

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Trabalho de conclusão de curso apresentado para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

MARTA MARIA MALHEIROS

Monografia apresentada à
Coordenação do Curso de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Uberlândia, para a obtenção do grau
de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia - MG
Junho - 98

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

*Monografia apresentada em cumprimento de
requisitos para obtenção do grau de
Bacharel em Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Uberlândia
em 1998.*

Marta Maria Malheiros

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Mineo

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Uberlândia, para a obtenção do
grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

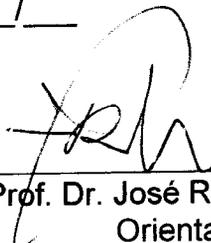
Uberlândia - MG
Junho - 98

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Este trabalho foi elaborado e apresentado à banca examinadora para a avaliação da dissertação de mestrado em Ciências Biológicas, sob a orientação do Prof. Dr. José Roberto Mineo e das co-orientadoras Prof.ª Ms. Flávia Andrade Chaves Borges e Prof.ª Ms. Silma Maria Alves de Melo.

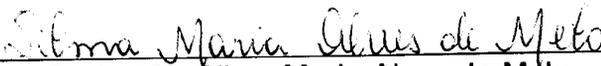
Marta Maria Malheiros

Aprovada pela banca examinadora em 1 / 1 / Nota



Prof. Dr. José Roberto Mineo
Orientador

Prof.ª Ms. Flávia Andrade Chaves Borges
Co-orientadora



Prof.ª Ms. Silma Maria Alves de Melo
Co-orientadora

Uberlândia, 25 de Junho de 1998.

*Meus Pais Maurilio e Maria
Aparecida, a vocês todas honras e
glórias desta nova etapa concluída
na minha vida.*

"É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar. É melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final.

Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes me esconder.

Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver."

(Martin Luther King)

AGRADECIMENTOS

Aos meus irmãos, Marcos e Fernando, o meu obrigado pelo apoio, apesar das divergências e brigas.

Ao meu namorado, José Humberto, pelo apoio nos momentos difíceis, compreensão nas minhas horas de chatice, estando longe ou perto.

Ao orientador José Roberto Mineo, que sempre esteve disponível nos meus momentos de dificuldade, e por ter acreditado em mim.

Às minhas "madrinhas" Flávia e Maria Aparecida pela atenção e disponibilidade dispensadas a qualquer hora.

À Silma por ter aceitado o meu inesperado convite.

Aos meus amigos do Laboratório de Imunologia, Gabriela, Fernanda, Juninho, Junão e todos os outros que sempre ajudaram na execução deste trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Bioquímica e Sorologia do Hospital de Clínicas da UFU, sempre guardando os soros, indispensáveis à realização deste estudo.

Às minhas amigas Paula, Adriana por todas as caminhadas juntas durante o curso e ao Renato que juntos tiveram participações especiais na digitação e finalização desta monografia. À Katiere, Cris e Miriam que estiveram sempre ao meu lado.

Resumo

A toxoplasmose, uma zoonose, provocada pelo coccídio *T. gondii*, apresenta distribuição geográfica mundial. Frequentemente ocorre na população humana na forma de infecção crônica assintomática, no entanto a toxoplasmose congênita e a dos pacientes imunossuprimidos apresenta um quadro grave de evolução e o diagnóstico nesses pacientes merece maior atenção, pois a detecção precoce pode evitar maiores complicações das doenças.

Na tentativa de estudar um teste mais específico foi realizado o ELISA para a detecção de complexos imunes em conjunto com a pesquisa de anticorpos IgG e IgM usualmente utilizados. Foram pesquisadas 390 amostras de soro de pacientes distribuídas nos grupos da oncologia (tratamento quimioterápico ou radioterápico), HIV positivos e atópicos com uma possível imunossupressão e um grupo controle de pacientes saudáveis (doadores de sangue). O teste de especificidade foi realizado por meio do "western blotting".

A detecção de complexos imunes não se mostrou específica, pois teve reatividade com a IgG de camundongo normal, nos teste de "western blotting", sugerindo que no soro desses pacientes existiam proteínas que reagiram inespecificamente com estas moléculas.

Sumário

1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - Histórico	1
1.2 - Habitat	2
1.3 - Ciclo Biológico	2
1.4 - Epidemiologia	3
1.5 - Transmissão	4
1.6 - Resposta Imune	5
1.7 - Formas Clínicas	7
1.8 - Diagnóstico	13
2 - OBJETIVOS	17
3 - MATERIAL E MÉTODOS	18
Medidas de Biossegurança	18
3.1 - Amostras de soro estudadas	19
3.2 - Padronização dos Ensaios Imunoenzimáticos para o estudo das amostras de soro	20
3.3 - Isolamento de IgG de camundongo	24
3.4 - Teste de especificidade	25
3.5 - Análise Estatística	28
4 - RESULTADOS	29
5 - DISCUSSÃO	53
6 - CONCLUSÃO	59
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

Lista de Tabelas

TABELA 1 - Risco de toxoplasmose em pacientes com AIDS.

TABELA 2 - Percentagem de indivíduos positivos e negativos para anticorpos IgG anti-*T. gondii* detectados pelo teste ELISA nos soros dos pacientes estudados.

TABELA 3 - Percentagem de indivíduos positivos e negativos para anticorpo IgM anti-*T. gondii* obtida pelo teste ELISA nos grupos clínicos estudados.

TABELA 4 - Percentagem de indivíduos positivos e negativos para I_c formados pelo SAG-1 - IgG nos diversos grupos clínicos estudados.

TABELA 5 - Incidência de indivíduos positivos e negativos para ao menos um dos marcadores sorológicos utilizados (I_c ou IgG ou IgM).

TABELA 6 - Número de amostras de soro que pelo teste ELISA apresentaram resultados positivos ou negativos para os marcadores moleculares I_c/IgG/IgM específicos para *T. gondii*.

TABELA 7 - Percentagem de marcadores moleculares com base nos testes ELISA realizados no grupo de pacientes alérgicos que estão ou não em uso de corticosteróides.

TABELA 8 - Números Ic/IgG/IgM anti-*T. gondii* de amostras de soro positivas para fator reumatóide em relação ao total de imunocomplexos positivos nos quatro grupos em estudo.

Lista de Figuras

- FIGURA 1** - Percentagem de indivíduos positivos e negativos para anticorpo IgG anti-*T. gondii*, encontrada pelo teste ELISA no soro de pacientes da oncologia, HIV+, alérgicos e sadios, no período de dezembro de 97 a junho de 98.
- FIGURA 2** - Percentagem de indivíduos positivos e negativos para anticorpo IgM anti-*T. gondii*, encontrados em soro de pacientes da oncologia, HIV +, alérgicos e sadios, no período de dezembro de 97 a junho de 98.
- FIGURA 3** - Percentagem de indivíduos positivos e negativos para imunocomplexos, formados pelo SAG1 - IgG encontrada pelo teste ELISA nos soros de pacientes da oncologia, HIV+, alérgicos, e sadios, estudados no período de dezembro de 97 a junho de 98.
- FIGURA 4** - Incidência de indivíduos positivos e negativos para ao menos um dos marcadores sorológicos utilizados (Ic ou IgG ou IgM), no estudo de pacientes da oncologia, HIV+, alérgicos e sadios, no período de dezembro de 97 a junho de 98.
- FIGURA 5** - Resultados da tríade Ic/IgG/IgM nas 100 amostras dos grupos da oncologia e HIV+, e nas 95 amostras dos grupos de alérgicos e de pacientes imunocompetentes, em estudo no período de dezembro de 97 a junho de 98.

FIGURA 6 - Número de pacientes que apresentaram fator reumatóide em relação ao total de imunocomplexos positivos, encontrados nos soros de pacientes da oncologia, HIV+, alérgicos e sadios, estudados no período de dezembro de 97 a junho de 98.

FIGURA 7 - Análise por "Western blotting" das amostras de soro imune complexo positivas para *T. gondii*, frente ao anticorpo monoclonal 6E9. Pistas (1 a 5): pacientes da oncologia; Pistas (6 a 22): pacientes sadios; Pistas (23 e 24): pacientes negativos para I_c/I_gG/I_gM.

FIGURA 8 - Análise por "Western blotting" das amostras de soro imune complexo positivas, frente à I_gG de camundongo normal. Pista 1: controle da reação, não foi aplicado soro; Pistas (2 a 4): soros negativos para imune complexo; Pistas (5 e 6): pacientes da oncologia; Pistas (7 a 16): pacientes sadios; Pistas (17 e 18): pacientes atópicos.

1 - Introdução

1.1 Histórico

Toxoplasma gondii é um parasita intracelular obrigatório com a seguinte classificação:

REINO Protista

SUB-REINO Protozoa

FILO Apicomplexa

CLASSE Sporozoasida

SUB-CLASSE Coccidiasina

ORDEM Eucoccidia

SUB-ORDEM Eimeria

FAMÍLIA Sarcocystidae

GENÉRO *Toxoplasma*

ESPÉCIE *Toxoplasma gondii*

(FORTES, 1997)

O protozoário foi descoberto em 1908, quase ao mesmo tempo e independentemente por Splendore em coelho, no Brasil, e logo depois por Nicolle e Mauceaux no *Ctenodactylus gondii*, um roedor do norte da África.

Toxoplasma origina-se do grego “toxon” que significa arco, em referência à forma do parasita (PFERFFERKON, 1990; REY, 1993).

1.2 Habitat

O parasito apresenta distribuição geográfica mundial e pode ser encontrado em vários tecidos e células (exceto hemácias) e líquidos orgânicos (saliva, esperma, líquido peritoneal, etc.).

Toxoplasma gondii é o agente etiológico da toxoplasmose, uma infecção muito freqüente e disseminada em vários grupos de animais: e dentre o grupo dos mamíferos (principalmente carneiro, cabra, porco), e chegando a atingir humanos e estando presente também nas aves (REY, 1993; SMITH, 1995).

1.3 Ciclo Biológico

O ciclo de vida deste coccídio é heteroxeno. Gatos e alguns outros felídeos são os hospedeiros definitivos ou completos, o homem e os outros animais são hospedeiros intermediários ou incompletos.

O protozoário apresenta uma morfologia variada dependendo do habitat e do estado evolutivo. *T. gondii* existe em quatro formas de vida: oocisto, taquizoíta, bradizoíta e esporozoíta. Oocistos se desenvolvem como um produto do ciclo sexual

no intestino do gato (hospedeiro definitivo). Todos outros animais infectados são hospedeiros secundários e têm um ciclo assexuado extraintestinal. O oocisto sofre maturação em alguns dias e então torna-se infectivo após ter sido excretado no meio ambiente. Um gato infectado pode liberar até 10 milhões de oocistos em apenas um dia, podendo esses sobreviverem até 18 meses em solo úmido, o que os torna, agentes infectivos na transmissão fecal/oral.

Taquizoítas representam a forma intracelular obrigatória característica da infecção ativa. Após multiplicação intracelular, os taquizoítas se disseminam no sangue podendo invadir todos órgãos e tecidos.

Bradizoítas podem persistir nos tecidos de um hospedeiro infectado por toda vida (infecção crônica ou latente). Cistos podem ocorrer em vários órgãos, apesar de serem comumente encontrados no miocárdio, músculo esquelético e cérebro. Cistos presentes em carne crua ou mal cozida podem transmitir a infecção (KASPER e BOOTHROYD, 1993; RAMZI e KENNETH, 1996).

1.4 Epidemiologia

A toxoplasmose, ocorre com muita frequência na população humana sob a forma de infecção crônica assintomática.

Nos Estados Unidos 15 a 68% de adultos e 90% de adultos em algumas comunidades européias mostraram em estudos sorológicos, a infecção latente por *T. gondii* (RAMIREZ *et al.*, 1997).

No Brasil, a prevalência de anticorpos anti- *Toxoplasma* varia de 54% no Centro-Oeste a 75% no Norte. Por outro lado, a incidência aumenta com a idade,

estimando-se a frequência anual de conversão sorológica em 10% entre 0 e 5 anos, 1% entre 6 e 20 anos, e 0,3 % acima de 20 anos de idade (VERONESI, 1995).

Com relação a esta zoonose entre animais, estudos têm mostrado que cerca de 50% dos gatos são comumente encontrados com a presença de anticorpos específicos. Na área de Manaus (AM), 81% dos 32 gatos examinados apresentaram anticorpos com títulos iguais ou superiores a 1:128 no teste de hemaglutinação indireta; em Botucatu (SP), 64% dos cães tinham anticorpos anti - *Toxoplasma* detectáveis pelos testes utilizados. Na ausência de gatos domésticos, tal como ocorre na área do rio Xingu, no Brasil Central, a alta prevalência de anticorpos pode provavelmente ser atribuída aos felinos selvagens, tais como ocelote, jaguar e jaguarundi, que se mostraram capazes de eliminar oocistos de toxoplasma (VERONESI, 1995).

