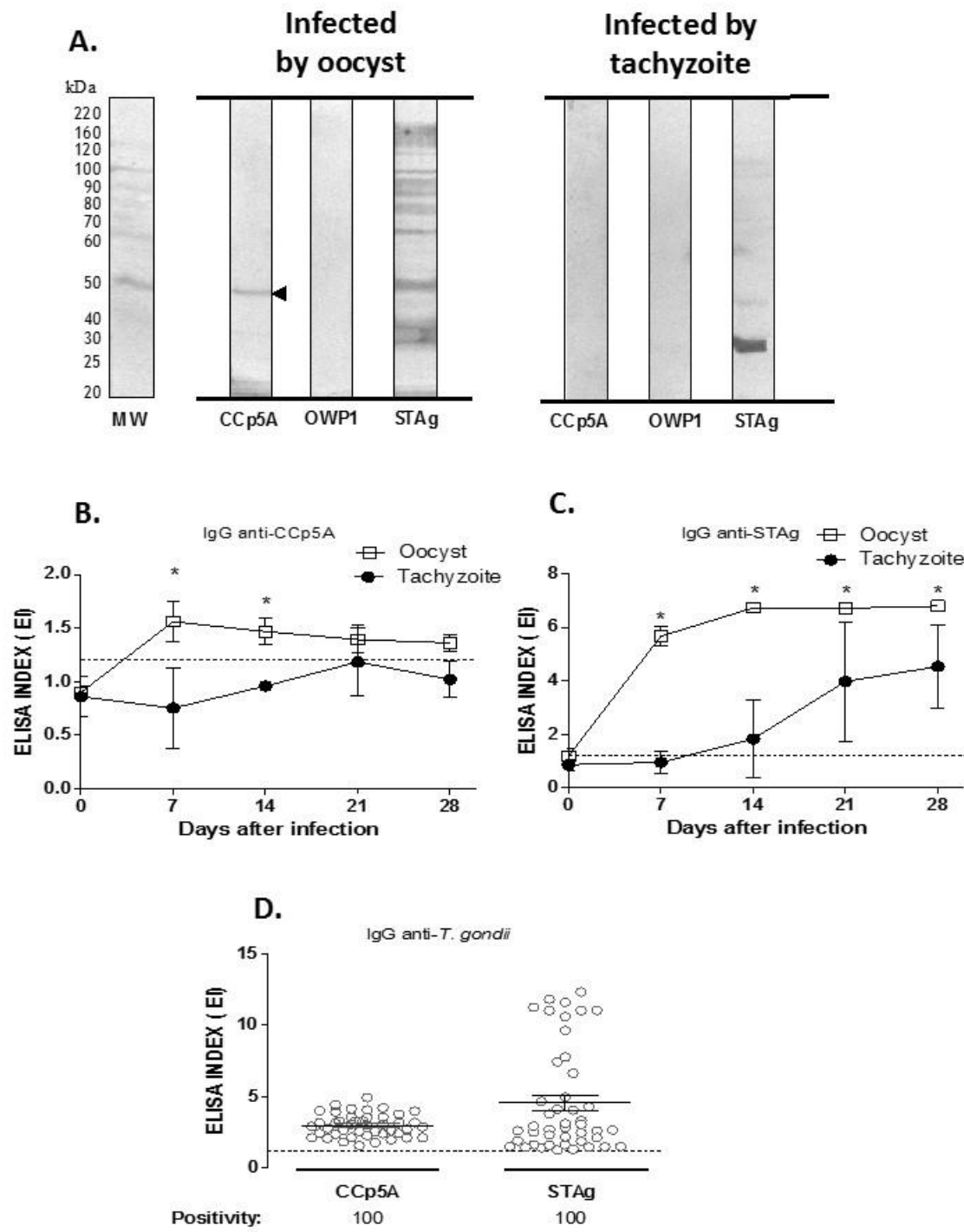


Figure 3

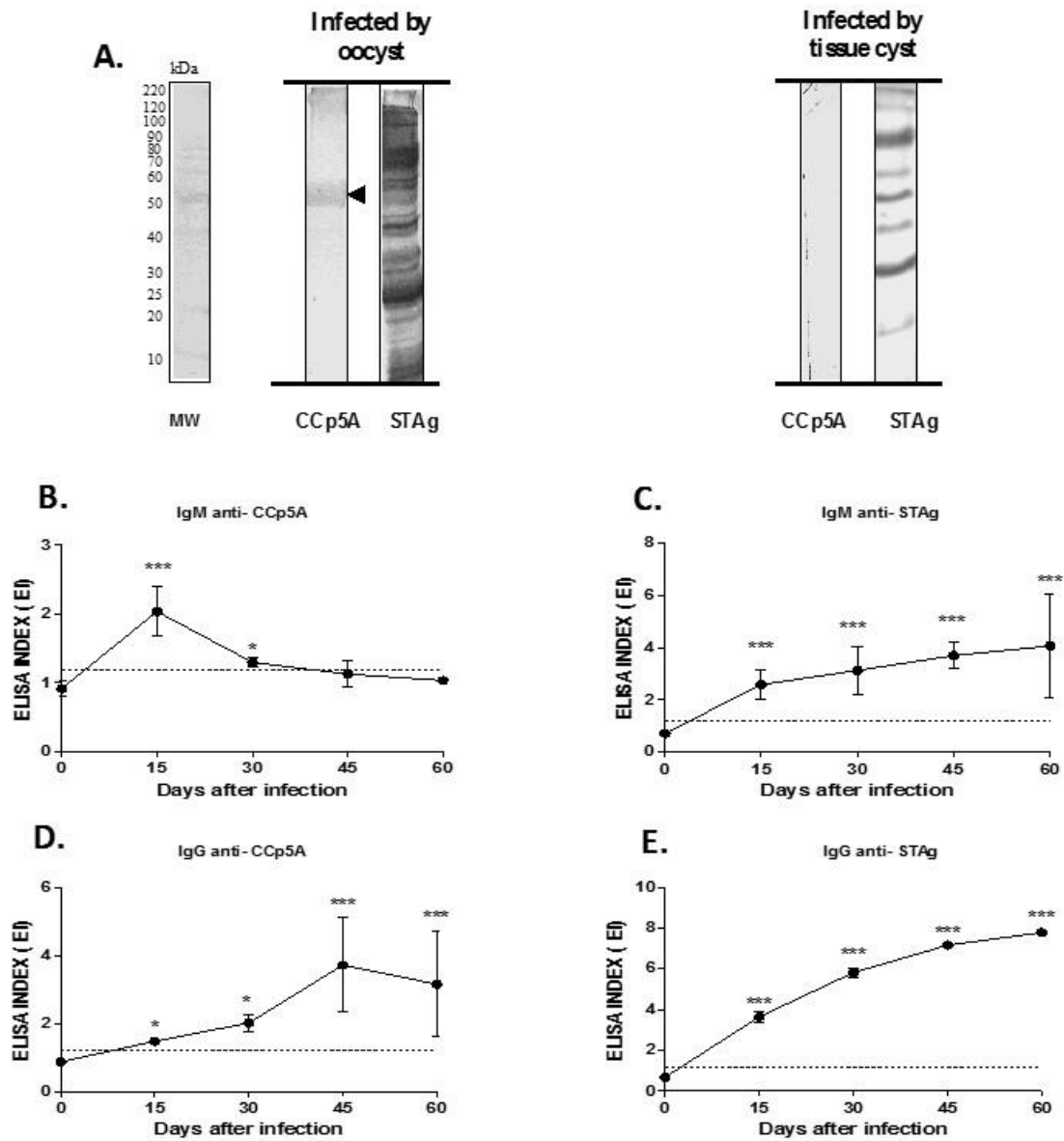
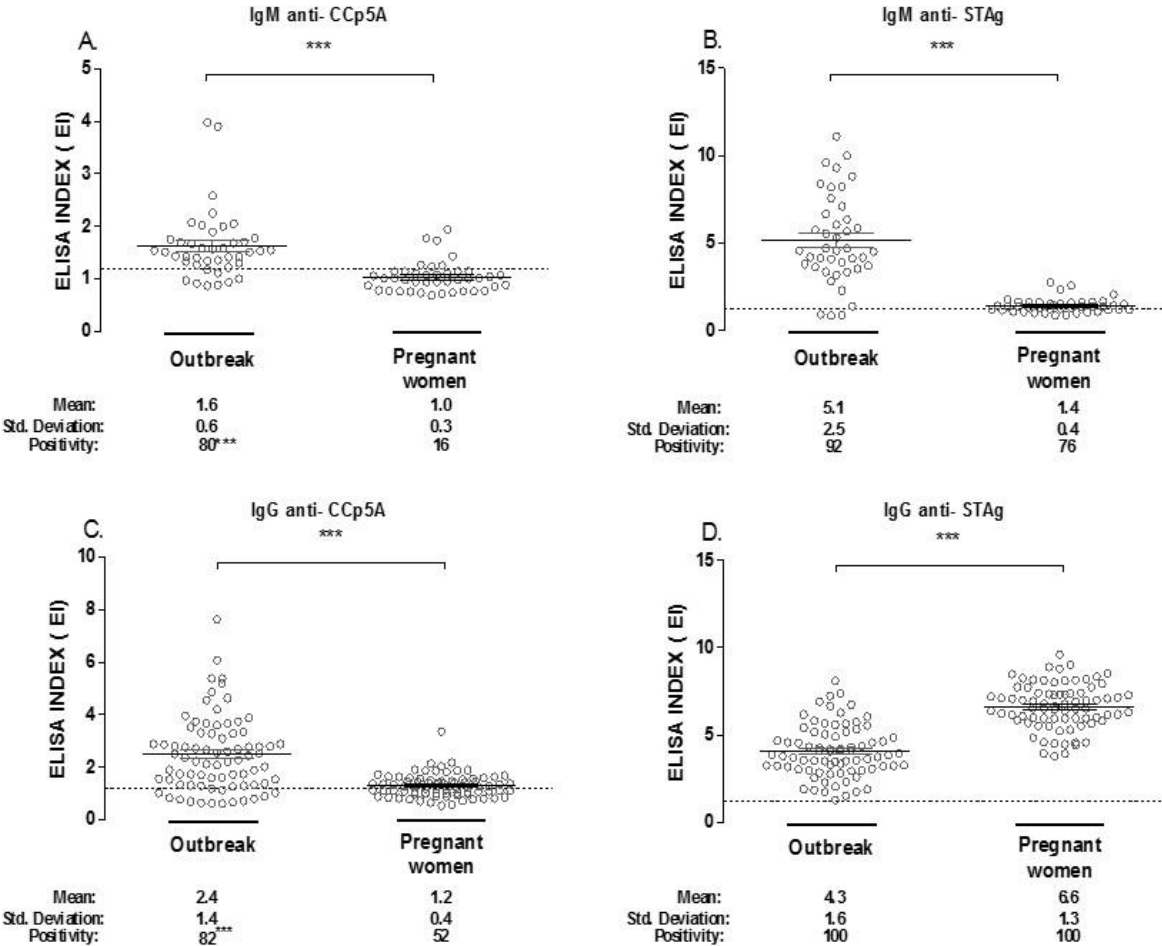


Figure 4



### *CAPÍTULO III*

*pMIC8: A new peptide with usefulness in serological tests to differentiate between recent and chronic infection by Toxoplasma gondii*

## Original Article

### **pMIC8: A new peptide with usefulness in serological tests to differentiate between recent and chronic infection by *Toxoplasma gondii*.**

Silas Silva Santana<sup>a</sup>, Vinícius Paiva Fernandes<sup>a</sup>, Fernando Reis Carvalho<sup>b</sup>, Ana Cláudia Arantes Marquez Pajuaba<sup>a</sup>, Luís Carlos Gebrim de Paula Costa<sup>a</sup>, Heber Leão Silva Barros<sup>a</sup>, Patrício Silva Cardoso Barros<sup>a</sup>, Geisa Baptista Barros<sup>c</sup>, Reynaldo Dietze<sup>c</sup>, Tiago Wilson Patriarca Mineo<sup>a</sup>, and José Roberto Mineo<sup>a\*</sup>.

<sup>a</sup> *Laboratory of Immunoparasitology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlândia, 38400-902 Uberlândia, MG, Brazil.*

<sup>b</sup> *Federal Institute of Education, Science and Technology of Goiás, Campus Itumbiara, Itumbiara, GO, 75524-010, Brazil.*

<sup>c</sup> *Infectious Disease Center, Federal University of Espírito Santo, 29040-091 Vitória, Espírito Santo, Brazil.*

**Running title:** pMIC8 as an acute phase marker

\* 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: 55-34-3225-8668. Fax: 55-34-3218-2333.

E-mail: [jrmineo@ufu.br](mailto:jrmineo@ufu.br).

## Abstract

The correct diagnosis of the acute infection in human toxoplasmosis is of great importance for effective therapy and reduction of severe consequences to the patient. The conventional diagnostic tests are not able to accurately distinguish recent from past infection. To address this problem, the diagnostic performance