

PATRICIA TEIXEIRA MARCOLINO

*Marcadores Antigênicos das Fases Recente,
de Transição e Crônica da Toxoplasmose
Humana: Determinação da Avidéz de Anticorpos
IgG por Immunoblotting*

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Uberlândia,
como parte das exigências do Curso
de Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas para
Obtenção do título de Mestre.

SISBI/UFU



1000193770

Uberlândia
Minas Gerais – Brasil
2000

MON
616.993.1
M321m.
TES/MEM

**MARCADORES ANTIGÊNICOS DAS FASES RECENTES,
DE TRANSIÇÃO E CRÔNICA DA TOXOPLASMOSE HUMANA:
DETERMINAÇÃO DA AVIDEZ DE ANTICORPOS IgG POR
*IMMUNOBLOTTING***

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Uberlândia,
como parte das exigências do Curso
de Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas para
Obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. José Roberto Mineo
Orientanda: Patrícia Teixeira Marcolino

Uberlândia
Minas Gerais – Brasil
2000

Trabalho realizado no Laboratório de Imunologia do Departamento de Patologia da Universidade Federal de Uberlândia, sob orientação do Prof. Dr. José Roberto Mineo e com auxílio financeiro da CAPES.

*Aos meus pais José Carlos Marcolino e
Vanir Teixeira Marcolino, a quem devo todo
o apoio na concretização de mais um de
meus ideais.*

*“A verdadeira viagem de descobrimento
consiste não em procurar novas
paisagens mas em possuir novos olhos”*

(Marcel Proust)

Agradecimentos especiais

À Deise Aparecida de Oliveira Silva, pela amizade, cooperação e pelos valiosos ensinamentos.

Ao professor Dr. José Roberto Mineo, pela orientação, incentivo na minha iniciação à pesquisa científica e pelos ensinamentos .

Agradecimentos.

Aos Drs. Mario E. Camargo e Paulo G. Leser, por ter cedido gentilmente as amostras de soros humanos.

Às grandes amigas Elizabeth Oliveira, Gabriela Ferreira e Aurélia Gervasio, pela amizade, ajuda prestada no transcorrer deste trabalho e pelos inúmeros momentos de alegria. Obrigada.

Aos amigos Guilherme Rosemberg, Antonio Tomás, Hélio Elias, por terem compartilhado comigo todos os sucessos e insucessos deste trabalho.

Aos professores Ernesto Taketomi, . Silvio Favoreto, Neide Maria da Silva, Flávia Andrade, Erika de Arruda, Eloísa Amália, Janethe Pena pelas sugestões e apoio para o aprimoramento deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia, Elaine, Silvia, Juliana, Henrique, Tiago, Fernanda, Mônica, Danielle, Omar, Hugo, Gustavo, Carolina, Sinval, João, Juliano, Fabiana por estarem sempre presentes em todos os momentos.

Ao secretário do curso, João Martins Neto, pelos auxílios prestados e apoio.

A Capes, pelo auxílio financeiro.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Sumário

	Páginas
1- Introdução	2
1.1- Toxoplasmose: Definição	2
1.2- <i>Toxoplasma gondii</i> : Classificação	2
1.3- Histórico	3
1.4- Formas evolutivas	4
1.4.1- Taquizoítas	4
1.4.2- Bradizoítas	4
1.4.3- Esporozoítos	5
1.5- Ciclo evolutivo	5
1.6- Transmissão	6
1.7- Epidemiologia	7
1.8- Aspectos clínicos	8
1.8.1- Toxoplasmose Congênita	8
1.8.2- Toxoplasmose e AIDS	10
1.8.3- Toxoplasmose ocular	10
1.9- Antígenos de <i>Toxoplasma gondii</i>	11
1.10- Diagnóstico sorológico	14
1.11- Avidéz	16
2- Objetivo	22

3- Material e Métodos	24
3.1- Amostras de soros	24
3.2- Antígenos de <i>T.gondii</i>	25
3.3- ELISA-Avidez	26
3.4- Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	28
3.5- <i>Immunoblotting</i> -Avidez	29
3.6- Análise estatística	31
3.7- <i>Immunoplot</i>	32
4- Resultados	34
4.1- ELISA-Avidez	34
4.2- <i>Immunoblotting</i> -Avidez	38
5- Discussão	59
6- Conclusões	69
7- Summary	72
8- Resumo	74
9- Referências Bibliográficas	76

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1-Toxoplasmose: Definição

Toxoplasmose é uma doença sistêmica, causada por *Toxoplasma gondii* (FRENKEL, 1995). *T. gondii* é um protozoário intracelular obrigatório, semelhante aos coccídeos e aos plasmódios (REY, 1991), que acomete uma grande variedade de mamíferos e aves domésticas e silvestres, como também espécies de animais de sangue frio (DE ALENCAR, 1957; LEVINE, 1977).