1.5 Transmissão

Em algumas regiões, 40% a 70% dos adultos aparentemente sadios apresentam-se positivos para toxoplasmose, como demonstrado por testes sorológicos. Essa variação parece ser devida a fatores geográficos, climáticos, hábitos alimentares, tipo de trabalho, cepas com diferentes graus de virulência, etc., indicando que os mecanismos de transmissão devem ocorrer por meio das diferentes formas do parasito:

- oocistos presentes em fezes de gato jovem infectado.

- ingestão de cistos presentes em carnes (os cistos sobrevivem por semanas ao frio, mas são em geral mortos pelo congelamento e também pelo aquecimento acima de 66°C).

- ingestão de taquizoítas encontrados no leite, na saliva, através de lambedura ou perdigotos e no esperma.

- congenitamente .
- acidentes em laboratório.
- transplante de órgãos.

(NEVES, 1995; VERONESI, 1995).

1.6 Resposta Imune

A resposta imunológica mediada por células tem grande importância na resistência do hospedeiro contra *T. gondii*. A indução de macrófagos e células “Natural Killer” (NK) resulta em um aumento de imunidade natural e da resistência a diversos patógenos. Tem sido demonstrado que infecção aguda por *Toxoplasma* em ratos resulta em um aumento significativo de células NK. Linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ parecem estar envolvidos na proteção contra a reativação, sendo que os linfócitos T CD8⁺ são os primeiros mediadores da imunidade protetora contra infecção aguda e crônica (KASPER e BOOTHROYD, 1993).

A produção de diversas citocinas pelas células T representa um importante fator na defesa contra infecção. O IFN- γ (interferon gama) ativa e sinergiza macrófagos para atividade toxoplásmica. Estes mecanismos revelam um curso de resistência à infecção no hospedeiro normal com infecção aguda, além de

contribuam para a manutenção da forma crônica da infecção caracterizada por formas císticas disseminadas pelo tecido do hospedeiro. A resposta imune do tipo humoral, com produção de IgG, IgM, IgA e IgE específica, também ocorre. Anticorpos específicos combinados com complemento lisam taquizoítas extracelulares (RAMZI e KENNETH, 1996).

Complexos Imunes, formados a partir da associação de antígenos de *Toxoplasma* com anticorpos específicos, podem ser detectados em fluidos corporais de indivíduos com a infecção ativa.

Muitos trabalhos atualmente estão envolvidos na resposta imune à principal proteína de superfície radiodinável de *T. gondii*, SAG-1 (P30) que tem um peso molecular de 30KDa e parece ter um importante papel nos mecanismos de virulência do parasita. Como determinado por radioimunomarcagem, esta proteína representa 3 a 5 % da proteína total do parasita. SAG-1 é uma proteína antígeno estágio-específico, pois pode ser detectado durante a rápida divisão, nos taquizoítas invasivos, mas não em bradizoítas ou em esporozoítas de oocistos (KASPER e KHAN, 1993).

Entre as diversas citocinas, IFN- γ parece ser um dos principais mediadores de proteção contra *Toxoplasma gondii*. Tem sido observado em laboratório que SAG-1 induz a produção de altos títulos de IFN- γ , além de outras importantes citocinas tais como IL-4, TNF- α e TNF- β (KASPER e KHAN, 1993).

Estudos recentes sugerem que SAG-1 pode ter um importante papel funcional na invasão do parasita (KASPER e MINEO, 1994).

1.7 Formas Clínicas

A toxoplasmose pode se apresentar de três maneiras diferenciadas: adquirida, congênita e a dos pacientes imunodeprimidos.

Grupos de Risco

- Infecção por *Toxoplasma* em gestantes - transmissão congênita ou transplacentária.

A infecção primária com *T. gondii* é assintomática em mais de 80% dos casos, sendo que a maioria não exige tratamento. Ao contrário, mulheres que adquiriram a infecção após a concepção requerem tratamento imediato para prevenir ou melhorar o prognóstico da infecção fetal (NAGY *et al.*, 1997).

Cerca de 40% dos fetos podem adquirir toxoplasmose durante a gestação, estando a gestante na fase aguda da doença ou se houver a reativação de cistos da fase crônica (GORGIEVSKI-HRISOHO *et al.*, 1996). Deve-se ressaltar que mulheres que possuem sorologia positiva antes da gravidez têm menos chance de infectar seus fetos do que aquelas que apresentam a primo-infecção durante a gestação.

A forma mais severa é encontrada em crianças recém-nascidas, sendo caracterizada por encefalite, icterícia, urticária e hepatomegalia, geralmente associada com coriorretinite, hidrocefalia e microcefalia com altas taxas de morbidade e mortalidade.

O diagnóstico clínico não é possível em quase 90% dos casos, por isso os testes sorológicos que detectam IgM e IgG são indispensáveis no período pré-natal (NEVES, 1995; GORGIEVSKI-HRISOHO *et al.*, 1996).

Toxoplasmose em Pacientes Imunodeprimidos

A toxoplasmose vem apresentando quadro grave de evolução e de dimensões imensuráveis em indivíduos com o sistema imune severamente comprometido. Trata-se de um grupo crescente de pacientes, cujas defesas naturais contra agressões do meio ambiente e de agentes oportunistas estão comprometidas, que inclui transplantados submetidos a tratamentos imunossupressivos, indivíduos com câncer que se submetem a tratamento quimioterápico, pacientes em uso de corticosteróides por etiologias diversas e aqueles infectados pelo HIV (REY, 1993; NEVES, 1995; RAMZI & KENNETH, 1996; BARONE, 1997).

Nestes grupos de pacientes as infecções crônicas e assintomáticas podem assumir caráter agudo e passar a ser o principal problema. A doença causa febre, com envolvimento do SNC, e apresenta má resposta a terapêutica e altos índices de mortalidade (NETO *et al.*, 1995).

A adição de agentes imunossupressivos, tais como corticosteróides ou outros agentes citotóxicos, podem resultar em um aumento da frequência de infecção no hospedeiro comprometido. Provavelmente a maioria das infecções desta natureza é devida a reativação da infecção latente (RAMZI & KENNETH, 1996).

Hamsters infectados cronicamente com *T. gondii* e que receberam tratamento com cortisona, ciclofosfamida, ou irradiação total no corpo apresentaram uma exacerbação de infecção com encefalite fatal (KASPER e BOOTHROYD, 1993).

Deste modo, pode-se dizer que as pessoas com a imunocompetência alterada como resultado de imunodeficiência congênita ou adquirida, leucemia, linfoma, câncer em geral, terapia com agentes alquilantes, antimetabólitos, radiação ou doses elevadas de corticosteróides estão mais vulneráveis ao ataque de agentes oportunistas, como o *T. gondii* (RAMZI e KENNETH, 1996).

- Toxoplasmose em pacientes HIV positivos

A partir dos anos 80, o índice de pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) tem aumentado gradativamente, e a OMS (Organização Mundial de Saúde) estima que mais de 19 milhões de pessoas foram contaminadas pelo vírus da AIDS no mundo, sendo que pouco mais de 1/5 desse total já desenvolveu a doença. No Brasil, o Ministério da Saúde calcula que existam hoje no país entre 425 mil a 500 mil soropositivos (LOUREIRO e LACERDA, 1997).

A incidência da infecção pelo *T. gondii* nestes pacientes está entre 5 e 33 %, sendo a segunda causa de morte neste grupo (KASPER e BOOTHROYD, 1993).

A toxoplasmose em pacientes com a AIDS é quase que exclusivamente devido à reativação de infecção crônica latente resultado da progressiva imunodeficiência que os pacientes desenvolvem. O risco da infecção nestes deve ser estratificada de acordo com a contagem de linfócitos T CD4⁺ (TABELA 1).

TABELA 1 - Risco de toxoplasmose em pacientes com AIDS

Nível de linfócito T CD ₄ ⁺	Risco de Toxoplasmose	
	em 12 meses	Em 18 meses
Entre 200 e 100 cels./mm ³	7,3%	21,2%
Menor que 100 cels./mm ³	22,0%	40,0%

(LIMA, 1995)

Em pacientes infectados pelo HIV as anormalidades funcionais de células T, macrófagos e células NK proporcionam a reativação da infecção latente por *Toxoplasma*. O rompimento intermitente dos cistos no SNC associado à resposta imunológica mediada por células resulta em proliferação de taquizoítas e encefalite toxoplásmica. A toxoplasmose cerebral nestes pacientes pode acontecer em cerca de 30 – 50% daqueles previamente infectados pelo parasita (CUNHA *et al.*, 1993).

A disseminação hematogênica também ocorre a partir de focos fora do SNC (LIMA, 1995).

A detecção e monitoramento de anticorpos anti-*Toxoplasma* em pacientes HIV é essencial, devido ao risco de desenvolvimento de toxoplasmose cerebral.

Outra patologia causada por *T. gondii* neste tipo de pacientes é toxoplasmose ocular que ocorre em 82% dos casos (RAMIREZ *et al.*, 1997).

- Toxoplasmose em pacientes com câncer

A infecção por *T. gondii* nesse grupo de pacientes pode causar febre, encefalite difusa, ou lesões em massa (CHITKARA & SPEKOWITZ, 1994).

Em pacientes com câncer, a toxoplasmose é freqüentemente associada com a doença de Hodgkin. No entanto, têm sido relatados casos em pacientes que apresentaram linfoma não-Hodgkin, leucemias aguda e crônica, mieloma múltiplo e também em pacientes com tumores sólidos submetidos a quimioterapia para carcinoma da mama, ovário, pulmão e timo, assim como pacientes com neuroblastoma e melanoma (RAMZI e KENNETH, 1996).

Os defeitos de imunidade mediada por células, devido às doenças, associados à terapia imunossupressiva com glicocorticóides, anti-metabólitos e quimioterapia, prejudicam ainda mais o paciente e aumenta a susceptibilidade à infecção com *T. gondii* (RAMZI e KENNETH, 1996).

O uso de quimioterapia, envolvendo os procedimentos de transplante de órgãos, medula óssea e tratamento de câncer, tem aumentado a incidência de infecção oportunista por *Toxoplasma*, principalmente nas duas últimas décadas, apresentando quadro grave da doença especialmente no SNC (NEVES, 1995).

Corticosteróides são drogas adjuvantes ao ópio para o tratamento da dor neoplásica, porém, como efeito colateral, elas são causa de imunossupressão e sintomas psiquiátricos (insônia, agitação, psicose) (SCHÖELLER, 1997).

A encefalite é também uma manifestação comum da toxoplasmose. Segundo Israelski e Remington, 72% dos pacientes que sofrem de câncer e que apresentam toxoplasmose podem apresentar um quadro de encefalite (RAMZI, 1996).

- Toxoplasmose em pacientes em uso de corticosteróides

Corticosteróides são drogas amplamente utilizadas como uma classe de medicamentos que mantêm regimes imunossupressivos. A ação primária imunossupressiva dos corticosteróides parece ser a de inibir a proliferação e função de células T, bloqueando a expressão de diversas citocinas inibindo assim imunidade celular e humoral. Baixas doses de corticosteróides podem fornecer imunossupressão satisfatória e como efeito adverso de um tratamento prolongado tem-se uma aumentada susceptibilidade a infecções (Drugs & Ther Perspect).

- Toxoplasmose em pacientes transplantados

Pacientes submetidos a transplante de órgãos normalmente recebem tratamentos de fármacos imunossupressores que podem influenciar nos mecanismos de resposta imune celular e humoral, facilitando assim a instalação de infecções por microorganismos intracelulares oportunistas, entre eles *T.gondii* (CUNHA *et al.*, 1993).

O intervalo de tempo entre o transplante e o início da sintomatologia está intimamente relacionado com o protocolo de imunossupressão e a patogenia da infecção: mais longo se ela resultar de uma reativação das formas císticas cerebrais do parasita e breve se a mesma tiver sido transmitida pelo órgão transplantado (CUNHA *et al.*, 1993).

A transmissão do *T. gondii* pelo órgão do doador está comprovada no transplante renal, hepático e cardíaco, embora seja este último o de maior expressão (CUNHA *et al.*, 1993; GALLINO *et al.*, 1996).