of a synthetic peptide derived from the Microneme 8 protein of *T. gondii* (pMIC8) was evaluated, in comparison with soluble *Toxoplasma* antigen (STAg), by indirect ELISA in a panel of human sera. Initially, the kinetics of IgG antibodies in mice experimentally infected with *T. gondii* were evaluated using pMIC8 and STAg, and the results showed a strong detection of IgG in the early phase of the infection by pMIC8, suggesting that this peptide could be a potential marker of recent infection. Moreover, immunoassays using pMIC8 and STAg were conducted to detect IgM, IgA and IgG antibodies in 124 human serum samples divided into five groups: group I (early acute infection; up to 4 months of infection; n=39); group II (intermediate acute infection; 5 to 8 months of infection; n=28); group III (late acute infection; 9 to 12 months of infection; n=29); group IV (chronic infection; over 12 months of infection; n=18); and group V (seronegative individuals; n=10). The detection of IgM and IgA antibodies to pMIC8 showed a better characterization of the time of *T. gondii* infection in sera from acute phase (up to 12 months of infection), and the detection of IgG antibodies to pMIC8 was higher in sera from early acute infection (group I) and lower in sera from chronic infection (group IV). On the other hand, the pattern was the opposite for IgG detection to STAg, which showed lower detection in sera from group I. To underline these differences, it was determined a ratio between ELISA index of IgG to STAg and pMIC8 (STAG/pMIC8 ratio), which presented more accurate role in serological differentiation of *T. gondii* infection. These findings suggest that pMIC8 is a potentially useful serologic marker to differentiate recently acquired infection with *T. gondii* from an infection acquired in the past.