1.2-*Toxoplasma gondii*: Classificação

T. gondii classifica-se entre os seres vivos, segundo NEVES *et al.*, (1995), como:

REINO PROTISTA

SUBREINO PROTOZOA

FILO APICOMPLEXA

CLASSE SPOROZOASIDA

SUBCLASSE COCCIDIASINA

ORDEM EUCCIDIDA

SUBORDEM EIMERINA

FAMÍLIA SARCOCYSTIDAE

GÊNERO TOXOPLASMA

ESPÉCIE *Toxoplasma gondii*

1.3-Histórico

Toxoplasma gondii foi descoberto por Charles Nicolle e Louis Manceaux em *gondii* (*Ctenodactylu gondii*, Pallas, 1778), roedor do norte da África, quando estes estudavam a epidemiologia da leishmaniose no Instituto Pasteur de Túnis, em 1908 (MOULIN, 1993). No Brasil, *Toxoplasma* foi descoberto por Splendore no mesmo ano, em coelhos de laboratório na cidade de São Paulo (FRENKEL, 1995).

Toxoplasma foi identificado esporadicamente em animais e homens por um longo período, mas foi somente a partir de 1937 que Wolf e Cowan relataram casos concretos da doença em crianças recém-nascidas acometidas da transmissão transplacentária, mediante o isolamento do parasito por inoculações em animais (FRENKEL, 1995).

Com o desenvolvimento do diagnóstico, baseado no “dye-test” por Sabin, em 1960, tornou-se possível associar outras síndromes ao *Toxoplasma* como também facilitar a detecção da infecção (JACKSON & HUTCHISON, 1989). Conseqüentemente, foram reconhecidas altas prevalências de infecções assintomáticas em animais e na espécie humana. A doença sintomática representava apenas o pequeno pico de um grande “iceberg” submerso.

1.4-Formas evolutivas

Toxoplasma gondii apresenta uma morfologia múltipla, dependendo do seu habitat e do estágio evolutivo em que se encontra (KAWAZOE, 1995). As principais formas que este parasita apresenta durante o seu ciclo evolutivo são:

1.4.1-Taquizoítas

Denominadas de formas proliferativas, possuem morfologia em forma de arco, motivo pelo qual originou o nome ao gênero *Toxoplasma* (toxon = arco). Apresentam alta motilidade e uma multiplicação rápida por endodiogenia. São encontradas no citoplasma de vários tipos celulares envoltas por vacúolos parasitóforos. À microscopia eletrônica, observa-se um complexo apical anterior, constituído por um anel cônico e polar, roptrias e micronemas. Próximo ao centro, nota-se um núcleo, mitocôndrias, um aparelho de Golgi e, na superfície, microtúbulos que conferem sua motilidade (SOUZA, 1974 *apud* FRENKEL, 1995).

1.4.2-Bradizoítas

Formas geralmente encontradas na fase crônica da infecção, apresentando multiplicação lenta dentro de cistos, também pelo processo de endodiogenia (NEVES *et al.*, 1995). Podem ser encontradas no cérebro, retinas, músculos esqueléticos e cardíacos (FRENKEL, 1995). Seu desenvolvimento se dá em vacúolos citoplasmáticos, cujas membranas transformam-se em cápsulas dos cistos. Resistentes e elásticas, estas cápsulas mantêm os bradizoítas até certo ponto

protegidos da ação dos mecanismos imunológicos do hospedeiro, podendo persistir durante toda a vida deste (NEVES *et al.*, 1995).

1.4.3-Esporozoítos

Os esporozoítos desenvolvem-se no interior dos esporocistos, nos oocistos; estes por sua vez, desenvolvem-se a partir dos gametócitos em gatos domésticos e outros *Felidae* (PFEFFERKORN, 1990; KAWAZOE, 1995). Por via oral, os oocistos se revelam altamente infectantes para muitas aves e mamíferos, como o homem (AMENDOEIRA, 1995).

Esta ampla especificidade para células e hospedeiros sugere que este parasita deva ter receptores altamente conservados, os quais viabilizam o sucesso do seu parasitismo intracelular (BORGES, 1996).

1.5-Ciclo evolutivo

O ciclo de vida deste parasita é heteroxeno. A fase sexuada ocorre somente nas células epiteliais do intestino delgado de gatos e outros felídeos jovens (PESSOA, 1982). Deste modo, em gatos jovens não imunes, infectados oralmente por oocistos, cistos ou taquizoítas, por esquizogonia, dar-se-á a formação dos gametas (DENKERS & GAZZINELLI, 1998). Posteriormente à fusão dos gametas, o zigoto se desenvolve originando os oocistos não infectantes. Na presença de oxigênio e temperatura adequada, os oocistos eliminados pelas fezes, esporulam de um a três dias, tempo durante o qual se tornam infectantes para mamíferos e pássaros e, eventualmente, para o homem.