1.8 Diagnóstico

O diagnóstico pode ser baseado em achados clínicos, sorológicos ou radiológicos. Devido ao fato de não desencadear sinais clínicos específicos da doença, a aplicação de técnicas de diagnóstico requer a detecção da infecção, por meio da pesquisa do antígeno por ELISA, amplificação do ácido nucléico por PCR, e teste de anticorpos IgG ou IgM por ELISA e immunoblotting (LIN & SU, 1997).

Devido às limitações e dificuldades inerentes às técnicas parasitológicas, os métodos sorológicos são os mais comumente utilizados para o diagnóstico da toxoplasmose. Estes se baseiam geralmente na pesquisa de anticorpos específicos (IgM, IgG) para antígenos parasitários.

O teste do corante de Sabin-Feldman ou "Dye Test" tem sido usado há muitos anos, e ainda hoje é mantido como teste de referência pela OMS (Organização Mundial de Saúde). Apesar de possuir alta especificidade e sensibilidade, este teste não é usado na rotina laboratorial por necessitar da manipulação de organismos vivos e de sua manutenção em camundongos por meio de passagens intraperitoneais.

O diagnóstico de toxoplasmose em pacientes com alterações imunitárias é consideravelmente mais difícil que em pacientes imunocompetentes. Geralmente não há ascensão de títulos de IgG na reativação e há ausência de níveis

detectáveis de anticorpos em pacientes com quadro sugestivo de toxoplasmose de SNC. A presença de anticorpos da classe IgM não é usual nos pacientes com AIDS e toxoplasmose de SNC. Anticorpos da classe IgG são extremamente comuns e são indicativos de infecção crônica. A presença de anticorpos da classe IgM sugerem infecção aguda, mas a sua detecção não tem sido útil nos pacientes com AIDS e câncer para diagnosticar a toxoplasmose em atividade, mesmo porque tanto em um caso como em outro parece não haver uma infecção inicial, mas a reativação de parasitas de persistência intracelular em hospedeiros que perderam a capacidade, anteriormente existente, de limitar a infecção (NETO *et al.*, 1995).

Detecção de anticorpos IgE pelo teste de aglutinação imunoabsorvente parece ser possível somente durante o estágio agudo ou de reativação da infecção. Em pacientes imunossuprimidos, a detecção de anticorpos IgE com reativação de infecção latente pelo *T. gondii*, pode ser relacionado com doença em atividade. Porém deve se tomar cuidado porque de quatro em quatorze pacientes com infecção recente vinda de soroconversão, não foram detectáveis anticorpos IgE. (GROSS, KEKSEL e DARDE, 1997).

Ainda que exista uma grande parte de pacientes, imunocomprometidos e com toxoplasmose, que apresentem respostas imunológicas normais, casos de resultados falso-negativos já foram registrados. Também foram notados casos de resultados falso-positivos na imunofluorescência indireta, para pesquisa de anticorpo IgM, em pacientes que apresentaram níveis detectáveis de anticorpos anti-nucleares. O fator reumatóide (auto-Ac. IgM anti-IgG) pode causar um resultado falso-positivo na imunofluorescência indireta para IgM (KASPER e BOOTHROYD, 1993).

Os estudos sorológicos são úteis para detecção dos pacientes infectados pelo *T. gondii*. A presença de anticorpos da classe IgG (Sabin-Feldman, IFA, ELISA) ocorre em 97% a 100% dos pacientes com toxoplasmose e AIDS. Os títulos altos podem estar relacionados a hipergamaglobulinemia da AIDS (LIMA, 1995).

Recente avanço tem sido possível no diagnóstico através da reação de cadeia da polimerase (PCR) que detecta o DNA do *T. gondii* em fluidos corporais e tecidos. Porém é um teste que requer muitos cuidados para evitar a contaminação do material e obter resultados falsos (LIMA, 1995).

Em relação ao diagnóstico de toxoplasmose cerebral, a detecção de *T.gondii* por PCR parece pouco adicionar, porém pode ser útil no diagnóstico de toxoplasmose cerebral associada com reativação extracerebral e toxoplasmose disseminada (ROBERT *et al.*, 1996; LAMORIL *et al.*, 1996)

A inoculação em camundongos para isolar o *Toxoplasma* tem sido um método altamente sensível, porém demora de 3 a 6 semanas para se tornarem disponíveis e freqüentemente a maioria dos laboratórios não executa esta técnica.

A demonstração dos taquizoítas por técnicas de imunoperoxidase, Giemsa ou PAS em qualquer tecido ou fluido corpóreo é prova de infecção em atividade. Análises de líquido cefalorraquidiano (LCR) incluem leve pleiocitose mononuclear e leve hiperproteinorraquia (LIMA, 1995).

A partir dessas observações, pode-se perceber que o diagnóstico depende principalmente de métodos sorológicos, os quais medem qualitativa e quantitativamente as imunoglobulinas das classes IgG e IgM, principalmente. Porém, podem ser dificultados em recém-nascidos congenitamente infectados e em pacientes severamente imunocomprometidos. Algumas dessas dificuldades se

devem a resultados falso-negativos que ocorrem particularmente nestes pacientes, cuja produção de anticorpos demonstráveis pelo organismo hospedeiro pode estar comprometida. Com isso a detecção de antígeno como proposta para diagnóstico poderá ser útil naqueles casos, nos quais os resultados dos testes sorológicos são prejudicados devido a doenças ou terapia imunossupressiva. Em tais situações, a demonstração de antígenos de *T. gondii* no soro ou noutros fluidos corporais, pode ser particularmente útil no diagnóstico da toxoplasmose aguda (BORGES, 1996).

Os produtos metabólicos (ESA) do parasita têm sido alvo para propostas de diagnóstico, pois indicam uma infecção ativa. A proteína SAG-1 tem se destacado por representar a principal proteína de superfície do *T. gondii*, e por ser excretada exclusivamente pelas formas taquizoítas, cuja presença é indicativa de infecção ativa (KASPER e KHAN, 1993; BORGES, 1996).

2 - *Objetivos*

- Padronizar técnicas imunoenzimáticas (ELISA) para detecção de imunocomplexo (Ag P30 - Anticorpo (IgG)), em amostras de soro humano.
- Verificar a incidência dos marcadores sorológicos IgG, IgM e Ic anti-*T. gondii* em grupos de pacientes com câncer, atópicos e infectados pelo vírus HIV.
- Correlacionar a detecção destes marcadores moleculares com as possíveis condições imunossupressoras dos pacientes em estudo.

3 - Material e Métodos

Medidas de Biossegurança

É importante que o profissional de laboratório conheça as doenças prevalentes no seu meio, tratando-se de doenças infecciosas, não ignorar sua natureza, período de incubação e meios de proteção, caso contrário não estará habilitado para exercer suas atividades neste meio.

Todo e qualquer tipo e gravidade de um acidente deve ser levado ao conhecimento do chefe do laboratório, este procedimento visa cumprir os requisitos legais, importantes no futuro para resguardar “os direitos” que decorrem do acidente.

O trabalho com *T. gondii* é um exemplo de microorganismo manipulado em Nível de Biossegurança 2 que nos ensina algumas precauções e cuidados, tais como:

- esse protozoário apresenta perigo potencial para as pessoas e para o meio ambiente;

- apresenta moderado risco individual e baixo risco para a comunidade;
- com o tratamento efetivo e medidas preventivas viáveis o risco da infecção se espalhar é limitado;

- o pesquisador foi treinado para manipular os agentes patogênicos;
- o acesso ao laboratório foi limitado durante a realização do experimento;
- foram tomadas extremas precauções com os materiais cortantes;
- a entrada de pessoas imunodeprimidas ou imunodeficientes foi proibida;

Neste nível de Biossegurança foram incluídas todas as práticas e procedimentos que são consistentes com o conceito de “Precauções Universais” que estabelece que todas as espécimes de sangue humano, produtos do sangue, fluidos corporais e tecidos foram tratados como se tivessem agentes infecciosos (BORGES e MINEO, 1997).

3.1- Amostras de soro estudadas

Um total de 390 amostras de soro foi coletado no Laboratório de Sorologia e de Bioquímica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, no Laboratório de Imunologia e no Hemocentro Regional de Uberlândia. Estas amostras foram então, transferidas para o Laboratório de Imunologia onde foram armazenadas a -20°C para posterior análise.

Durante a coleta foram triadas 100 amostras de soro pertencentes a pacientes do ambulatório de oncologia que estavam em tratamento quimioterápico ou radioterápico, 100 amostras de pacientes HIV positivos, 95 amostras de

pacientes atópicos (a pelo menos dois inalantes domiciliares) com graves sintomas de alergia e 95 amostras de doadores de sangue do Hemocentro.

3.2- Padronização dos Ensaio imunoenzimáticos para o estudo das amostras de soro

A padronização teve como finalidade a determinação de um perfil de reatividade para a toxoplasmose. Foi conduzida por meio de titulações em bloco dos reagentes integrantes de cada ensaio.

Diversas placas foram testadas, dentre as quais Falcon^R, Oxnard, CA, USA; Interlab; Nunc - Immuno Plates; Corning - 25880 - 96, que apresentam sensibilidades diferentes, uma é flexível, enquanto que as outras são rígidas.

Os diferentes conjugados utilizados nas reações foram testados em diversas diluições. O conjugado anti-IgG humana produzido em cabra (SIGMA Co., USA), foi testado nas diluições de 1/500, 1/1000, 1/1500, 1/2000, 1/3000 em solução salina tamponada com fosfatos 0,01M, pH 7,2 adicionada de Tween 20 (PBS-T 0,05%), PBS-T 0,05% acrescido de 10% de soro de cabra normal ou com 5% de soro de coelho normal; enquanto que para o conjugado anti-IgM humana produzido em cabra (SIGMA Co., USA), foi testado nas diluições de 1/1000, 1/3000, 1/5000, 1/10000 em PBS-T 0,05%, PBS-T 0,05% acrescido de 5% ou 10% de soro de cabra normal.

Após a padronização dos reagentes e adequação das placas, foram estabelecidos os demais protocolos necessários para análise das amostras.

3.2.1 - Sensibilização das placas para a detecção de anticorpos IgG e IgM humana anti-*T. gondii*.

As placas de polivinilcloreto foram sensibilizadas com formas taquizoítas de *T. gondii* como segue: um volume de 0,4 ml de exsudato peritoneal de camundongo Swiss infectado com a cepa RH de *T. gondii* foi colhido e centrifugado por 15 minutos a 2000 rpm. Em seguida esta preparação foi lavada em 10 ml de PBS, centrifugando a 4°C durante 15 minutos, sendo este ciclo repetido por 4 vezes. Realizou-se a contagem dos parasitas em câmara de Neubauer e 10^5 taquizoítas/ml foram ressuspensos em 15 ml de PBS-gelatina 2%. A seguir adicionou-se um volume de 100 µl/poço em placas plásticas e deixado secar a 37°C e armazenado para posterior análise em -20°C.

3.2.2- Elisa indireta para a detecção de anticorpos IgG humana anti-*T.gondii*.

As placas previamente sensibilizadas foram lavadas três vezes, durante cinco minutos cada ciclo, com PBS 0.15M pH 7.2 adicionado de Tween 20 a 0.1% (PBS-T), em seguida foi aplicado em duplicata um volume de 50 µl por poço das amostras de soros diluídas na razão 1/50 em solução de PBS-T contendo leite desnatado a 5% e incubadas a 37°C por 45 minutos. O controle do conjugado foi realizado também em duplicata onde 50 µl de PBS-T com 5% de leite desnatado foi adicionado em substituição ao soro.

Após o período de incubação as placas foram lavadas novamente e aplicou-se 50 μ l por poço do conjugado anti-IgG humana produzido em cabra (SIGMA Co., USA) na razão de 1/1000 diluído em solução de PBS-T 0,05% com 10% de soro de cabra normal. Após este momento as placas foram incubadas a 37°C em câmara úmida por 45 minutos.

Após o período de incubação as placas foram novamente lavadas com PBS-T 0,1% e adicionou-se 50 μ l do substrato enzimático, consistindo de 5 mg de OPD (orto-fenilenodiamina) em 12,5 ml de Tampão Citrato-Fosfato pH 5,0 e 5 μ l de H₂O₂ 30% e então incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente em câmara escura.

A reação enzimática foi interrompida com 25 μ l/poço de solução de H₂SO₄ 2N e procedeu-se a leitura a 492 nm em leitor de microplacas.

3.2.3 Elisa indireta para detecção de anticorpos IgM humana anti- *T. gondii*

As placas previamente sensibilizadas com taquizoítas de *T. gondii*, foram lavadas três vezes, durante cinco minutos cada ciclo, com PBS-T 0.1% e então adicionou-se em duplicata 50 μ l das amostras de soros diluídas na razão 1/50 em solução de PBS-T contendo leite desnatado a 5% e incubadas a 37°C por 45 minutos. O controle do conjugado foi realizado em duplicata, onde PBS-T com 5% de leite desnatado foi adicionado em substituição ao soro.