## Introduction

*Toxoplasma gondii* is an intracellular protozoan parasite capable of infecting virtually all warm-blooded animals, including humans [1, 2]. Toxoplasmosis, the infection caused by *T. gondii*, is a widespread disease distributed worldwide which can cause severe consequences, depending on the infected species and aspects related to the host. In immunocompetent humans, the acute phase of the infection is usually asymptomatic and self-limited, although the individuals remain chronically infected lifelong. On the other hand, the clinical symptoms and sequelae of the infection can be devastating in immunocompromised individuals and in foetuses and newborns congenitally infected [3].

In this sense, the diagnosis of *T. gondii* infection is of great importance, especially in immunocompromised subjects and pregnant women, since the morbidity and/or mortality associated with toxoplasmosis are high in these groups, mainly in foetuses and newborns infected by transplacental passage of the parasite [4]. As the *T. gondii* infection is usually asymptomatic or associated with mild and nonspecific clinical symptoms in immunocompetent patients, its clinical diagnosis is difficult to perform. Thus, in order to overcome this problem, serological methods based on the detection of different classes of antibodies anti-*T. gondii* are widely used to diagnose this infection.

Furthermore, immunoassays are also used with the aim of accurately differentiate a primary infection (acute phase) of a chronic infection [5]. Thus, the detection of IgG antibodies to *T. gondii* associated with the absence of specific IgM and IgA antibodies constitutes a serological pattern suggestive of chronic infection. In contrast, the presence of IgG anti-*T. gondii* associated with the detection of specific IgM and IgA antibodies constitutes a serological pattern suggestive of acute phase. Additionally, the measurement of the avidity of IgG antibodies specific to *T. gondii* is a useful test to characterize the serological profile of the infection, although this test can be hampered, in some cases, by the delayed maturation of IgG avidity and the consequent persistence of low avidity IgG for a long time after infection [6].

In the laboratory routine, the serological differentiation between recent and chronic phases of *T. gondii* infection is difficult to achieve and is directly related to the type of antigen used in the available immunoassays. Most of the serological tests used to diagnose *T. gondii* infection make use of total soluble antigens derived from parasites collected from cell culture systems or obtained from previously inoculated mice. These preparations may lead to a high degree of inter-assay variation, mainly due to the presence of host antigens or to the lack of standardized methods of production. Furthermore, the preparations using total antigens show

no ability to appropriately differentiate stages of infection [7]. In this scenario, the development of new antigenic preparations for use in immunoassays is an essential step to improve the diagnosis of *T. gondii* infection, allowing the correct identification of individuals infected with the parasite and the differentiation between recent and chronic infections. This is particularly important for pregnant women and their fetuses/newborns, since congenital transmission of *T. gondii* is more likely to occur when the mother acquires a primary infection during or immediately before pregnancy.

In the recent years, a major effort have been made in order to replace the total antigen preparations for more homogeneous antigens in immunoassays to diagnose *T. gondii* infection. In many of these studies, it was evaluated the diagnostic performance of chimeric antigens, recombinant proteins or peptides derived from *T. gondii* proteins [8-10]. Among the antigenic options currently available, an elegant approach is the use of synthetic peptides produced from the amino acid sequences of B cell epitopes predicted by *in silico* analysis of *T. gondii* antigens. The use of synthetic peptides in serological tests has some advantages, such as the precise knowledge of the antigen composition, which is contamination-free, the standardization of methods and the lower costs of the procedures, when compared to those ones using total antigens. Besides, the properly selection of epitopes from antigens differentially expressed by the parasite during the acute or chronic phases could contribute to differentiate phases of infection [8, 10].

*T. gondii*, as a member of phylum Apicomplexa, presents specialised secretory organelles (micronemes, rhoptries and dense granules) that are responsible for the active infection of host cells. The microneme proteins (MIC) are directly responsible for the parasite adhesion and invasion of host cells [11, 12]. Among the MIC proteins, MIC8 was identified as an antigen expressed only by tachyzoite form (present in the acute phase of infection), and it was described as an essential factor in host cell invasion [11]. Thus, the identification of B cell epitopes from MIC8 protein would be useful for diagnostic purposes, mainly in the differentiation of phases of *T. gondii* infection.

In this study, it was evaluated the performance of a synthetic peptide derived from MIC8 (pMIC8), in comparison with soluble *Toxoplasma* antigen (STAg), in serological tests to differentiate the phases of *T. gondii* infection (recent and chronic) using serum samples from different serological profiles of the infection.



## Materials and Methods

### Production of pMIC8 and Soluble *Toxoplasma* Antigen (STAg)

Initially, the complete amino acid sequence of Microneme protein 8 (MIC8) from *T. gondii* was analysed using the B Cell Epitope Prediction resources available at the Immune Epitope Database and Analysis Resource (IEDB) (<http://www.iedb.org>) to identify the presence of linear B cell epitopes in this protein. A sequence of 15 amino acid residues (IPSAPAPPPSGGIWS) with higher prediction scores for linear B cell epitope was chosen as antigen epitope and used to design a peptide from MIC8 (pMIC8). So, based on this amino acid sequence, a peptide was chemically synthesized by GenScript USA Inc. (Piscataway, New Jersey, EUA), and conjugated to bovine serum albumin (BSA) by a cysteine insertion at the N-terminal amino acid.

The soluble *Toxoplasma* antigen (STAg) was produced as described in previous studies [7, 13]. Briefly, parasite suspensions were adjusted to  $1 \times 10^8$  tachyzoites/mL and submitted to freeze–thawing and sonication cycles in the presence of protease inhibitors. The preparation was centrifuged at 10.000 g for 30 min at 4 °C; the supernatants were collected, and aliquots were stored at -20 °C until used as STAg.

### Mouse serum samples

In order to analyse the antigenic behaviour of pMIC8, in comparison with STAg, 8-12 weeks old female Balb/c mice (n=5) were orally infected with 10 cysts/animal from ME49 strain of *T. gondii*. Serum samples from each animal were obtained on the day of infection (day 0) and 15, 30, 45, 60 and 90 days post-infection, and posteriorly tested against pMIC8 and STAg by indirect ELISA.

### Human serum samples

A total of 124 human serum samples were previously tested and characterized by conventional laboratory assays, and divided into five groups in accordance with time of infection and serological profile to *T. gondii* infection. Groups I (n=39), II (n=28) and III (n=29) consisted in serum samples sequentially collected from 13 patients attended at the Infectious Disease Center of the Federal University of Espirito Santo, Vitoria, ES, Brazil. These patients were characterized as recently infected with *T. gondii* (up to 12 months of infection), as defined

by the presence of at least two of the clinical signs compatible with the acute phase of toxoplasmosis (weakness, fever, enlarged cervical lymph nodes, headache, arthralgia), and according with serological evidence of recent infection characterized by the presence of IgM and/or IgG antibodies to *T. gondii* in conventional serological assays using a commercial kit (ELFA, VIDAS® Toxo IgM and IgG II, Biomérieux SA, Lyon, France).