Uma vez ingeridos por hospedeiros susceptíveis, os taquizoítas, esporozoítas ou bradizoítas sofrerão intensa multiplicação, após rápida passagem pelo epitélio intestinal e formação de vacúolo citoplasmático em vários tipos de células do organismo. Após romper as células, novos taquizoítos serão liberados invadindo novas células (FRENKEL, 1995). Essa disseminação do parasito no organismo ocorre através de taquizoítas livres, que provocará um quadro polissintomático, cuja gravidade dependerá da quantidade de formas infectantes adquiridas, cepa do parasita e da resistência do hospedeiro (KAWAZOE, 1995).

O desenvolvimento da imunidade celular e humoral faz com que os parasitas extracelulares se encistam no interior das células, podendo permanecer assim, durante toda a vida do hospedeiro (DENKERS & GAZZINELLI, 1998).

1.6-Transmissão

A infecção por *T. gondii* se dá predominantemente pela ingestão de oocistos, eliminados pelas fezes dos gatos ou de outros felídeos. Estes oocistos que podem permanecer viáveis no solo por longo tempo, resistindo às variações de temperatura e umidade, possibilitando até mesmo a transmissão pela inalação de poeiras contaminada (AMENDOEIRA, 1995).

O homem também pode adquirir a infecção pela ingestão de cistos presentes em carnes cruas ou mal cozidas, por infecção transplacentária

e por contato de taquizoítas presentes em secreções (salivas, esperma, leite) (KAWAZOE, 1995). A infecção pode ainda ocorrer através de órgãos transplantados e acidentes laboratoriais (NEVES, *et al.*, 1995).

1.7-Epidemiologia

T. gondii é um protozoário que possui uma distribuição geográfica mundial, com elevada prevalência sorológica entre as diferentes populações (OKAY, 1994).

Estima-se que cerca de 20 a 90% da população adulta no mundo já tiveram contato com o parasito (GALVÁN-RAMIREZ *et al.*, 1998). No Brasil, a prevalência de anticorpos varia de 54% no Centro-Oeste a 75% no Norte (RICCIARDI, *et al.*, 1978 *apud* FRENKEL, 1995).

Esta infecção parece não estar correlacionada com sexo e grupo racial ou étnico. Contudo, estudos epidemiológicos revelam, através da detecção de anticorpos séricos específicos, que a prevalência é crescente com os grupos etários, atingindo valores variáveis para diferentes populações. Sabe-se que na cidade do Rio de Janeiro, em 1997, foram referidas prevalências sorológicas de 32% em crianças de 5 anos, de 59% de 6-10 anos, de 69% de 11-15 anos e de 71% em pessoas de 16-20 anos (SOUZA *et al.*, 1997).

1.8-Aspectos clínicos

As infecções causadas por *T. gondii* oferecem grandes desafios aos clínicos, oftalmologistas, epidemiologistas e pesquisadores. A sintomatologia raramente sugere a doença, podendo a infecção evoluir de maneira oligossintomática (BENCHIMOL & MOREIRA, 1995).

Responsável por uma alta taxa de morbidade na espécie humana, *T. gondii* contribui não só para o aumento da mortalidade intra-uterina, peri e pós-neonatal (GARCIA, 1995), mas principalmente para a origem de lesões preferencialmente localizadas no sistema nervoso central e aparelho ocular, que podem se manifestar em qualquer época da vida do hospedeiro (LIMA, 1995).

Em imunocompetentes, a toxoplasmose assume, em geral, caráter benigno, pois o rápido desenvolvimento da imunidade humoral e celular destes indivíduos, restringe eficientemente a ação patogênica dos parasitas que são segregados em microcistos assumindo a forma cística de resistência, caracterizando a forma crônica da infecção (CAMARGO, 1995). Assim, é comum que na fase aguda, a infecção se mantenha em níveis subclínicos ou apenas com manifestações semelhantes às das síndromes das mononucleoses, de pouca expressão clínica. (DENKERS & GAZZINELLI, 1998).

1.8.1-Toxoplasmose Congênita

A infecção primária causada por *T. gondii* em gestantes, pode levar a uma infecção congênita com graves conseqüências ao feto (GARCIA,

1995). Muitos destes neonatos infectados são assintomáticos nos seus primeiros meses de vida; contudo, a maioria podem desenvolver seqüelas durante a infância ou adolescência (KOPPE *et al.*, 1986 *apud* LAPPALLAINEN, *et al.*, 1993).

Na cidade de São Paulo, a prevalência da soronegatividade para *T. gondii*, determinada em 1286 gestantes, apresentou uma alta freqüência de 41% (GUIMARÃES *et al.*, 1993).

Os efeitos que podem ocorrer devido à infecção materna por *Toxoplasma* ao feto são determinados pelo estágio da gestação em que se encontra a mãe (DESMONTS & COUVREY, 1978). Assim, uma infecção primária ocorrida entre a 10^a e 24^a semanas de gestação pode resultar em grandes riscos para o feto (CHUMPITAZI *et al.*, 1995). Desta forma, a toxoplasmose congênita tem usualmente manifestação subclínica, se a infecção ocorre após o terceiro mês de gestação (FRENKEL, 1995).