As placas foram então incubadas durante 45 minutos a 37° C em câmara úmida. Após este período as placas foram novamente lavadas e adicionou-se 50 μ l

por poço do conjugado anti- IgM humana produzido em cabra (SIGMA Co., USA), na razão 1/5000 diluído em solução de PBS -T 0,05% com 5% de soro de cabra normal.

Novamente as placas foram incubadas a 37°C em câmara úmida e as lavagens foram repetidas, para a aplicação de 50 µl do substrato enzimático, consistindo de 5 mg de OPD (orto-fenilenodiamina) em 12,5 ml de Tampão Citrato-Fosfato pH 5,0 e 5 µl de H₂O₂ 30%, que foi deixado por 15 minutos à temperatura ambiente em câmara escura.

A reação enzimática foi interrompida adicionando-se 25 µl de solução de H₂SO₄ 2N e a leitura realizada a 492 nm em leitor de microplacas.

3.2.4 Elisa -"Sandwich" para detecção de imune-complexo.

As placas de polivinilcloreto foram sensibilizadas com 50 µl/poço de sobrenadante de cultura, contendo o anticorpo monoclonal anti-P30 (6E9), durante 18 horas, à 4°C, em câmara úmida. Após esse período três lavagens foram realizadas com duração de 5 minutos cada, com PBS-T 0.05% e as amostras de soro foram diluídas 1/5 em PBS-T 0,05%, e adicionadas 50 µl/poço.

Em seguida, as placas foram incubadas por 45 minutos a 37°C em câmara úmida, sendo novamente lavadas com PBS-T 0,05%, para posterior aplicação de 50 µl/poço do conjugado anti-IgG humana, produzido em cabra, marcado com peroxidase (SIGMA Co., USA), diluído 1/3000 em PBS-T 0.05%.

Do mesmo modo as placas foram novamente incubadas e lavadas, sendo então adicionado 50 µl por poço, do substrato enzimático, consistindo de 5 mg de

OPD (orto-fenilenodiamina) em 12,5 ml de Tampão Citrato-Fosfato pH 5,0 e 5 μ l de H_2O_2 30%. Após 15 minutos em câmara escura e temperatura ambiente, a reação foi interrompida com 25 μ l/poço de solução de H_2SO_4 2N.

A leitura foi realizada em leitor de microplacas utilizando um comprimento de onda de 492 nm.

3.3- Isolamento de IgG de camundongo

Vinte camundongos normais Swiss foram sangrados pelo plexo orbital, e o sangue deixado coagular, para a separação do soro. Após 30 minutos o coágulo foi retirado e o soro centrifugado por 5 minutos a uma alta rotação, e desta maneira o soro pode ser passado em coluna.

A imunoglobulina foi separada por cromatografia de afinidade em uma coluna de proteína A - Sepharose. Para equilibrar a coluna foi utilizado o tampão fosfato 0,1 M (pH = 8,0), 10 vezes o volume da coluna, e então aplicada a amostra de soro de camundongo diluída 1:2 em tampão fosfato. Posteriormente a proteína foi eluída com tampão glicina 0,2 M (pH entre 2,5 e 2,8).

A coleta das frações proteicas foi feita através de monitoramento em aparelho de espectrofotômetro em comprimento de onda de 280 nm. O "pool" das frações com maior Densidade Ótica (D.O.), que foi dialisado contra PBS durante 3 horas, sendo que houve uma troca de PBS a cada hora.

3.4- Teste de especificidade

3.4.1- Detecção do fator reumatóide

A detecção do fator reumatóide foi realizada em todas as amostras que deram resultados positivos para o imunocomplexo. Para tal utilizou-se o teste ELISA, onde foi seguido o mesmo protocolo realizado para a pesquisa de imunocomplexo, com alterações somente na sensibilização das placas, que foi realizada pela adição de 50 μ l por poço de uma solução contendo 10 μ g/ml de IgG de camundongo purificada, que foi obtida conforme a descrição no item 3.3.

3.4.2- Eletroforese em gel de Poliacrilamida (SDS - PAGE)

Para a análise eletroforética das proteínas presentes no anticorpo monoclonal 6 E9, e na IgG de camundongo normal utilizou-se o método descrito por LAEMMLI (1970), no qual utilizamos o gel de separação na concentração de 10% e gel de empilhamento a 5% em uma voltagem de 240V e corrente constante de 25 mA, por 5 horas.

3.4.3 - "Western Blotting"

Inicialmente realizou-se uma eletroforese em SDS-PAGE, contendo um padrão de peso molecular (GIBCO BRL) (10 μ l), e uma amostra de anticorpo monoclonal 6E9 (400 μ l), ou uma amostra de IgG de camundongo normal (400 μ l).

Imediatamente após a migração eletroforética das proteínas, realizou-se a transferência deste gel para membranas de nitrocelulose 0,45 μm , em sistema semi-úmido (Multiphor II Electrophoresis Unit-Pharmacia).

Para o início da transferência umedeceu-se a placa de grafite (ânodo) em água destilada e então montou sobre esta placa, em sequência, tomando cuidado para não formar bolhas de ar um sanduíche com seis folhas de papel de filtro (Whatman nº1) cortadas no tamanho de 1cm maior que o gel, embebidas em tampão de transferência, colocadas uma a uma, uma membrana de nitrocelulose cortada no tamanho do gel, umedecido em tampão de transferência e o gel embebido em tampão de transferência e para completar o processo folhas de papel de filtro foram colocadas empilhadas. E no final colocou-se a outra placa de grafite (cátodo) previamente umedecida em água destilada.

A corrente para a realização da transferência foi de 0,8 mA por cm^2 do gel por 2 horas.

Após a transferência, corou-se a nitrocelulose em solução de Ponceau a 0,5% por 2 minutos e descorou com água destilada logo em seguida. Esta membrana foi seca em estufa a 37°C, por 1 hora.

Após a secagem a nitrocelulose foi cortada com mais ou menos 0,5 mm de largura, para a realização da reação.

Toda a reação ocorreu sob agitação lenta e contínua, em agitador de placas.

As tiras da membrana de nitrocelulose eletrotransferida foram colocadas em placas e bloqueadas com solução de PBS- Tween a 0,05% contendo leite desnatado a 5%, por 2 horas à temperatura ambiente.

Em seguida adicionou-se as amostras de soro humano diluídas 1/5 em PBS -T Molico 1%, e incubou-se por 18 horas a 4°C. Após este período as membranas foram lavadas em 6 ciclos de 5 minutos com PBS-T 0,05%. Então adicionou-se o conjugado anti - IgG humana 1/1000 em PBS - T Mol. 1%, por 2 horas à temperatura ambiente.

Após a incubação as tiras foram lavadas num ciclo de 6 vezes com PBS e reveladas com a solução cromógena (substrato: 5,0 mg de DAB (diaminobenzidina) em 15 ml de PBS (frasco escuro ao abrigo da luz) e no momento do uso, adicionou-se 500 µl de água oxigenada a 30%.

As amostras de soro positivas para imunocomplexo foram testadas pelo "western blotting" onde reagiram com o anticorpo monoclonal 6E9, para se verificar por meio da análise do peso molecular, a hipótese de uma reação inespecífica das proteínas presentes no sobrenadante de cultura do anticorpo 6E9 com o conjugado anti-IgG humana utilizado no teste ELISA para Ic.

Em outra reação de "western blotting", estas mesmas amostras de soro foram adicionadas a membranas contendo IgG de camundongo normal, para verificar se existia reatividade cruzada no teste de Ic. Nem todas amostras puderam ser testadas, por insuficiência de soro.

3.5 - Análise Estatística

Foram feitas análises estatísticas (diferenças entre duas porcentagens), no programa Statistic for Windows, para verificar se a prevalência de toxoplasmose com relação aos diferentes marcadores sorológicos, nos diferentes grupos estudados apresentava diferença estatística. Os resultados que apresentaram $p < 0,05$, foram considerados diferentes estatisticamente.

4 - Resultados

4.1 - Padronização dos Ensaios Imunoenzimáticos

Foram testadas 3 tipos diferentes de placas na padronização dos ensaios imunoenzimáticos, dentre essas, a placa da Corning foi a que apresentou melhores resultados de reprodutibilidade.

As amostras de soro foram analisadas em bloco, com diferentes diluições de conjugado enzimático, assim como bloqueadores e diluentes, teve-se um diluente para cada ensaio e uma diluição característica para cada ELISA. Para a detecção de IgG anti-*T. gondii* utilizou-se o conjugado anti-IgG humana na diluição de 1/1000 em solução de PBS-T 0,05% com 10% de soro de cabra normal. Nesse diluente diluições abaixo de 1/1000 apresentaram reações inespecíficas, enquanto que as diluições superiores não mostraram diferenças de reatividade para toxoplasmose. Utilizando como diluente somente PBS-T 0,05%, sem bloqueadores, as reações foram inespecíficas.

Para a detecção de IgM anti-*T. gondii* utilizou-se o conjugado anti-IgM humana, diluído em solução de PBS-T 0,05% com 5% de soro de cabra normal. As diluições abaixo de 1/5000 apresentaram reações inespecíficas, enquanto que a diluição de 1/10000 não mostrou coloração na reação.

No ELISA para a detecção de imune-complexo e de fator reumatóide, utilizou-se o conjugado anti-IgG humana, marcado com peroxidase, diluído 1/3000 em PBS-T 0,05%, que mostrou melhor diferenciação entre amostras positivas e negativas.

4.2 - Ensaios Imunoenzimáticos

As amostras de soro foram aplicadas em placas de polivinilcloreto da Corning, em duplicata. Como controle do conjugado utilizou-se o diluente da reação e como controles positivo e negativo, soros de pacientes infectados ou não como *T. gondii*.

Para a análise das reações foi feito um "cut-off" para cada reação e dia, devido às diferenças de manuseio, estado de conservação das amostras que eram descongeladas e manipuladas diversas vezes, porém procurou-se realizar os três testes para a detecção de Ic., IgG e IgM no mesmo dia para cada grupo da amostras de soros. O "cut-off" consistiu da média das absorbâncias obtidas com as amostras de soro negativas acrescida de três desvio-padrão, enquanto que para a análise quantitativa das amostras de soros utilizou-se a média das duplicatas das absorbâncias obtidas. Comparando-se com o valor do "cut-off", as amostras que apresentaram valores abaixo do "cut-off" foram consideradas negativas e aquelas

com valores acima foram consideradas amostras positivas para toxoplasmose em todos os ensaios realizados.

4.2.1 - Detecção de anticorpos IgG anti-*T.gondii* nos quatro grupos estudados

Foram testadas 100 amostras de soro de pacientes da oncologia, alguns em tratamento quimioterápico e alguns apenas radioterápico.

Esse grupo de pacientes apresentava linfoma de Hodkin ou leucemias aguda e crônica ou carcinomas da mama, ovário, pulmão, gástrico, intestino, reto, na base da língua ou neuroblastoma ou ritinoblastoma.

Das 100 amostras estudadas neste grupo, 22 (22%) foram positivas para IgG anti-*T. gondii* e 78 (78%) das amostras foram negativas para o mesmo marcador (TABELA 2; FIGURA 1).

Foram estudadas 100 amostras de pacientes HIV +, que desenvolveram ou não a doença, 9 (9%) dessas amostras foram positivas e 91(91%) foram negativas para IgG anti-*T. gondii*. (TABELA 2; FIGURA 1).

No grupo dos alérgicos, dentre as 95 amostras de soro estudadas, 22 (23,15%) dos pacientes foram positivos e 73 (76,85%) foram negativos para IgG anti-*T. gondii* (TABELA 2; FIGURA 1).

O grupo de pacientes normais, incluiu 95 pacientes do Hemocentro, que apresentou 6 (6,31%) de positividade para IgG e 89 (93,69%) foram negativos para IgG anti-*T. gondii* (TABELA 2; FIGURA 1).

A incidência de anticorpos IgG no grupo de pacientes da oncologia e alérgicos foi maior do que no grupo dos pacientes HIV+ e sadios, como demonstrado pela análise estatística. A comparação entre o grupo dos pacientes HIV+ e sadios apresentou $p=0,4287$, o que não diferencia estatisticamente, pois o $p > 0,05$.

TABELA 2 - Percentagem de indivíduos positivos e negativos para anticorpos IgG anti- *T. gondii* detectados pelo teste ELISA nos soros dos pacientes estudados.