All patients were longitudinally followed during 1 year after initial symptoms, so that serum samples were collected in sequence from each one and grouped based on the time interval (in months of infection) between the date of sample collection and the start of symptoms. Thus, group I consisted of 39 sera characterized as early acute phase (1-4 months of infection); group II consisted of 28 sera from intermediate acute phase (5-8 months of infection); and group III consisted of 29 sera from late acute phase (9-12 months of infection).

Group IV consisted of serum samples from 18 individuals with characteristics compatible with *T. gondii* infection acquired in the distant past (chronic profile - over 12 months of infection), as defined by the presence of asymptomatic infection, and positive results for IgG antibodies specific to *T. gondii* but negative results for specific IgM and IgA antibodies by ELISA.

Group V consisted of 10 serum samples from uninfected individuals, as defined by the absence of clinical symptoms related to toxoplasmosis and negative results for IgM, IgA, and IgG antibodies specific to *T. gondii* in the above-mentioned serological assays. These sera were used as negative controls of all reactions.

All serum samples from groups IV e V were obtained from patients who had been referred to the Infectious Diseases Clinic, Clinical Hospital of the Federal University of Uberlândia (UFU), Brazil. This study was approved by the Ethical Committee from this institution.

## ELISA

Indirect ELISA was performed to detect specific IgG antibodies in serum samples from mice previously infected with *T. gondii*, and IgM, IgA and IgG antibodies in human sera using pMIC8 or STAg as antigens. Briefly, high affinity polystyrene microtiter plates (Corning 3590 Laboratories Inc., New York, USA) were coated with STAg (10 µg/ml) in carbonate-bicarbonate buffer 0.06 M (pH 9.6) or pMIC8 (10 µg/ml) in phosphate buffer 0.2 M (pH 6.5), for 18 hours at 4°C. The plates were washed three times with PBS-T and blocked with PBS plus 0.05% Tween 20 (PBS-T) supplemented with 5% skimmed milk to STAg or 3% serum

albumin bovine (BSA) to pMIC8, for 1 hour at room temperature. Subsequently, plates were incubated with serum samples from infected mouse or human serum samples, diluted 1:50 in duplicate, for 1 h at 37°C. After washing with PBS-T, plates were incubated for 1 h at 37°C with peroxidase-labeled goat anti-mouse IgG (1:1000) or peroxidase-labeled goat anti-human IgM (1:500) or peroxidase-labeled goat anti-human IgA (1:500) or peroxidase-labeled goat anti-human IgG (1:1000), both from Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA. After the washing process, the assays were revealed by adding the enzyme substrate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and chromogen 2,2'-azino-bis-3-ethyl-benzothiazoline sulfonic acid (ABTS) in 0.07 M citrate phosphate buffer, pH 4.2 (ABTS Peroxidase Substrate System; KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, Maryland, USA). The optical density (OD) was read at 405 nm in a plate reader (Titertek Multiskan Plus spectrophotometer, Flow Laboratories, McLean, USA). The cut off point of the reaction was calculated as the mean OD of negative control sera plus 3 standard deviations. Antibody titers were expressed as ELISA index (EI), according to the following formula:  $EI = OD \text{ sample} / OD \text{ cut off}$ , as described elsewhere [14]. Samples with EI values  $\geq 1.2$  were considered positive.

### Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism v. 5.0 (GraphPad Software, San Diego, USA). Antibody levels were compared between the groups using one-way ANOVA with Bonferroni post-test. Student's t test (two-tailed) was used to assess differences in levels of antibodies. Positivity rates for antigens were analysed by the Fisher's exact test. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

## Results

### Kinetics of IgG antibodies to pMIC8 and STAg in mice experimentally infected with *T. gondii*

In this study, it was evaluated the kinetics of specific IgG production in mice experimentally infected with *T. gondii* (ME49 strain) by ELISA using pMIC8 in comparison with STAg. As shown in Fig. 1, the kinetics of IgG towards pMIC8 and STAg presented different profiles. Remarkably, the kinetics of IgG antibodies to pMIC8 was crescent from day 0 until the days 15 (EI= 2.6) and 30 (EI= 2.5) post-infection, when it reached the peak of reactivity, with significant differences between day 0 and days 15 or 30 (\*\* $p < 0.0001$ ). After

day 30 post-infection, the kinetics of IgG antibodies showed a descending behaviour over the time, with EI values of 1.9 at day 60 and 1.5 at day 90. Also, significant differences between day 0 and days 60 or 90 ( $*p < 0.05$ ) were observed (Fig. 1a). In contrast, the kinetics of IgG antibodies to STAg increased over time, with the highest levels reached at day 90 post-infection (EI= 9.1) (Fig. 1b). Significant differences between the IgG levels on day 0 and the ones in other days post-infection were observed ( $***p < 0.0001$ ). Thus, the kinetics of IgG detection to pMIC8 in mice experimentally infected with *T. gondii* suggests that this molecule is more strongly detected and associated with the early stage of *T. gondii* infection. On the other hand, ELISA using STAg showed a higher detection of specific IgG in sera from a late phase of the experimental infection in mice.

### **Detection of human IgM and IgA antibodies specific to *T. gondii* using pMIC8 or STAg**

At first, to investigate whether pMIC8 could be a useful marker to detect the early stages of *T. gondii* infection in humans, the levels of IgM and IgA antibodies to pMIC8 were evaluated, in comparison with STAg, in 124 serum samples from five different groups, divided according to serological profile of infection, as described in Materials and Methods. As shown in Fig. 2a, the highest reactivity of IgM antibodies to pMIC8 was observed in the group I (EI=2.7), with significant differences to groups II (EI=1.9;  $*p < 0.05$ ), III (EI=1.6;  $***p < 0.0001$ ) and IV (EI=0.8;  $***p < 0.0001$ ). Also, sera of the group II presented higher IgM levels than the sera of group IV ( $*p < 0.05$ ). In similar way, the positivity rate for IgM antibodies was highest to group I (97%) when compared with groups II (71%), III (62%) and IV (0 %) ( $*p < 0.05$ ). Furthermore, sera from groups II and III presented higher positivity rates when compared to sera from group IV ( $*p < 0.05$ ). On the other hand, when analysing IgM antibodies to STAg, no statistical differences were observed between IgM levels in the sera from groups up to 12 months of infection (groups I, II and III), although all of them had shown higher antibody levels than sera from group IV ( $***p < 0.0001$ ) (Fig. 2b). The percentage of positive sera for IgM antibodies to STAg on the groups I, II, III and IV was, respectively, 100, 86, 79 and 0 %. Significant differences in positivity rates for IgM to STAg were similar to those observed with pMIC8 (Fig. 2b).

Next, it was evaluated the IgA antibodies to pMIC8 and STAg in the five groups of human sera. When analysing the antibody levels and positivity rates for specific IgA to pMIC8 (Fig. 2c), sera of group I presented higher antibody levels (EI=1.7) and positivity rate (77%) than sera from the other groups, with significant differences for groups III (EI=1.2;  $*p < 0.05$ ;

48% of positive sera) and IV (EI=0.8; \*\*\* $p<0.0001$ ; no positive serum). Furthermore, sera from groups II (EI=1.4; 61% of positive sera) and III presented higher IgA levels than sera from group IV (\*\* $p<0.001$ ). Regarding the results for IgA to STAg, there was no significant differences in antibody levels and positivity rates between the sera from groups of patients presenting acute infection (up to 12 months of infection; groups I, II and III), although both groups had presented higher levels of IgA than sera from group IV (\*\*\* $p<0.0001$ ) (Fig. 2d). Sera from group V (seronegative individuals) were used as negative controls to determine the cut off values of the reactions using STAg and pMIC8. As expected, none of these sera presented values of EI above the cut off point for both IgM and IgA antibodies to STAg and pMIC8, respectively.