Devido a estes fatores, a importância de se fazer uma estimativa precisa do tempo da infecção, é muito importante em gestantes para o início de um tratamento, uma vez que o abortamento terapêutico só é recomendado em casos muito graves de toxoplasmose congênita (CHUMPITAZI *et al.*, 1995).

1.8.2-Toxoplasmose e AIDS

A toxoplasmose na AIDS é quase que exclusivamente devido à reativação da infecção crônica latente (LIMA, 1995), resultado da progressiva imunodeficiência que os indivíduos desenvolvem.

A incidência da reativação da toxoplasmose está diretamente relacionada à prevalência da infecção por *T. gondii* e do estágio da infecção pelo vírus HIV nos indivíduos da população (KASPER *et al.*, 1993). Desta maneira, quanto maior a prevalência da infecção por *T. gondii* na população, maior o número de casos de toxoplasmose associados a AIDS.

Em indivíduos portadores do vírus HIV, a incidência da reativação da infecção por *Toxoplasma* é de 5 a 33% (KASPER *et al.*, 1993). Dentre estes indivíduos, 25-50% podem desenvolver encefalite toxoplásmica (ZANGERLE *et al.*, 1991), lesão mais freqüente e grave, caracterizada por sinais iniciais variados como febre, desorientação, paralisias, convulsões e coma (REMINGTON, 1974).

1.8.3-Toxoplasmose ocular

A infecção ocular causada por *T. gondii*, na fase crônica, está relacionada com a presença das formas císticas na retina, e na maioria dos casos, esta infecção é originada da transmissão congênita, onde consiste a hipótese que esta doença pode ser a consequência da tolerância imunológica desenvolvida pelo feto (DENKERS & GAZZINELLI, 1998).

Estas recorrências acontecem com freqüência podendo provocar danos progressivos como também uma conseqüente perda da visão (BENCHIMOL & MOREIRA, 1995).

A retinocoroidite é uma das mais sérias complicações observadas e ocorre em 30 a 60 % dos pacientes com toxoplasmose (FRENKEL, 1995).

Estudos realizados no sul do Brasil demonstram que a toxoplasmose é comum nesta região, com incidências significantes de lesões oculares causadas por *T. gondii*. (GLASNER *et al.*, 1992; GARCIA *et al.*, 1999).

1.9-Antígenos de *Toxoplasma gondii*

Informações específicas sobre os vários antígenos de *T. gondii* foram obtidas nos últimos anos pelo auxílio de técnicas laboratoriais que envolvem anticorpos monoclonais e clonagem de genes.

Para entender o mecanismo de aderência e invasão de *T. gondii* às células hospedeiras é essencial que se conheça também os antígenos de superfície celular do parasita (GRIMWOOD & SMITH, 1996). O antígeno SAG1 (p30), por exemplo, está diretamente envolvido nestes processos de invasão (KASPER & MINEO, 1994).

Os anticorpos contra p30 são altamente específicos para a infecção aguda de *T. gondii*, porque esta proteína de superfície do

taquizoíta é altamente imunogênica, induzindo intensas respostas nos pacientes com toxoplasmose aguda (GROSS *et al.*, 1992).

Algumas proteínas de *T. gondii*, de pesos moleculares variados, são reconhecidas pelos anticorpos IgM, IgA e IgG de pacientes com toxoplasmose aguda ou crônica, dependendo da cepa e do estágio da infecção (KASPER, 1989; ZOTTI *et al.*, 1989), reforçando a hipótese de antígenos estágio-específicos.

Certamente, os componentes antigênicos preferencialmente polissacarídeos, localizados na membrana do taquizoíta, elicitam uma resposta de anticorpos IgM e IgA; contudo, a reação aos anticorpos IgG é derivada da lise desta forma parasitária (taquizoíta) pelo reconhecimento de antígenos protéicos variados (PARTANEN *et al.*, 1984; MINEO *et al.*, 1980).

Outros antígenos importantes localizados na superfície do parasita (SAG), além de SAG 1 (p30), são os que possuem pesos moleculares aparentes de 22 kDa (SAG 2), 42 kDa (SAG 3), 23 kDa (SAG 4) e 35 kDa (SAG 5) (KASPER *et al.*, 1983; BURG *et al.*, 1988; COUVREU *et al.*, 1988; CESBRON-DELAUW *et al.*, 1994).

As proteínas dos micronemas e roptrias denominadas de MIC e ROP, respectivamente, também já tiveram seus pesos moleculares identificados, tais como: MIC 1 (60kDa), MIC 2 (120 kDa), MIC 3 (90 kDa) (MORRISSETTE *et al.*, 1994; FOURMAUX *et al.*, 1996; WAN *et al.*, 1997), ROP 1 (60,5 kDa), ROP 2 (54 kDa), ROP 3 (59 kDa), ROP 4 (60 kDa),

ROP 5 (59,5 kDa), ROP 6 (42 kDa), ROP 7 (57-60kDa) e ROP 8 (200kDa) (SADAK *et al.*, 1988; LERICHE & DUBREMETZ, 1991; OSSORIO *et al.*, 1992; HÉRION *et al.*, 1993; MARTIN *et al.*, 1998).