IgG	Grupos de Pacientes			
	Oncologia	HIV +	Alérgicos	Sadios
Positivos	22 (22%)	9 (9%)	22 (23,15%)	6 (6,31%)
Negativos	78 (78%)	91 (91%)	73 (76,85%)	89 (93,69%)
Total	100 (100%)	100 (100%)	95 (100%)	95 (100%)

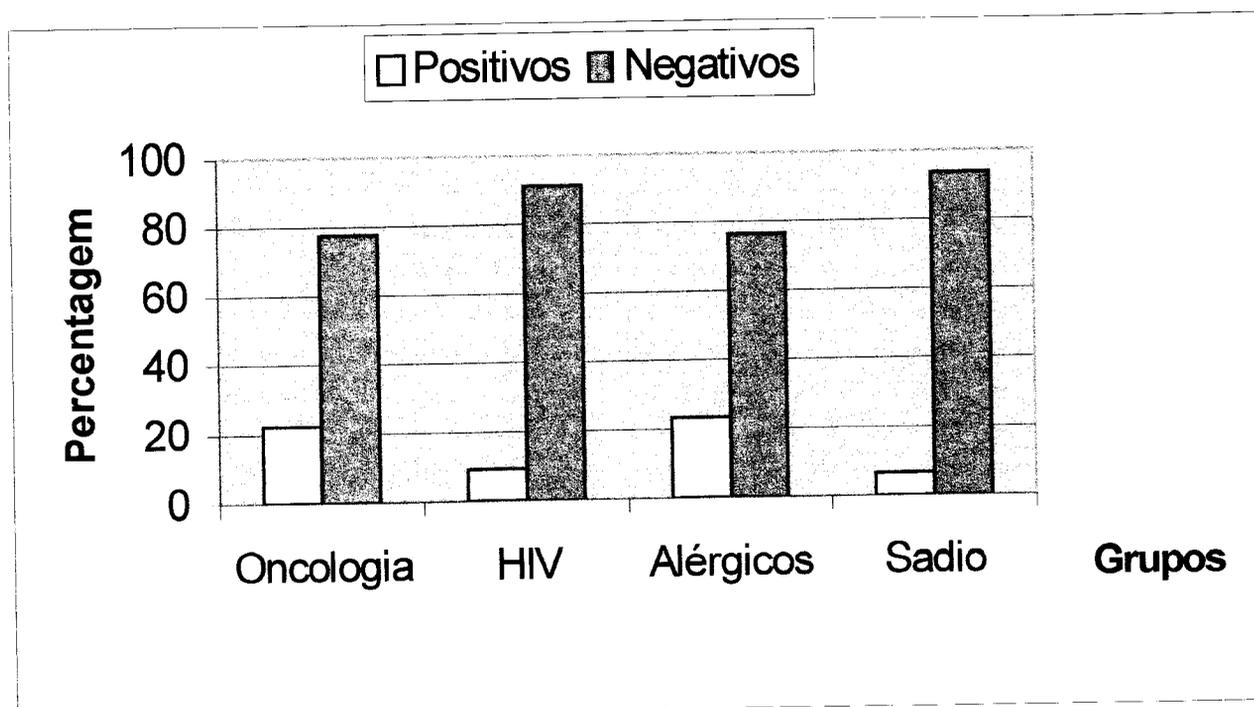


FIGURA 1 - Percentagem de indivíduos positivos e negativos para anticorpo IgG anti-*T. gondii*, encontrados pelo teste ELISA no soro de pacientes da oncologia, HIV+, alérgicos e sadios, no período de dezembro de 97 a junho de 98.

4.2.2 - Detecção de Anticorpos IgM anti-*T. gondii* nos grupos clínicos estudados

De acordo com a TABELA 3 e a FIGURA 2 os pacientes com câncer apresentaram 8 (8%) de positividade e 92 (92%) não apresentaram anticorpos IgM anti-*T.gondii*. Com relação aos pacientes HIV +, 24 (24%) das amostras foram positivas e 76 (76%) não apresentaram anticorpos IgM anti-*T. gondii*; enquanto que para o grupo dos alérgicos 19 (20%) das amostras foram positivas e 76 (80%) foram negativas. Dentre os pacientes não imunodeprimidos constatamos 15 (15,78%) de pacientes positivos e 80 (84,22%) de pacientes negativos.

A incidência de anticorpos IgM no grupo da oncologia foi menor do que nos grupos de pacientes HIV+, alérgicos, no entanto não apresentou diferença em relação aos pacientes sadios ($p = 0,1260$), como demonstrado estatisticamente. A comparação entre os pacientes HIV+ e alérgicos ($p = 0,3972$) e entre os HIV+ e sadios ($p = 0,1153$), e entre os alérgicos e sadios ($p=0,3656$) não apresentou diferença estatística em relação à presença de anticorpos IgM.

TABELA 3 - Percentagem de indivíduos positivos e negativos para anticorpo IgM anti-*T. gondii*, obtida pelo teste ELISA nos grupos clínicos estudados.

IgM	Grupos de Pacientes			
	Oncologia	HIV +	Alérgicos	Sadios
Positivos	8 (8%)	24 (24%)	19 (20%)	15 (15,78%)
Negativos	92 (92%)	76 (76%)	76 (80%)	80 (84,22%)
Total	100 (100%)	100 (100%)	95 (100%)	95 (100%)

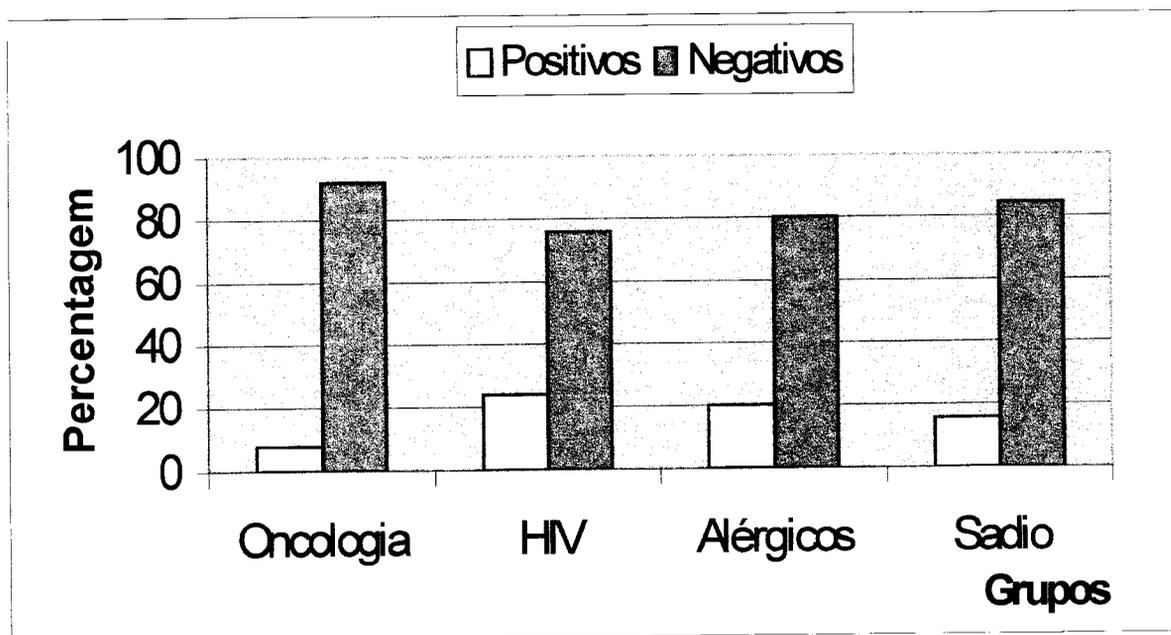


FIGURA 2 - Percentagem de indivíduos positivos e negativos para IgM, encontrados em soro de pacientes da oncologia, HIV +, alérgicos e sadios, no período de dezembro de 97 a junho de 98.

4.2.3 - Detecção de Imune-Complexos (Ic) IgG anti-*T. gondii* nos grupos clínicos estudados

O grupo de pacientes da oncologia apresentou 13 (13%) de casos positivos e em 87 (87%) não foi detectado o Ic. Para o grupo de pacientes HIV +, 7 (7%) tiveram Ic anti-*T. gondii* enquanto que 93 (93%) não apresentaram. No grupo de pacientes alérgicos independente do uso de corticosteróides 24 (25,26%) mostraram positividade e 71 (74,74%) mostraram-se negativos para Ic (TABELA 4 e FIGURA 3).

A incidência de Ic no grupo de pacientes da oncologia não diferiu estatisticamente dos pacientes HIV+ ($p = 0,1589$), porém quando comparamos o grupo de pacientes da oncologia com os sadios, a incidência de Ic nestes foi menor. Os sadios apresentaram maior incidência de Ic do que os pacientes HIV+ e alérgicos, no entanto não houve diferença estatística entre alérgicos e sadios.

TABELA 4 - Percentagem de indivíduos positivos e negativos para imunocomplexos formados pelo SAG 1-IgG nos diversos grupos clínicos estudados.

Ic	Grupos de Pacientes			
	Oncologia	HIV +	Alérgicos	Sadios
Positivos	13 (13%)	7 (7%)	24 (25,26%)	28 (29,47%)
Negativos	87 (87%)	93 (93%)	71 (74,74%)	67 (70,53%)
Total	100 (100%)	100 (100%)	95 (100%)	95 (100%)

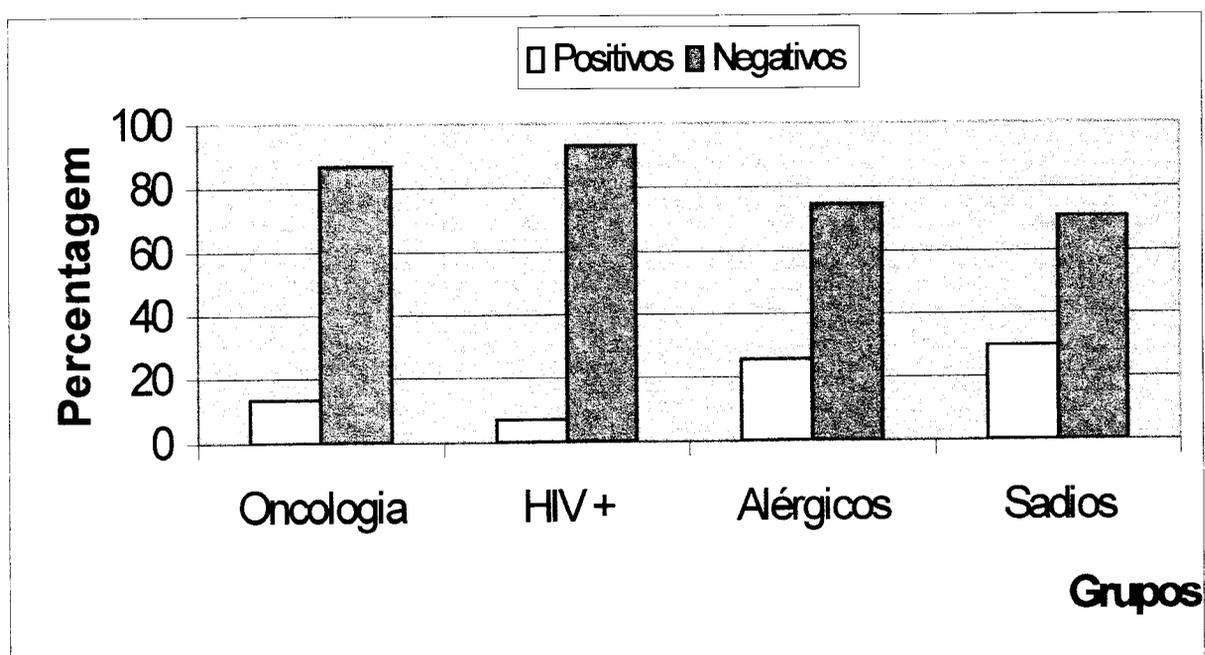


FIGURA 3 - Percentagem de indivíduos positivos e negativos para imunocomplexos, formados pelo SAG 1- IgG, encontrados pelo teste ELISA nos soros de pacientes da oncologia, HIV+, alérgicos, e sadios no período de dezembro de 97 a junho de 98.