Altogether, these results indicate that the detection of IgM and IgA antibodies to pMIC8 showed a better characterization of the time of *T. gondii* infection between human serum samples from acute phase (up to 12 months of infection; groups I, II and III) in comparison with the detection of these antibody isotypes to STAg, while the results between pMIC8 and STAg for both antibody isotypes were very similar for sera from chronic phase of infection.

### **Detection of human IgG antibodies and utilization of a ratio between IgG values for STAg and pMIC8 in the differentiation of serological profile of *T. gondii* infection**

Next, in order to investigate the potential detection of IgG antibodies by using pMIC8 to discriminate early infection with *T. gondii*, the antibody levels and positivity rates of IgG to pMIC8, in comparison with STAg, were evaluated in the five groups of human serum samples. Notably, the detection of IgG antibodies to pMIC8 showed a differentiate profile when compared to STAg (Fig. 3). As shown in Fig. 3a, the highest levels of IgG antibodies to pMIC8 were detected in the group I (EI=3.0), when compared with groups II (EI=2.1; \* $p<0.05$ ), III (EI=1.8; \*\*\* $p<0.0001$ ) and IV (EI=0.9; \*\*\* $p<0.0001$ ). In addition, groups II and III showed higher antibody levels when compared to group IV (\*\* $p<0.001$ ; \*\*\* $p<0.0001$ ). The percentages of positive sera for IgG antibodies to pMIC8 were very similar between the groups I (97%), II (96%) and III (90%), without significant differences between them. However, all these groups showed significant differences in the positivity rates in comparison with the one found in group IV (11%; \*\*\* $p<0.0001$ ).

Conversely, the serological profile of IgG antibodies to STAg was the opposite of the observed with pMIC8 (Fig. 3b). The highest levels of IgG antibodies to STAg were found in the groups II (EI=5.1), III (EI=5.3) and IV (EI=5.4), without significant differences among

them, while the group I (EI=3.8) presented the lowest levels of IgG to STAg in comparison with the groups I, II and III ( $***p < 0.0001$ ). The percentages of positive sera for IgG antibodies to STAg was 100% to all analysed groups. As observed for IgM and IgA antibodies, all sera of group V presented negative results for IgG antibodies to both pMIC8 and STAg.

Given the marked difference observed in the serological profile of IgG detection using STAg and pMIC8, we designed a ratio between IgG values found for STAg and pMIC8 (STAg / pMIC8) (Fig. 3c), which underlines the differences in the serological profiles for IgG between the groups I, II, III and IV. The ranges of IgG detection for each group were calculated taking into account the mean values of IgG to STAg and pMIC8 (STAg/pMIC8) and the percentage of sera located in each range. Thus, in the group I the majority of sera (87%) presented results below the ratio STAg/pMIC8 of 2.0. On the other hand, the majority of sera of groups II (64%) and III (72%) presented results of the ratio STAg/pMIC8 between 2.0 and 4.0, while the majority of sera of group IV (94%) presented a ratio above 4.0. Thus, the ratio STAg/pMIC8 for IgG antibodies showed better results in the discrimination of sera from groups I and IV, respectively. In relation to the mean values of the ratio STAg/pMIC8, the highest result was found in the group IV (6.2), with significant differences to groups I (1.3;  $***p < 0.0001$ ), II (2.5;  $***p < 0.0001$ ) and III (3.0;  $**p < 0.001$ ), while the lowest result was found in the group I (1.3), with significant differences to groups II and III ( $***p < 0.0001$ ), that presented intermediate results.

### **Algorithm of serological differentiation of infection phases using the ratio STAg/pMIC8**

In the light of our results, we propose an algorithm for the serological differentiation of the phases in *T. gondii* infection using the ratio between IgG results to STAg and pMIC8 (ratio STAg/pMIC8) (Fig. 4). In our proposal, a serum sample of a patient with suspected *T. gondii* infection would be tested by conventional methods (detection of IgG using STAg) and by the new method here described (detection of IgG using pMIC8). In order to better define the serological profile of patients infected with *T. gondii*, the values of the ratio STAg/pMIC8 could be analysed as a new parameter in the serodiagnosis of toxoplasmosis. Thus, when the ratio STAg/pMIC8 is below 2.0, the possible serological profile would be early acute phase (1-4 months of infection). Ratio STAg/pMIC8 between 2.0 and 4.0 would be suggestive of intermediate (5-8 months of infection) or late acute phase (9-12 months of infection). The chronic phase (over 12 months of infection) would be characterized in patients with ratio STAg/pMIC8 above 4.0.

## Discussion

The time estimation of *T. gondii* infection is of great importance, mainly in pregnant women, since that the accurate diagnosis could allow correct medical conduct during pregnancy, like the indication of specific treatment, amniocentesis, or serological and ultrasonographic follow-up [15]. Up to date, the routine tests to diagnose the infection cannot properly distinguish primary and recent infection from past infection (chronic) [8]. In this context, the identification of human immunodominant B cell epitopes within the main *T. gondii* antigens would be useful to design new immunoassays with the ability of differentiation of the infection phases [16].

Microneme proteins are interesting candidates in studies with human B cell epitopes, since they play important roles in the early phases of the parasite invasion in the host cells [12]. Previous studies in which the MIC8 protein was blocked have shown that the host cell invasion by *T. gondii* was abrogated due to parasite incapability to form the moving junction [11, 12]. In another study, MIC8 was used as a vaccine candidate and triggered significant humoral and cellular responses, demonstrating that microneme proteins have high immunogenicity [17]. To our knowledge, there is no study evaluating the applicability of MIC8 protein in the serodiagnosis of toxoplasmosis.

Therefore, we conducted a study to assess the performance of a peptide derived from a linear B cell epitope of MIC8 protein (pMIC8), in comparison with soluble *Toxoplasma* antigen (STAg), in the diagnosis of *T. gondii* infection and differentiation of the infection phases (acute from chronic phase).

First, we evaluated the kinetics of IgG antibodies to pMIC8 and STAg in a murine model of infection. In this model, the IgG reactivity to pMIC8 reached a peak in the early phase of infection (days 15 and 30 post-infection), suggesting that this peptide is preferentially recognized in the acute phase of *T. gondii* infection. In a similar study, a MAG1 recombinant protein was tested against sera from mice acutely or chronically infected with *T. gondii*, and there was no difference between the levels of IgG antibodies detected in both groups [18]. These different results may be due the differential protein expression by *T. gondii*, since MIC8 is expressed only in tachyzoites while MAG1 is expressed in bradyzoites in cysts. On the other hand, the highest IgG levels to STAg were observed in the late phase of the murine infection. This distinct profile can be explained by the fact that pMIC8 is a single molecule and it is originally expressed only by the tachyzoite form (present in the acute disease), while the serological profile of IgG antibodies to STAg is dependent of the sum of the individual

reactivity of each parasitic antigen contained in this antigenic preparation. Thus, it is expected that the reactivity of IgG antibodies to STAg, which contains a large number of antigens and epitopes, is higher and increasing during infection than the reactivity to a single epitope expressed in the early phases of infection. This way, pMIC8 can be considered an early marker of infection in mice.