Dos grânulos densos, sete proteínas já foram estudadas: GRA 1 (22 kDa), GRA 2 (28 kDa), GRA 3 (30 kDa), GRA 4 (40 kDa), GRA 5 (21 kDa), GRA 6 (33 kDa) e GRA 7 (97-146 kDa) (ASAI *et al.*, 1983; CESBROUN-DEZAUW *et al.*, 1989; CHARIF *et al.*, 1990; ACHBAROU *et al.*, 1991; MEVELEC *et al.*, 1992; LECORDIER *et al.*, 1993; MERCIER *et al.*, 1993; CESBROUN-DELAUW, 1994; SIBLEY *et al.*, 1994; JACOBS *et al.*, 1999).

Os anticorpos IgG específicos a *T. gondii* reagem com muitos polipeptídeos antigênicos, com pesos moleculares que variam entre 14-150 kDa, tendo como frações predominantes aquelas entre 30 e 67 kDa (PARTANEM *et al.*, 1984).

Outro estudo comparativo da resposta dos anticorpos IgG aos antígenos de *T. gondii*, em amostras de soros de crianças e mães infectadas, demonstrou que, na fase crônica da infecção, estes soros reconheceram quatro principais antígenos: p43, p35, p30 e p22 e, na fase recente, as bandas p43 e p30 (DECOSTER *et al.*, 1988).

Na urina de pacientes imunossuprimidos portadores do vírus HIV, que apresentavam infecção aguda por *T. gondii*, FONSECA & FACHADO (1995) identificaram bandas de peso molecular de 66 e 61 kDa, definidas como marcadores para o diagnóstico de fase aguda.

1.10-Diagnóstico sorológico

O diagnóstico da toxoplasmose depende de uma combinação entre a informação clínica e dados laboratoriais, incluindo a associação do *Toxoplasma* com lesões histopatológicas características, isolamento do agente em animais de laboratório e dados sorológicos (FRENKEL, 1995).

Classicamente, o diagnóstico laboratorial da toxoplasmose tem se baseado na pesquisa de anticorpos do paciente e diferentes marcadores sorológicos têm sido discutido para distinguir entre infecções latentes, comum na população, e infecção recente ou toxoplasmose–doença (CAMARGO, 1996).

O aparecimento de anticorpos para a toxoplasmose, assinalando a soroconversão da negatividade para a positividade em testes sorológicos, traduz a resposta imunológica humoral à infecção recém adquirida (CAMARGO, 1995).

Na parasitemia que se instala, surgem anticorpos específicos representados por isotipos IgM, IgA, IgE e, principalmente IgG. As curvas de associação e queda de títulos destes diferentes anticorpos na toxoplasmose obedecem a níveis diversos, o que vem caracterizar três perfis sorológicos sucessivos na evolução da toxoplasmose (CAMARGO *et al.*, 1977): Perfil I (infecção recente), Perfil II (estágio de transição) e progressivamente o Perfil III (infecção de fase latente ou crônica) (CAMARGO *et al.*, 1991).

Os testes para anticorpos IgM específicos são os de utilização mais ampla como marcadores de fase recente da infecção. Porém, à medida que estes testes ganham em sensibilidade, passam a detectar anticorpos IgM por períodos muitos longos, podendo chegar a anos, o que diminui seu valor como marcadores sorológicos do perfil I da toxoplasmose (FUCILLO *et al.*, 1987; PAUL, 1997; CAMARGO *et al.*, 1991; TAKAHASHI & ROSSI, 1994).

Muitos estudos têm enfatizado os valores das detecções dos anticorpos IgA específicos a *T. gondii* para diagnóstico, da toxoplasmose de fase recente (DESCOSTER *et al.*, 1988; PATEL *et al.*, 1993; TAKAHASHI & ROSSI, 1994; FOU DRINIER *et al.*, 1995).

Os testes concomitantes para a pesquisa de anticorpos IgA e IgM, em determinadas circunstâncias, são sugeridos como complementares para diagnósticos eficientes na toxoplasmose de Perfil I (fase recente) (TAKAHASHI & ROSSI, 1997).

Na detecção de anticorpos IgE específicos, utilizando o método ISAGA, PAUL (1997) demonstrou que esta imunoglobulina também pode ser usada como diagnóstico diferencial na toxoplasmose nas fases recente e crônica e também, em certos casos de reativações sorológicas de toxoplasmose congênita. Contudo, resultados negativos para IgE não excluem a possibilidade do estágio agudo da toxoplasmose em pacientes com infecção recente (GROSS *et al.*, 1997).

Para fins diagnósticos de toxoplasmose aguda, ou de contágio recente, a possibilidade do aperfeiçoamento de testes sorológicos como também o surgimento de novos testes que definam bons marcadores são altamente desejáveis (CAMARGO *et al.*, 1991).