4.2.4 - Incidência da infecção pelo *T. gondii*, com base na detecção de pelo menos um dos marcadores sorológicos usados para o estudo

O grupo de pacientes da oncologia apresentou 39 (39%) de indivíduos positivos e 61 (61%) de negativos, enquanto que o grupo dos pacientes HIV + mostrou 31 (31%) dos pacientes com positividade e 69 (69%) negativos; para o grupo dos alérgicos 50 (52,63%) são sorologicamente positivos para qualquer um dos marcadores sorológicos utilizados e 45 (47,37%) não possuem a infecção. Nos pacientes normais 36 (37,89%) foram positivos e 59 (62,11%) foram negativos para IgG ou IgM anti-*T. gondii* (TABELA 5; FIGURA 4).

A incidência de toxoplasmose entre os grupos estudados não apresentou diferença estatística.

TABELA 5 - Incidência de indivíduos positivos e negativos para ao menos um dos marcadores sorológicos utilizados (Ic ou IgG ou IgM).

Ic ou IgG ou IgM	Grupos de Pacientes			
	Oncologia	HIV +	Alérgicos	Sadios
Positivos	39 (39%)	31 (31%)	50 (52,63)	36 (37,89%)
Negativos	61 (61%)	69 (69%)	45 (47,37%)	59 (62,11%)
Total	100 (100%)	100 (100%)	95 (100%)	95 (100%)

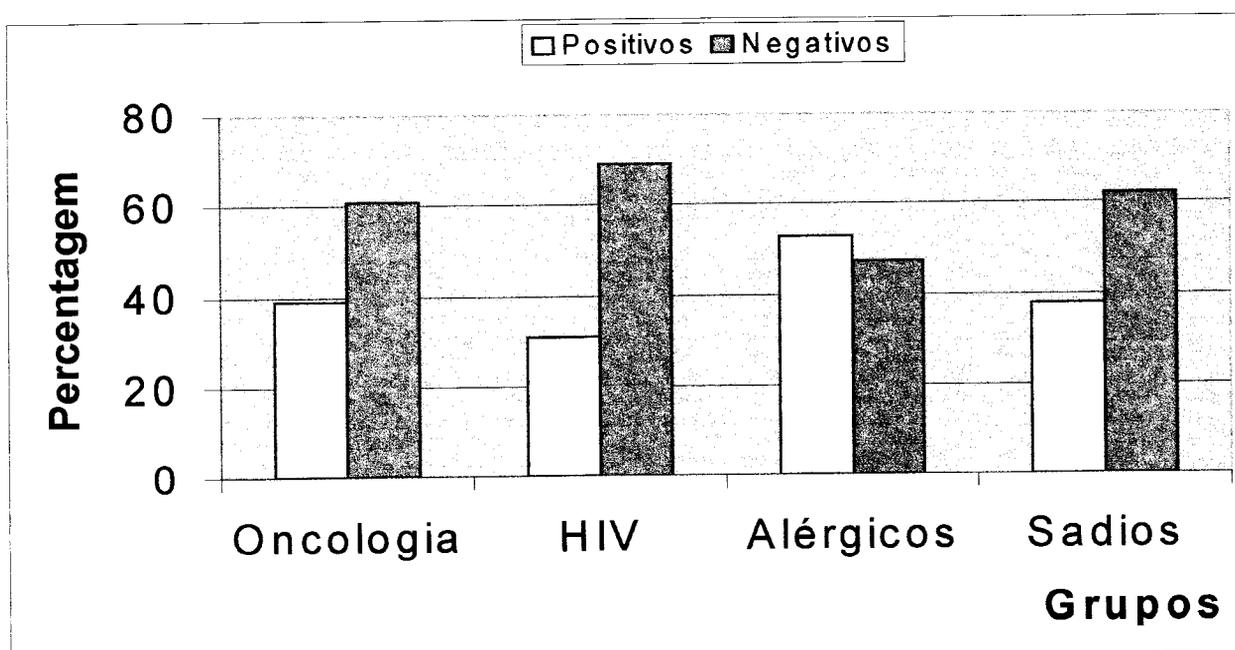


FIGURA 4 - Incidência de indivíduos positivos e negativos para ao menos um dos marcadores sorológicos utilizados (IgA ou IgG ou IgM), no estudo de pacientes da oncologia, HIV+, alérgicos e sadios, no período de dezembro de 97 a junho de 98.

4.2.5 - Detecção da tríade I_c/I_gG/I_gM nos pacientes da oncologia, HIV +, alérgicos e nos imunocompetentes

Os resultados da tríade I_c/I_gG/I_gM nas diversas combinações de positividade e negatividade, para os grupos em estudo, está demonstrado na TABELA 6 e FIGURA 5.

TABELA 6 - Número de amostras de soros que pelo teste ELISA apresentaram resultados positivos ou negativos para os marcadores moleculares I_c/I_gG/I_gM específicos para *T. gondii*.

Grupos I _c /I _g G/I _g M	Oncologia	HIV+	Alérgicos	Normais
+/+/+	0	1	1	1
-/-/-	65	70	45	65
+/-/-	9	4	13	17
-/+/-	19	2	16	2
-/-/+	4	16	12	5
+/+/-	3	2	6	3
-/+/+	0	5	2	2

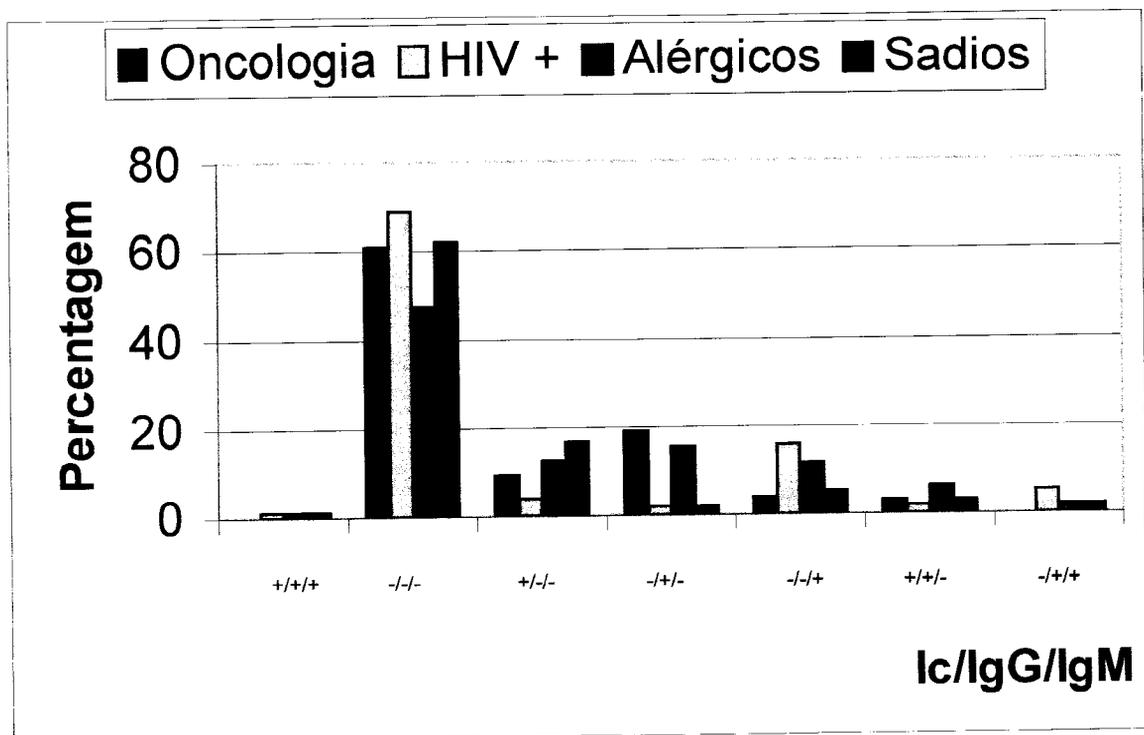


FIGURA 5 - Resultados da tríade I_c/I_gG/I_gM nas 100 amostras de soro dos grupos da oncologia e HIV + e nas 95 amostras dos grupos de alérgicos e de pacientes imunocompetentes, estudados no período de dezembro de 97 a junho de 98.

TABELA 7 - Percentagem de marcadores moleculares I_c/I_gG/I_gM anti-*T. gondii*, com base nos testes ELISA realizados no grupo de pacientes alérgicos que estão em uso ou não de corticosteróides.

Tratamento I _c /I _g G/I _g M	Corticoterapia esporádica	Corticoterapia prolongada	Sem uso de corticosteróides
-/-	9 (52,94%)	7 (53,85%)	30 (46,15%)
+/+/+	1 (5,88%)	0 (0%)	0 (0%)
+/-/+	1 (5,88%)	2 (15,38%)	5 (7,69%)
+/-/-	1 (5,88%)	1 (7,69%)	14 (21,54%)
-/+/-	4 (23,53%)	1 (7,69%)	8 (12,31%)
-/-/+	0 (0%)	2 (15,38%)	5 (7,69%)
+/+/-	1 (5,88%)	0 (0%)	2 (3,08%)
-/+/+	0 (0%)	0 (0%)	1 (1,54%)

4.3 - Obtenção da IgG de camundongo purificada

A solução purificada de anticorpo IgG obtida por cromatografia de afinidade apresentou uma concentração protéica de 2800 $\mu\text{g/ml}$, que foi diluída 280 vezes até atingir a concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$ para a sensibilização das placas.

4.4 - ELISA para pesquisar fator reumatóide

O fator reumatóide (auto anticorpo IgM anti-IgG) pode causar um resultado falso positivo (KASPER e BOOTHROYD, 1993) nos testes, por isso realizou-se este ensaio nas amostras positivas para Ic com maior absorvância e nos pacientes que possuíam Ic positivo e IgG/IgM negativos.

Nos pacientes da oncologia de 20 amostras positivas para Ic, 4 (20%) apresentaram resultados positivos para fator reumatóide. Para o grupo de amostras HIV + de 7 positivas para Ic, 2 (28,57%) apresentara fator reumatóide. Em relação aos pacientes alérgicos foram testadas 9 amostras positivas para Ic, nas quais encontrou-se 5 (55,55%) amostras com fator reumatóide. Nos pacientes normais de um total de 19 amostras positivas para Ic, obtivemos 2 (10,52%) amostras com fator reumatóide, dados apresentados na TABELA 6 e FIGURA 6.

A reatividade de 20,0% para fator reumatóide no grupo da oncologia foi menor do que nos pacientes HIV+ (28,6%), enquanto que nestes a reatividade foi menor do que a encontrada nos alérgicos (55,6%), sendo que a reatividade dos pacientes alérgicos foi maior do que a dos pacientes sadios (10,5%).

TABELA 8 - Número de amostras de soro positivas para fator reumatóide em relação ao total de imunocomplexos positivos nos quatro grupos estudados.

Reatividade	Grupos de Pacientes			
	Oncologia	HIV	Alérgicos	Sadios
Ic*	20	7	9	19
Fr**	4 (20%)	2 (28,6%)	5 (55,6%)	2 (10,5%)

* Imunocomplexo; ** Fator reumatóide

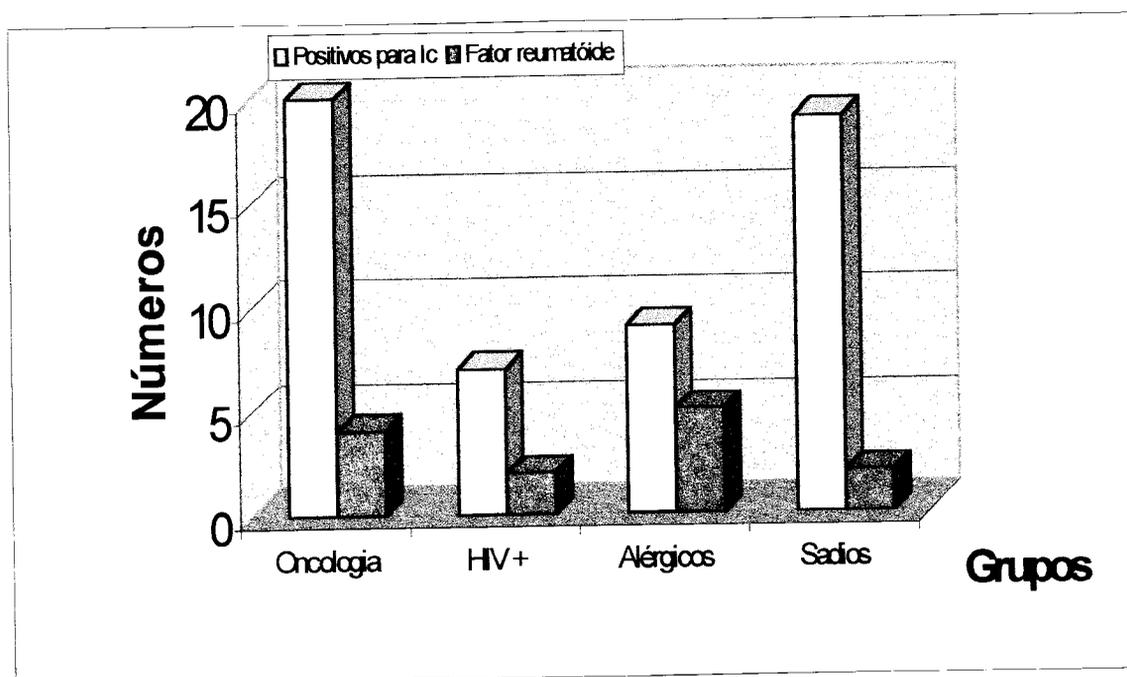


FIGURA 6 - Número de pacientes que apresentaram fator reumatóide em relação ao total de imunocomplexos positivos, encontrados nos soros de pacientes da oncologia, HIV+, alérgicos e sadios, estudados no período de dezembro de 97 a junho de 98.