To confirm if pMIC8 could be considered an acute phase marker of human toxoplasmosis, we initially evaluated the detection of IgM and IgA antibodies in human sera with a well-characterized serological profile, as defined by conventional serological methods. The pattern of differentiation in sera from patients with recent infection (up to 12 months of infection) for IgM and IgA antibodies was better characterized using pMIC8 than using STAg. This differentiation achieved with pMIC8 could be important to clarify the discrimination between early acute infection from a past infection (more than 12 months of infection). In our study, the IgM and IgA antibodies to pMIC8 presented lower antibody levels and positivity rates in sera from late acute phase (group III) when compared with sera from early acute phase (group I). Like seen in our results and in another studies [8, 19, 20], the IgM and IgA antibodies against total *T. gondii* antigens can persist beyond 6 months of infection, making these antibodies less suitable to differentiate time of infection. As expected, the group with chronic infection (group IV) showed negative results for IgM and IgA antibodies for both pMIC8 and STAg. Thus, only pMIC8 was able to differentiate the serological profiles in sera from patients with recent infection (up to 12 months of infection), while in sera from past infection (more than 12 months of infection), the serological differentiation was accomplished with pMIC8 and STAg.

The most striking finding in our study was the differentiated profile of IgG reactivity in the groups analysed using pMIC8, when compared with STAg. So, the highest detection of IgG antibodies to pMIC8 in sera from early acute phase (1-4 months of infection) and the lowest detection of IgG antibodies to STAg in this same group, when compared with the detection in all other groups, reinforces that pMIC8 is an acute phase marker. Notably, in the group of sera from chronic infection (group IV), the detection of IgG antibodies was the minimum to pMIC8 and the maximum to STAg. Altogether, our results suggests that immunoassays utilizing pMIC8 as antigen can help distinguish acute from chronic phase of *T. gondii* infection. The great problem in the routine diagnosis of *T. gondii* infection by the detection of IgG antibodies is the persistence of these antibody isotypes lifelong, making difficult the differentiation between recent infection and past infection [6, 21]. In order to evaluate the available strategies in serodiagnosis of toxoplasmosis, a multicentric study was performed with 20 assays based on



the detection of anti-*Toxoplasma* antibodies and 195 different combinations [22] using serum samples from acute infection (samples from patients who presented seroconversion within 3 months), convalescent infection (samples from patients who presented seroconversion within 3-12 months) and past infection (samples from patients who had seroconversion above 12 months of infection). In this study, none of the assays or assay combinations could accurately distinguish recent infection from past infection. On the other hand, in our study pMIC8 showed characteristics of a serological marker that could differentiate acute infection from past infection.

Other investigators have demonstrated in previous studies that IgG antibodies from acute phase react more strongly with proteins from tachyzoites [8, 23, 24]. The same phenomenon was observed in our study for mouse and human IgG antibodies specific to pMIC8 found in serum samples from different serological profiles of *T. gondii* infection. Thus, immunoassays using pMIC8 could allow a more precise estimation of the time of infection in human toxoplasmosis.

In order to present a practical applicability of IgG detection in human sera using pMIC8, we propose the construction of a ratio between the ELISA index of IgG to STAg and pMIC8 and we developed an algorithm to help better discriminate the phases of *T. gondii* infection. Thus, the values of the ratio STAg/pMIC8 were lower in sera from group I, since the results of IgG detection for STAg and pMIC8 were similar in this group. On the other groups, the values of IgG to STAg increased over the time of infection, while the values to pMIC8 have dropped, with a consequent increase in the ratio STAg/pMIC8. By the utilization of this ratio, the patients infected with *T. gondii* can be divided in three groups, according to the phase of infection: early acute infection, intermediate or late acute infection, and chronic infection. Thus, the correct discrimination of the infection phase in pregnant women could reduce the need of invasive diagnostic methods (like amniocentesis) and the prescription of unnecessary treatment.

In conclusion, we identified a peptide from Microneme 8 protein (pMIC8) of *T. gondii* that showed to be effective in distinguishing acute from chronic toxoplasmosis. Also, the ratio between IgG levels to STAg and pMIC8 (ratio STAg/pMIC8) can be an important parameter to estimate the time of *T. gondii* infection, helping to clarify the diagnostic status in patients with toxoplasmosis.

## **Acknowledgments**

This work was supported by Brazilian Research Agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG); and Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## References

- 1 Dubey JP. The history of *Toxoplasma gondii*--the first 100 years. *J Eukaryot Microbiol.* 2008; 55: 467-475.
- 2 Saadatnia G, Golkar M. A review on human toxoplasmosis. *Scand J Infect Dis.* 2012; 44: 805-814.
- 3 Dubey JP. Toxoplasmosis--an overview. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1991; 22 Suppl: 88-92.
- 4 Lappalainen M, Koskela P, Koskiniemi M, et al. Toxoplasmosis acquired during pregnancy: Improved serodiagnosis based on avidity of IgG. *J Infect Dis.* 1993; 167: 691-697.
- 5 Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet.* 2004; 363: 1965-1976.
- 6 Montoya JG. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. *J Infect Dis.* 2002; 185 (Suppl 1): S73-82.
- 7 Santana SS, Silva DA, Vaz LD, et al. Analysis of IgG subclasses (IgG1 and IgG3) to recombinant SAG2A protein from *Toxoplasma gondii* in sequential serum samples from patients with toxoplasmosis. *Immunol Lett.* 2012; 143: 193-201.
- 8 Aubert D, Maine GT, Villena I, et al. Recombinant antigens to detect *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G and immunoglobulin M in human sera by enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 1144-1150.
- 9 Murray A, Mercier C, Decoster A, Lecordier L, Capron A, Cesbron-Delauw MF. Multiple b-cell epitopes in a recombinant GRA2 secreted antigen of *Toxoplasma gondii*. *Appl Parasitol.* 1993; 34: 235-244.
- 10 Liu L, Liu T, Yu L, et al. rROP2 (186-533): A novel peptide antigen for detection of IgM antibodies against *Toxoplasma gondii*. *Foodborne Pathog Dis.* 2012; 9: 7-12.
- 11 Kessler H, Herm-Gotz A, Hegge S, et al. Microneme protein 8--a new essential invasion factor in *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci.* 2008; 121: 947-956.
- 12 Meissner M, Reiss M, Viebig N, et al. A family of transmembrane microneme proteins of *Toxoplasma gondii* contain egf-like domains and function as escorts. *J Cell Sci.* 2002; 115: 563-574.
- 13 Bela SR, Oliveira Silva DA, Cunha-Junior JP, 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: 245-254.