1.11-AVIDEZ (Afinidade funcional)

A força de ligação na interação de uma molécula de anticorpo com uma molécula de antígeno monovalente é denominada afinidade do anticorpo. Em diagnóstico sorológico contudo, devido à caracterização policlonal da resposta imune, a interação importante é usualmente aquela que se processa entre moléculas bivalentes de anticorpos com epitopos multivalentes. O termo utilizado para expressar esta força de ligação é avides (ROITT, 1997).

A medida da avides de anticorpos IgG específicos para sorodiagnóstico de várias infecções pode ser realizada utilizando-se diferentes métodos, tais como: aglutinação, radioimunoensaio, fixação de complemento, ELISA, imunofluorescência, “eletroblotting”, onde a presença de agentes desnaturantes, aplicados após a formação do complexo antígeno-anticorpo, são particularmente necessárias (GUTIERREZ & MAROTO, 1996).

Os anticorpos de baixa avides são produzidos durante os estágios iniciais das infecções, e os de alta avides na fase crônica ou latente, fase

esta caracterizada por baixas doses de antígenos (THOMAS & MORGAN-CAPNER, 1991).

Ensaio para medir a avididade de anticorpos IgG têm sido proposto para investigar o momento exato da infecção primária e para distinguir entre reativação, reinfecção ou infecção recente causada por vários microrganismos (KORHONEN *et al.*, 1999).

Testes sorológicos utilizando a avididade de anticorpos IgG específicos demonstram ser métodos confirmatórios capazes de diferenciar entre infecções aguda e latente causados pelo vírus Epstein-Barr (SCHUBERT *et al.* 1998), pelo vírus da rubéola (THOMAS *et al.*, 1992; HERNE *et al.*, 1997; LAFARGA *et al.*, 1998; GUTIERREZ *et al.*, 1999) ou por *Haemophilus influenza* tipo B (GOLDBLATT *et al.*, 1998).

Recentemente, a avididade dos anticorpos IgG vem sendo proposta como um bom marcador sorológico para toxoplasmose, capaz de distinguir os três perfis sorológicos sucessivos no curso da infecção toxoplásmica, nos mais variados tipos de amostras de soros de pacientes (HEDMAN *et al.*, 1989; JOYNSON *et al.*, 1990; ADES, 1991 CAMARGO *et al.*, 1991; LAPPALAINEN *et al.*, 1993; HOLLIMAN *et al.*, 1994; LAPPALAINEN *et al.*, 1995; JENUN *et al.*, 1997; PELLOUX *et al.*, 1998; ASHBURN *et al.*, 1998; COZON *et al.*, 1998).

Para avaliação da avididade de anticorpos IgG humanos específicos a *T. gondii*, uma técnica simples, baseada na maior ou menor facilidade

com que esses anticorpos são dissociados dos antígenos específicos, foi descrita por HEDMAN *et al.*, (1989).

As dissociações destes complexos antígeno-anticorpo podem resultar das ações de agentes desnaturantes de proteínas ou desestabilizantes de ligações de pontes de hidrogênio, tais como soluções de dietilamina, cloridrato de guanina, uréia e outros (CAMARGO *et al.*, 1991).

Nas infecções recentes por *Toxoplasma*, altas porcentagens dos anticorpos IgG específicos mostram uma baixa avidéz, isto é, baixa afinidade pelos antígenos correspondentes (HEDMAN *et al.*, 1989). Com o decorrer do tempo e, conseqüentemente, com a maturação da resposta imune, esses anticorpos vão apresentando uma avidéz crescente, de modo que na infecção com longa duração ou crônica, encontram-se um predomínio marcante de anticorpos de alta afinidade (HEDMAN *et al.*, 1989; CAMARGO *et al.*, 1991; HOLLIMAN *et al.*, 1994; JOYNSON *et al.*, 1990). Desta maneira, o teste de avidéz para anticorpos IgG anti-*T. gondii* pode ser definido como uma excelente estratégia para se estabelecer o diagnóstico da toxoplasmose de fase recente.

Em testes imunoenzimáticos (ELISA), com antígenos adsorvidos em microplacas, HOLLIMAN *et al.*, (1994) testaram a reatividade dos anticorpos IgG anti-*T. gondii* antes e após a lavagem dos complexos imunes formados, usando várias concentrações de soluções de uréia (2M, 4M, 6M e 8M). Portanto, determinou-se que nas infecções recentes,

a queda da reatividade das reações submetidas ao agente dissociante uréia a 6M é significativa, enquanto que em infecções crônicas, esta molaridade apresenta, no máximo, uma discreta diminuição da reatividade (HEDMAN *et al.*, 1989; CAMARGO *et al.*, 1991; HOLLIMAN *et al.*, 1994).

Adicionalmente, os testes ELISA usados para medir a avidéz de anticorpos IgG específicos a antígenos de *Toxoplasma*, também se mostraram eficientes para um melhor entendimento dos mecanismos patogênicos na toxoplasmose ocular (VINHAL *et al.*, 1994; PAUL, 1999).