4.5 - Especificidade dos ensaios imunoenzimáticos

Esse teste foi realizado em todas as amostras positivas para I_c que apresentaram IgG e IgM negativos e dentre essas aquelas que possuíam quantidade suficiente de soro.

Dentre as 24 amostras de soro testadas, 6 pertenciam a pacientes da oncologia, 2 pertenciam a pacientes alérgicos e 17 a pacientes normais. Como apresentado pela reação de "western blotting", todas as amostras apresentaram reação inespecífica para o anticorpo monoclonal 6E9, com exceção de duas amostras que apresentaram discreta reação inespecífica com a proteína albumina de peso molecular de 68 kDa, como demonstrado na FIGURA 7.

No segundo "western blotting" realizado, no qual foi transferida imunoglobulina G de camundongo não infectado pelo *T. gondii*, aplicou-se 12 amostras de soro, que incluíram 2 pacientes da oncologia, 2 alérgicos e 10 pacientes normais, onde todas as amostras testadas demonstraram reatividade, mostrando intensidade de marcação variável. O controle da reação (IgG de camundongo mais conjugado, na ausência de soro) manteve-se negativo, com ausência de marcação, como demonstrado na FIGURA 8.

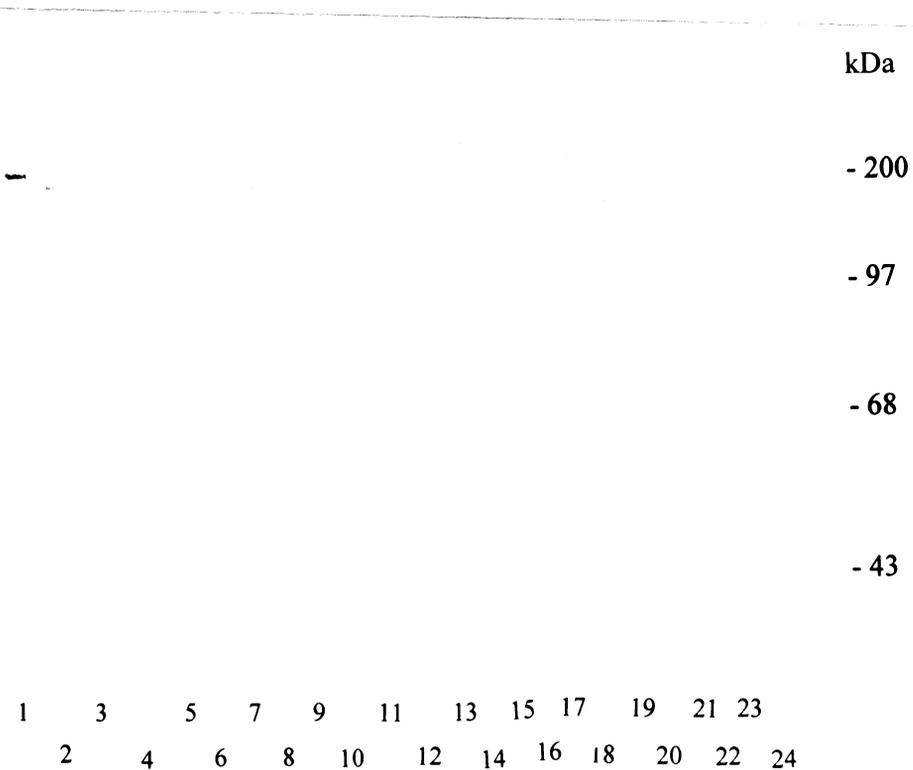


FIGURA 7 - Análise por "Western blotting" das amostras de soro imune complexo positivas para *T. gondii*, frente ao anticorpo monoclonal 6E9. Pistas (1a 5): pacientes da oncologia; Pistas (6 a 22): pacientes sadios; Pistas (23 e 24): pacientes negativos para I_c/I_gG/I_gM.

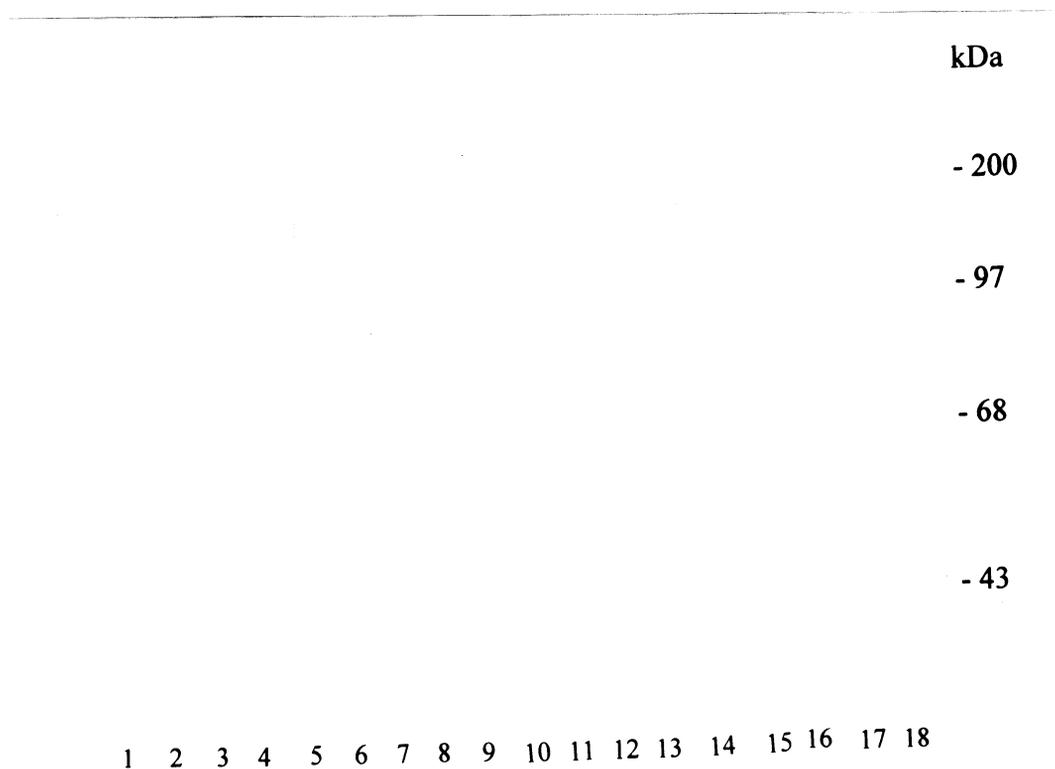


FIGURA 8 - Análise por "Western blotting" das amostras de soro imune complexo positivas para *T. gondii*, frente à IgG de camundongo normal. Pista 1: controle da reação, não foi aplicado soro; Pistas (2 a 4): soros negativos para imune complexo; Pistas (5 e 6): pacientes da oncologia; Pistas (7 a 16): pacientes sadios; Pistas (17 e 18): pacientes atópicos.

5 - *Discussão*

Dentre as amostras de soro estudadas do grupo da oncologia, HIV positivos, pacientes atópicos e pacientes saudáveis, foi verificada uma baixa incidência de IgG anti-*T. gondii* de 22% nos pacientes da oncologia, 9% nos pacientes HIV+, nos pacientes alérgicos de 22,15% e 6,31% nos pacientes sadios. A incidência deste anticorpo em pesquisa de líquor encontrada em outros estudos realizados na região é de 60 - 70%, como no caso de BORGES (1996).

Pacientes com câncer estão predispostos à infecções causadas por patógenos que normalmente não causam complicações em hospedeiros normais. Este fato se justifica pelos efeitos dos tratamentos das doenças neoplásicas como quimioterapia e radioterapia, assim como imunossupressão provocada pela própria doença (CHITKARA e SEPKOWITZ, 1994; DAGHER e LUCAS, 1996).

A baixa prevalência de IgG anti-*T. gondii* nos pacientes HIV+ encontrada no presente estudo pode ser atribuída à baixa sensibilidade do teste ELISA da maneira como foi padronizado, por problemas inerentes do conjugado.

Dados de literatura discutidos por LAMORIL, *et al.*, (1996), que estudou o diagnóstico de toxoplasmose por meio da pesquisa de *T. gondii* no sangue, através da técnica do PCR onde encontrou somente 16% de reatividade nos pacientes com sintomas de toxoplasmose cerebral. Com isso a hipótese mais provável é a de que os pacientes com sintomas neurológicos de toxoplasmose cerebral experienciaram uma reativação local, à qual não foi associada com uma disseminação hematôgena do parasita. Tal hipótese da literatura pode ser fundamentada, pois nos Estados Unidos a prevalência de toxoplasmose está estimada que de 25 a 47% de todos pacientes HIV+ desenvolveram encefalite causada por *T. gondii* e de 25 a 50% dos pacientes na Europa e Ásia também apresentam o mesmo quadro. No Brasil nos pacientes que morreram de AIDS, o principal patógeno que prejudica o SNC é o *T. gondii*. Num grupo de pacientes HIV+, que já desenvolveu a doença e possui anticorpos anti-*Toxoplasma*, existe 50% de chance de apresentar toxoplasmose cerebral (RAMIREZ *et al.*, 1997).

O uso de corticosteróides causa problemas à imunidade do indivíduo, eles provocam uma redistribuição de células T, especialmente na medula óssea, e afetam o início e progressão do ciclo da célula T, além do efeito provocado na produção de algumas citocinas que inibem o funcionamento da célula T. Ao contrário células B ativadas que permanecem relativamente resistentes à baixa dose de corticosteróides, mas uma alta-dose de corticosteróides diariamente, por um breve período de tempo, diminuirá níveis de imunoglobulinas no soro após 2 a 4 semanas de terapia (MARINO *et al.*, 1996).

Corticosteróides inibem o acesso e função das células sanguíneas brancas em locais inflamatórios, interferindo também na função de fibroblastos e células

endoteliais desses locais e suprimindo a produção e efeitos de fatores humorais (MARINO *et al.*, 1996).

A baixa prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma* encontrada nos pacientes alérgicos neste presente estudo pode ser relacionada à sensibilidade dos testes utilizados, ao contrário dos dados literários comentados acima que indicam uma possível imunossupressão provocada pelo uso de corticosteróides. Com isso não podemos discutir a prevalência nos pacientes atópicos correlacionando com o uso ou não de corticosteróides, como proposto no início do trabalho.

Quando os pacientes estão em terapia para controle de infecções, antígenos específicos desaparecem em intervalos diferentes. O parasita, pode ser controlado por drogas e assim antígenos secretados e excretados ficam baixos, então a sensibilidade da técnica pode não detectar esta concentração (FACHADO *et al.*, 1997).

Em relação aos pacientes sadios do Hemocentro, a baixa prevalência da infecção encontrada pode ser atribuída principalmente à sensibilidade do teste ELISA da maneira como foi padronizado, por problemas na titulação dos reagentes e como causas mais remotas podemos atribuí-las, a escolha de uma população não significativa, a um período de soroconversão que estes pacientes possam estar passando, à mudança de hábitos da população em geral, como não comer carne crua ou mal passada, aos maiores cuidados com as verduras ingeridas (hidroponias e até mesmo estufas), evitando dessa maneira a contaminação por fezes de gatos e a um menor contato com animais domésticos em geral, principalmente gatos.

No presente trabalho a incidência de anticorpos IgM anti-*T. gondii* apresentou 8% de reatividade no grupo da oncologia, 24% nos pacientes HIV +, 19% nos

alérgicos e 15% nos sadios, essa percentagem considerada relativamente alta, para dados de infecção inicial, pode ser atribuída a casos falso-positivos que o conjugado se ligou de maneira inespecífica.