- 14 Silva DA, Silva NM, Mineo TW, Pajuaba Neto AA, Ferro EA, Mineo JR. Heterologous antibodies to evaluate the kinetics of the humoral immune response in dogs experimentally infected with *Toxoplasma gondii* RH strain. *Vet Parasitol.* 2002; 107: 181-195.
- 15 Elyasi H, Babaie J, Fricker-Hidalgo H, et al. Use of dense granule antigen GRA6 in an immunoglobulin G avidity test to exclude acute *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin Vaccine Immunol.* 2010; 17: 1349-1355.
- 16 Beghetto E, Pucci A, Minenkova O, et al. Identification of a human immunodominant b-cell epitope within the GRA1 antigen of *Toxoplasma gondii* by phage display of cDNA libraries. *Int J Parasitol.* 2001; 31: 1659-1668.
- 17 Liu MM, Yuan ZG, Peng GH, et al. *Toxoplasma gondii* microneme protein 8 (MIC8) is a potential vaccine candidate against toxoplasmosis. *Parasitol Res.* 2010; 106: 1079-1084.
- 18 Gatkowska JM, Dziadek B, Dziadek J, Dzitko K, Dlugonska H. Recombinant MAG1 protein of *Toxoplasma gondii* as a diagnostic antigen. *Pol J Microbiol.* 2015; 64: 55-59.
- 19 Martin V, Arcavi M, Santillan G, et al. Detection of human *Toxoplasma*-specific immunoglobulins A, M, and G with a recombinant *Toxoplasma gondii* ROP2 protein. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1998; 5: 627-631.
- 20 Francis JM, Joynson DH. Duration of specific immunoglobulin A antibody following acute toxoplasmosis as determined by enzyme immunoassay and immunosorbent agglutination assay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1993; 12: 556-559.
- 21 Remington JS, Thulliez P, Montoya JG. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 941-945.
- 22 Roberts A, Hedman K, Luyasu V, et al. Multicenter evaluation of strategies for serodiagnosis of primary infection with *Toxoplasma gondii*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2001; 20: 467-474.
- 23 Holec-Gasior L, Kur J, Hyszczynska-Sawicka E. GRA2 and ROP1 recombinant antigens as potential markers for detection of *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G in humans with acute toxoplasmosis. *Clin Vaccine Immunol.* 2009; 16: 510-514.
- 24 Li S, Maine G, Suzuki Y, et al. Serodiagnosis of recently acquired *Toxoplasma gondii* infection with a recombinant antigen. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 179-184.

## FIGURES CAPTIONS

**FIG. 1.** Kinetics of IgG antibodies in serum samples from mice infected with *Toxoplasma gondii* using pMIC8 (a) or soluble *Toxoplasma* antigen (STAg) (b). Balb/c mice (n=5) were orally infected with 10 tissue cysts of *T. gondii* (ME49 strain) and serum samples collected from each animal on days 0, 15, 30, 45, 60, 75 and 90 after infection were analysed by indirect ELISA to detect IgG specific antibodies. The results were expressed as ELISA index (EI) and values higher than 1.2 were considered positive. The dashed line indicates the cut off value of the reactions. Significant differences between day 0 and the other time points after infection were determined by paired Student's *t* test in each time point. \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.0001$ .

**FIG. 2.** Immunoreactivity of IgM and IgA antibodies to pMIC8 or soluble *Toxoplasma* antigen (STAg) in human sera of different serological profiles and times of infection with *Toxoplasma gondii*. The antibody levels and positivity rates for IgM (a, b) and IgA antibodies (c, d) to *T. gondii* were evaluated by indirect ELISA using pMIC8 (a, c) or STAg (b, d). A total of 124 serum samples were divided into five groups according to serological profile of *T. gondii* infection: group I (early acute phase; n=39), group II (intermediate acute phase; n=28), group III (late acute phase; n=29), group IV (chronic phase; n=18), and group V (seronegative individuals; n=10). The results were expressed as ELISA index (EI) and values higher than 1.2 were considered positive. Dashed line indicates the cut off value of the reactions. Significant differences among the levels of IgM and IgA antibodies between the groups for each antigen were determined by one-way Anova, while the differences among positivity rates were evaluated by Fisher's exact test. Different letters (a–c) indicate statistically significant differences (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$ ; \*\*\* $p < 0.0001$ ).

**FIG. 3.** Immunoreactivity of IgG antibodies to pMIC8 or soluble *Toxoplasma* antigen (STAg) in human sera of different serological profiles and times of infection with *Toxoplasma gondii*. The antibody levels and positivity rates for IgG antibodies to *T. gondii* were evaluated by indirect ELISA using pMIC8 (a) or STAg (b), and the ratio between the values for IgG to STAg and pMIC8 (Ratio STAg/pMIC8) were also evaluated (c). A total of 124 serum samples were divided into five groups according to serological profile of *T. gondii* infection: group I (early acute phase; n=39), group II (intermediate acute phase; n=28), group III (late acute phase; n=29), group IV (chronic phase; n=18), and group V (seronegative individuals; n=10). The results were expressed as ELISA index (EI) and values higher than 1.2 were considered

positive. For IgG antibodies, dashed line indicates the cut off value of the reactions. For ratio STAg/pMIC8, the inner line in the box shows the mean levels and the bars represent the minimum and maximum values. The dashed lines (2.0 and 4.0) indicate the ranges (ratio < 2.0; 2.0 < ratio < 4.0; and ratio > 4.0) of the ratio STAg/pMIC8 for the majority of sera from each group. Significant differences among levels of IgG antibodies between the groups for each antigen were determined by one-way Anova, while the differences among positivity rates were evaluated by Fisher's exact test. Different letters (a–b) indicate statistically significant differences (\*p < 0.05; \*\*p < 0.001; \*\*\*p < 0.0001).

**FIG. 4.** Algorithm proposed for serological differentiation of the *Toxoplasma gondii* infection using the ratio between the levels of IgG antibodies to STAg and pMIC8 with the aim to identify the serological profile (acute or chronic phase) of patients with suspected toxoplasmosis.