Dados da literatura também sugerem que o teste ELISA- Avidéz possa apresentar valor como marcador sorológico nos diagnósticos de pacientes imunodeprimidos, principalmente em gestantes que apresentam altos riscos de apresentar toxoplasmose congênita (LAPPALLAINEN *et al.*, 1993, JENUN *et al.*, 1997, COZON *et al.*, 1998, LAPALLAINEN *et al.*, 1995, ASHBURN *et al.*, 1998).

Contudo, não há relatos na literatura sobre a existência de possíveis marcadores antigênicos de *T. gondii* que possam ser correlacionados às fases recente, transitória e crônica da infecção, determinando-se a avidéz dos respectivos anticorpos IgG específicos dirigidos contra estes marcadores.

Deste modo, no presente estudo, propusemos a caracterizar os marcadores antigênicos de *T. gondii* associados aos três perfis sorológicos da toxoplasmose, que são reconhecidos por anticorpos IgG

específicos de alta e baixa avidéz, usando a técnica de *Immunoblotting* modificada.

Objetivo

2. OBJETIVOS

Padronizar a técnica *Immunoblotting-Avidez* para anticorpos humanos IgG, avaliando-se duas diferentes concentrações do agente dissociante uréia (6M e 8M).

Detectar os marcadores antigênicos presentes nos três perfis sorológicos I, II e III (fases recente, de transição e crônica, respectivamente) da infecção toxoplásmica pelo teste *Immunoblotting* e *Immunoblotting-Avidez*.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1-Amostras de soros

Um total de 125 amostras de soros humanos foram analisadas, baseando-se nos perfis sorológicos sucessivos do curso da infecção toxoplásmica. Estas amostras de soros foram previamente caracterizadas por ensaios convencionais dos laboratórios de origem, o que possibilitou a classificação das respectivas amostras em três grupos, como segue:

Grupo I: 20 amostras de soros humanos de pacientes com toxoplasmose na fase recente (perfil I), nas quais a presença de anticorpos IgM específicos com títulos ≥ 64 foi comprovada pelo teste ELISA-IgM realizado no Laboratório Fleury, São Paulo-SP.

Grupo II: 45 amostras de soros humanos de pacientes com toxoplasmose na fase de transição (Perfil II), onde foram observados, títulos elevados de IgG e presença de anticorpos IgM específicos por testes ELISA realizados no Laboratório Fleury , São Paulo-SP-Brasil.

Grupo III: 60 amostras de soros humanos de pacientes com toxoplasmose na fase crônica (Perfil III), onde se observou a presença de anticorpos específicos IgG e ausência de anticorpos IgM anti-*T. gondii*, comprovados pelo teste ELISA realizado no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas de Uberlândia (HC- UFU), Minas Gerais-Brasil.

Amostras de soros humanos de referência reativas e não-reativas para *Toxoplasma gondii* foram utilizadas na padronização dos testes a serem estudados.

Todas as amostras de soros humanos coletadas foram congeladas e armazenadas a -20°C até serem testadas.

3.2-Antígenos de *T. gondii*

Taquizoítas da cepa RH foram mantidos por inoculação intraperitoneal em camundongos Swiss, em passagens seriadas em intervalos de 48 a 72 horas. Os animais foram inoculados com um volume de 0,4 mL do exsudato peritoneal de camundongos previamente infectados.

Os exsudatos obtidos foram lavados três vezes por centrifugação a $2400 \times g$ por 10 minutos a 4°C com solução salina tamponada com fosfatos a 0,01M (PBS), pH 7,2. O sedimento final da suspensão parasitária foi ressuspendido em 10 mL de PBS e ajustado a uma concentração de 2×10^6 taquizoítas/mL, por contagem em câmara hemocitométrica.

Placas de poliestireno para ELISA (Interlab, São Paulo, Brasil) foram sensibilizadas com 1×10^5 taquizoítas/ poço em PBS acrescido de gelatina a 1%, e incubadas durante 18 horas a 37°C , sendo posteriormente estocadas a -20°C até o momento do uso.

O antígeno de *T. gondii* utilizado no ensaio de *Immunoblotting* foi preparado a partir da suspensão parasitária obtida de exsudatos peritoneais de camundongos Swiss previamente infectados, como descrito acima. Contudo, o sedimento da suspensão parasitária foi homogeneizado em 0,5 mL de solução “tampão da amostra”, constituído de 0,1M Tris-HCl pH 6,8, 4% de duodecil sulfato de sódio (SDS), 20% de glicerol e 0,2% de azul de bromofenol. Após uma fervura a 100°C durante três minutos, o extrato antigênico foi aliquoteado, congelado e estocado a -20°C até o momento de uso no *Immunoblotting*.

3.3-ELISA-Avidez

A avidéz dos anticorpos IgG específicos ao *T. gondii* foi determinada como previamente descrito por HEDMAN *et al* (1989), com algumas modificações.