Porém pela pesquisa em literatura sabe-se que anticorpos IgM específicos sugerem infecção primária, mas é difícil de deduzir o tempo de aquisição. Um resultado IgM positivo é um parâmetro inadequado de infecção recente por causa de sua persistência (reatividade IgM residual) por muitos meses ou até anos após infecção aguda, como em alguns casos de gravidez sucessiva em que a IgM permanece detectável, porém esta IgM é mais facilmente detectável pelo teste ELISA de captura (GORGIEVSKI-HRISOHO *et al.*, 1996). No entanto não foi este teste realizado no presente estudo.

De acordo com os resultados dos testes de especificidade em relação ao imune complexo Ic formado pelo Ag SAG 1 e Ac IgG, a percentagem encontrada não pode ser correlacionada com a incidência da infecção, pois houve reação inespecífica. No entanto em literatura a detecção de imune complexo indica uma possível reativação, sendo esta hipótese sustentável desde que disfunções da resposta imune celular envolvendo principalmente linfócitos T e macrófagos forem identificadas. A presença de níveis não detectáveis de anticorpos anti-*T. gondii*, não exclui a possibilidade da infecção sendo que o diagnóstico se complementa com estudos de sinais clínicos, e exames de tomografia computadorizada ou imagem de ressonância magnética (CHITKARA & SEPKOWITZ, 1994).

O estudo de complexos imunes é um importante passo para melhorar a sorologia e o entendimento dos mecanismos de infecção persistente e imunopatologia das doenças parasitárias crônicas, nas quais grande quantidade de

antígeno do parasita, correspondente anticorpo, e complexos imunes podem estar presentes.

O achado de complexos imunes circulantes está associado não somente com doença clínica, mas também com o estabelecimento da infecção por *Toxoplasma*, como caracterizado por um teste de fixação de complemento. A detecção de imune complexos representa uma amplificação de antígenos circulantes livres detectáveis. Em outras palavras, a presença de imune complexos no soro é um reflexo de antígeno liberado de cistos teciduais ou disseminação do parasita no sangue após exposição primária (VAN KNAPEN *et al.*, 1985; LAPPIN *et al.*, 1993).

É estranho que em doadores de sangue saudáveis seja encontrado um número considerável de imune complexos positivos, como no caso deste estudo. Dados de literatura relataram a ocorrência de antigenemia em gatos saudáveis, cronicamente infectados e pessoas (LAPPIN *et al.*, 1993). É o mesmo caso de pacientes sem qualquer outra indicação sorológica, onde encontrou-se uma infecção toxoplasma ativa (VAN KNAPEN *et al.*, 1985).

Este fato de uma proporção relativamente alta de indivíduos saudáveis apresentarem, imune complexos positivos, também foi sugerido por Siegel e Remington, apud VAN KNAPEN *et al.*, (1985) e merece maior discussão.

A ativação de toxoplasmose latente por outras doenças ou supressão imune são bem conhecidas, entretanto toxoplasmose reativada em indivíduos imunocompetentes é freqüentemente sugerida, mas dificilmente comprovada. Relatos de exacerbação de toxoplasmose ocular crônica e a parasitemia periódica em pacientes assintomáticos suportam a hipótese de que em uma população

humana com uma soropositividade média, até 50% de ocorrência assintomática possa ocorrer regularmente (VAN KNAPPEN *et al.*, 1985).

Em literatura foi constatado que para excluir a possibilidade dos indivíduos saudáveis que apresentam I_c positivo e que possa ter ocorrido reações não específicas ou anticorpos anti-idiotípicos, e que estes poderiam ser os responsáveis pela reatividade dos complexos imunes, algumas amostras de soro foram precipitadas com polietileno glicol (PEG), onde foi excluída tal possibilidade (VAN KNAPPEN *et al.*, 1985).

Porém o uso desse marcador sorológico para diagnóstico de *T. gondii* no soro de pacientes humanos neste estudo, mostrou-se com problemas, pois quando observamos o teste de especificidade com a IgG de camundongo normal que teve total reatividade com essas amostras de soro, deve-se ficar atentos para a existência de proteínas no soro desses pacientes que reagiram inespecificamente.

Assim, a interpretação de um teste positivo para imune complexo requer grande cuidado e deve ser combinado com os resultados de outros testes sorológicos.

Essa baixa sensibilidade dos testes aplicados nesses pacientes, alerta para a necessidade de padronizações mais eficientes para o diagnóstico de toxoplasmose.

6 - Conclusão

Amostras de soros não se comportaram como material biológico apropriado para a detecção de imune complexo antígeno P30 de *T. gondii* - IgG, considerando-se o grau de especificidade do teste estudado.

7 - Referências Bibliográficas

- 1 BARONE, A. A. Panorama atual da especialidade: doenças infecciosas e parasitárias? infectologia? medicina tropical? **Revista Âmbito® Hospitalar**, v. 8, n. 100, p. 41 – 56, jul. 1997.

- 2 BORGES, F. A. C. **Pesquisa do antígeno SAG – 1 P(30) de *Toxoplasma gondii* simultaneamente à detecção de anticorpo e imune-complexos em amostras de líquido cefalorraquidiano, reagentes e não reagentes para anticorpos anti-HIV.** Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 1996. 175 p. (Tese, Mestrado).

- 3 BORGES, F. A. C., MINEO, J. R. **Medidas de biossegurança em laboratório.** Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 1997.

- 4 CHITKARA, N., SEPKOWITZ, K. Central nervous system infections in cancer patients. **Infect Med**, v. 11, n. 11, p. 707-710, 1994.
- 5 CUNHA, S., FERREIRA, E., RAMOS, I., MARTINS, R., FREITAS, L. F., BORGES, T. L., CÔRTE-REAL, R., MOTA, A., MELIÇO-SILVESTRE, A., LINHARES FURTADO, A. Toxoplasmose cerebral em transplantado renal. Caso clínico e revisão da literatura. **Acta Médica Portuguesa**, v. 6, p. 157 - 163, 1993.
- 6 DAGHER, R. LUCAS, K. Toxoplasmosis in the patient with cancer. **Infect Med**, v. 13, n. 12, p. 998 - 1000, 1996.
- 7 FACHADO, A., FONSECA, L., FONTE, L., ALBERTI, E., COX, R., BANDERA, F. *Toxoplasma gondii* antigenuria in patients with acquired immune deficiency syndrome. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 5, p. 589 - 593. Sep/oct.. 1997.
- 8 FORTES, L. **Parasitologia Veterinária**. 3 ed. São Paulo: Ícone, 1997.
- 9 GALLINO, A., MAGGIRINI, M., KIOWSKI, W., MARTIN, X., WUNDERLI, W. SCHNEIDER, J., TURINA, M., FOLLATH, F. Toxoplasmosis in heart transplant recipients. **European Journal Clinical Microbiologic Infect Disease**, v. 15, n. 5, p. 389 - 393, 1996.

- 10 GORGIEVSKI-HRISOHO, M., GERMANN, D., MATTER, L. Diagnostic implications of kinetics of immunoglobulin M and A antibody responses to *Toxoplasma gondii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 6, p. 1506 – 1511, 1996.
- 11 GROSS, U.; KEKSEL, O; DARDE, M. L. Value of detecting immunoglobulin and antibodies for the serological diagnosis of *T. gondii* infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 4, n. 3, p. 247 – 251, 1997.
- 12 GUIMARÃES, A. C. S., KAWARABAYASHI, M., BORGES, M. M., TOLEZANO, J. E., ANDRADE Jr., H. F. Toxoplasmosis seronegativity regional variation in São Paulo metropolitan area. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 35, supl. 10, 1993.
- 13 KASPER, L. H., BOOTHROYD, J. C. *Toxoplasma gondii* and toxoplasmosis. In: WARREN, K. S. **Immunology and molecular biology of parasitic infections**, 3 ed. Blakwell Scientific Publications, p. 269 – 301, 1993.
- 14 KASPER, L. H., KHAN, I. A. Role of P30 in host immunity and pathogenesis of *Toxoplasma gondii* infection. **Research in Immunology**, v. 144, n. 1, p. 45 – 48, 1993.
- 15 KASPER, L. H., MINEO, J. R. Attachment and invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. **Parasitology Today**, v. 10, n. 5, p. 184 – 188, 1994.

- 16 LAMORIL, J., MOLINA, J.M., GOUVELLO, A., GARRIU, Y.J., DEYBACH, J.C., MODAI, J., DEROURI, F. Detection by PCR of *Toxoplasma gondii* in blood in the diagnosis of cerebral toxoplasmosis in patients with AIDS. **Journal Clinical Pathology**, v. 49, n. 1, p. 89 - 92, jan. 1996.
- 17 LAPPIN, M. R., CAYATTE, S., POWELL, C. C., GIGLIOTTI, A., COOPER, C., ROBERTS, S. M. Detection of *Toxoplasma gondii* antigen-containing immune complexes in the serum of cats. **American Journal Veterinary Research**, v. 54, n. 3, p. 415 - 419, mar. 1993.
- 18 LIMA, L. A. A. Toxoplasmose e aids. **Anais da Academia Nacional de Medicina**, v. 155, n. 4, p. 232 - 235, 1995.
- 19 LIN, D. S., SU, W. L. Comparison of four diagnostic techniques for detecting *T. gondii* infection in cats, dogs and humans. **Acta Zoologica Taiwanica**, v. 8, n. 1, p. 3 - 13, 1997, Chinese.
- 20 LOUREIRO, S. C. C., LACERDA, R. A. Doenças oportunistas em portadores de HIV: riscos de transmissão e medidas de precaução. **Revista Âmbito[®] Hospitalar**, v. 8, n. 100, p. 57 - 71, jul. 1997.
- 21 MARINO, C., McDONALD, E., ROMANO, J. Corticosteroid use in HIV disease. **The AIDS Reader**, v. 6, n. 1, p. 29 - 32, 1996.

- 22 NAGY, S., HAYDE, M., PANZENBOECK, B., ADLASSING, K. P., POLLAK, A.
TOXOPERT – I: Knowledge – based automatic interpretation of serological tests for toxoplasmosis. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 53, n. 2, p. 119 – 133, 1997.
- 23 NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 9 ed. São Paulo: Atheneu, 1995. Cap. 16: *Toxoplasma gondii*, p. 164 – 176.
- 24 NETO, V. A., MEDEIROS, E. A. S., LEVI, G. C., DUARTE, M. I. S.
Toxoplasmose. 4 ed. São Paulo: Sarvier, 1995. Cap. Toxoplasmose em pacientes imunodeprimidos, p. 50 – 52.
- 25 PFERFFERKON, E. Cell Biology of *Toxoplasma gondii*. In “**Modern Parasite Biology. Cellular Immunological and molecular aspects**”, p. 26 – 50, Freeman, New York, 1990.
- 26 RAMIREZ, M. L. G., ALVARADO, V. V., GUTIERREZ, G. V., GONZÁLEZ, O. J., COSIO, C. G., SANDOVAL, M. V. Prevalence of IgG and IgM anti-Toxoplasma antibodies in patients with HIV and acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 6, p. 465 – 467, nov.-dez. 1997.
- 27 RAMZI, D., KENNETH, L. Toxoplasmosis in the patient with cancer. **Infect Med**, v. 13, n. 2, p. 998 – 1051, 1996.

- 28 REY, L. **Bases da Parasitologia Médica** 3 ed. – Rio de Janeiro: Koogan, 1993.
Cap. 11: Toxoplasmose, p. 96 – 105.
- 29 ROBERT, F., QUATAS, T., BLANCHE, P., TOURTE-SCHAEFER, C., SICARD, D., DUPONY-CARNET, J. Retrospective evaluation of the detection of *T. gondii* by polymerase chain reaction in Aids patients. **Presse – Med**, v. 25, n. 11, p. 541 – 545, mar., 1996, French.
- 30 SCHÖELLER, M. T. Dor neoplásica abordagem e tratamento. **Revista Âmbito[®] Hospitalar**, v. 8, n. 100, p. 13 – 18, jul. 1997.
- 31 SMITH, J. E. A ubiquitous intracellular parasite: the cellular biology of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 25, n. 11, p. 1301- 1309, 1995.
- 32 VAN KNAPEN, F., PANGGABEAN, S. O., VAN LEUSDEN, J. Demonstration of *Toxoplasma* antigen containing complexes in active toxoplasmosis. **Journal Clinical Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 645 - 650, oct. 1985.
- 33 VERONESSI, R. **Doenças infecciosas e parasitárias**. 8 ed. São Paulo – Koogan, 1995. Cap. 88: Toxoplasmose, p. 734 – 749.