FIGURES

Figure 1

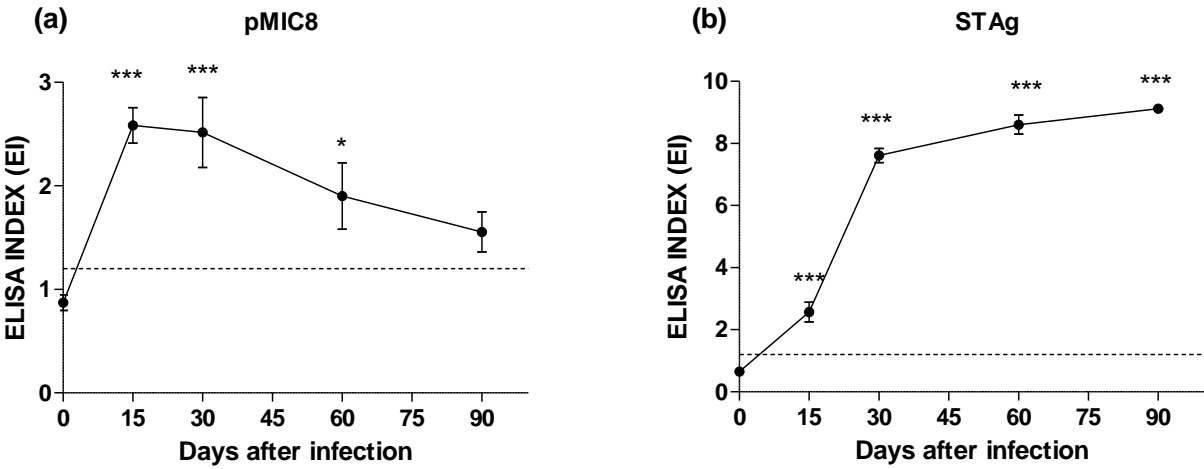


Figure 2

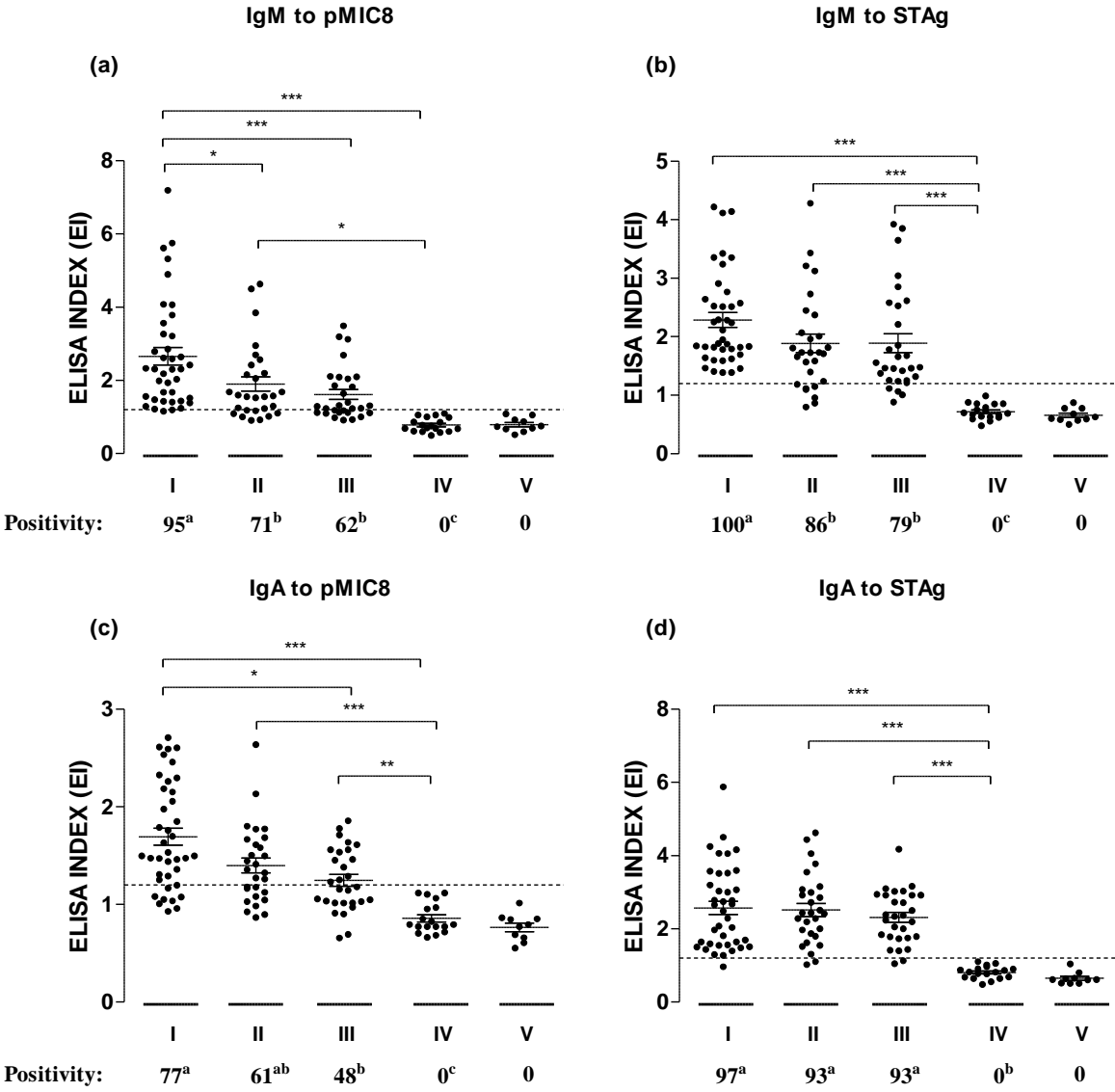
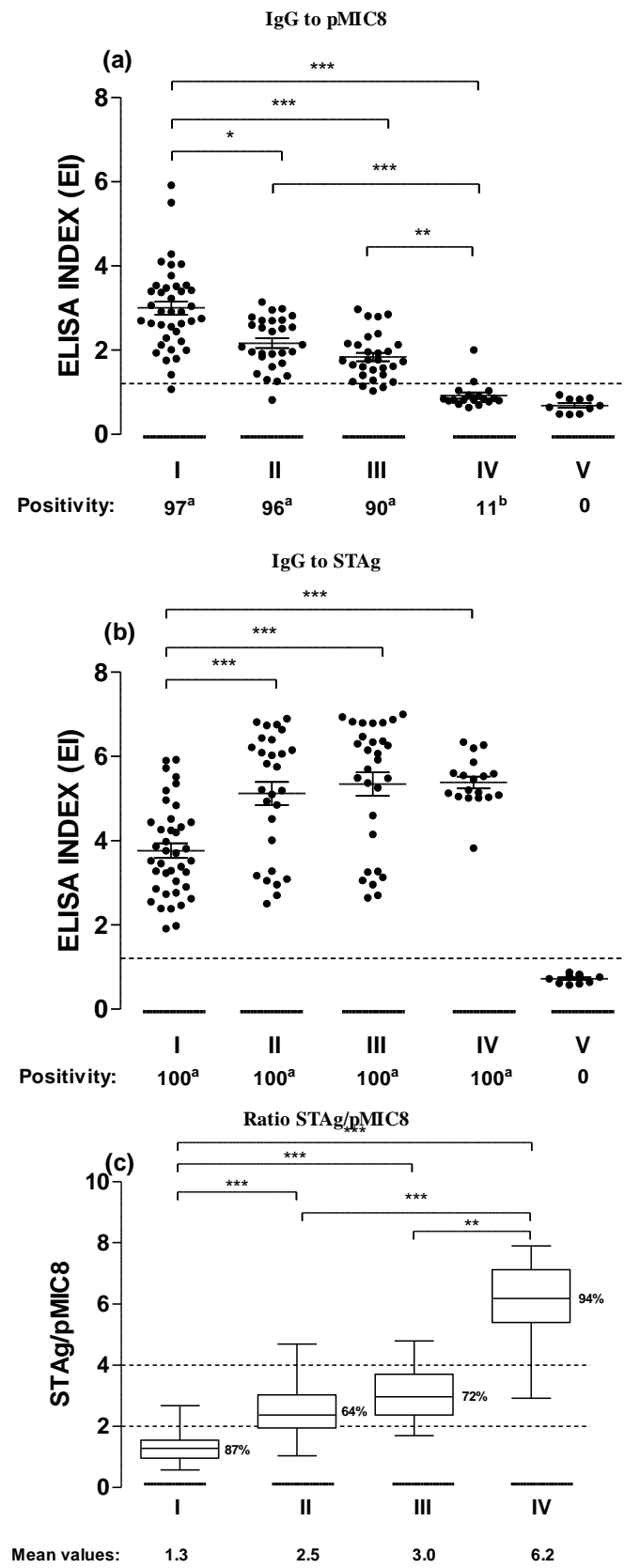




Figure 3



**Figure 4**