As placas de poliestireno previamente sensibilizadas com taquizoítas de *T. gondii* sofreram 3 ciclos de lavagens, com duração de 5 minutos, em PBS-Tween-20 (Polyoxiethylene Sorbitan, Sigma Chemical Co., EUA) a 0,05% (PBS-T).

As amostras de soros humanos diluídos na razão dois, iniciando-se em 1/16 até 1/2048 em PBS-T, foram adicionadas em duplicata, em placas separadas, num volume de 50µL por poço. Os soros controles positivos e negativos foram diluídos somente a 1/64. Após incubação de 45 minutos a 37°C, as placas foram submetidas a lavagens

diferenciadas, da seguinte forma: uma placa foi lavada com solução de PBS acrescido de uréia a 6M, durante 5 minutos, enquanto a outra placa foi lavada somente com PBS-T por 5 minutos. Após esta lavagem diferenciada, ambas as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T por 5 minutos.

O complexo antígeno-anticorpo foi detectado por um conjugado IgG de coelho anti-IgG humana marcada com peroxidase (Sigma Chemical Co., EUA), diluído a 1/3000 em PBS-T 0,05% e novamente incubado a 37°C por 45 minutos. Após novas lavagens com PBS-T, a reação foi revelada por um substrato enzimático constituído de orto-fenilenodiamina (OPD) (Merck- Rio de Janeiro-Brasil) em tampão citrato-fosfato 0,1M, pH 5,0 e água oxigenada 0,012% (Caal, São Paulo-Brasil).

Após a adição da solução reveladora, procedeu-se à incubação por 15 minutos à temperatura ambiente em câmara escura. A revelação enzimática foi interrompida com ácido sulfúrico a 2N.

A leitura das absorbâncias foram realizadas por um sistema de leitor de placas (Titertek, Multiskan Plus, Flow, EUA), utilizando filtro a 492 nm.

O índice de avides (IA) foi calculado como descrito por HOLLIMAN *et al* (1994), como sendo a razão entre as absorbâncias (Abs) obtidas na placa lavada com uréia (U⁺) e aquela obtida na lavada sem uréia (U⁻), expressa em percentagem:

$$IA(\%) = \text{Abs}(U^+) / \text{Abs}(U^-) \times 100$$

3.4-Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para evidenciar as principais proteínas antigênicas de *T. gondii* (cepa RH) que são reconhecidas por anticorpos IgG humanos, as preparações antigênicas foram separadas por uma técnica de eletroforese vertical em gel de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE), em condições desnaturantes e não redutoras segundo LAEMMLI (1970).

Para o gel de separação, foi utilizado: Tris-HCl (Hydromethyl aminomethane, Sigma Chemical Co.) a 0,375 M, pH 8,8; SDS (Dodecil sulfato de sódio, Sigma Chemical Co.) a 0,1%; EDTA (Ácido etileno-diamino-tetra-acético, Quimibrás Ind. Química AS, Rio de Janeiro-RJ, Brasil) a 2 mM; solução de acrilamida a 30% e bisacrilamida a 5% (Pharmacia-LKB, Produtos AB, Bromma, Suécia); Temed (N,N,N,N-tetrametil-aminometano, Pharmacia-LKB) a 0,125% e APS (Persulfato de amônio, Pharmacia-LKB) a 0,125%.

Para o gel de empilhamento, foi utilizado: Tris-HCl a 0,125 M, pH 6,8; SDS a 0,1%; EDTA a 2 mM; solução de Acrilamida 30% e bisacrilamida a 5%; Temed a 0,125% e APS a 0,125%.

O tampão eletrodo ou de corrida (pH 8,3) utilizado consistiu de glicina (Sigma Chemical Co.) a 0,19 M, Tris (Gibcol BRL) a 0,025 M, SDS (Sigma Chemical Co.) a 0,075 % e EDTA (Quimibrás Ind. Química AS) a 1,95 M.

Um total de 100µL do extrato antigênico numa concentração de 1×10^8 taquizoítas /mL foi aplicado em cada corrida eletroforética.

Os seguintes componentes foram utilizados como padrões de peso molecular: fosforilase b (97kDa), soro albumina bovina (67kDa), ovalbumina (45kDa), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (36kDa), anidrase carbônica (29kDa) e α -lactalbumina (14kDa) (Sigma Marker, Sigma Chemical Co.) em todas as eletroforeses.

As corridas eletroforéticas foram realizadas em uma corrente inicial de 20 mA e final de 30 mA e voltagem de 250 V por aproximadamente 3 horas e 30 minutos.

3.5-Immunoblotting-Avidez

Imediatamente após a separação eletroforética dos componentes antigênicos, foi realizada a transferência das proteínas do gel para membranas de nitrocelulose com poros de 0,45 μ m (Sigma Chem. Co.) embebidas em tampão de transferência (glicina a 0,04M, Triz-base a 0,05M, SDS a 0,04% e Metanol a 20%).

Um sistema de transferência semi-úmido ("Multiphor II Electrophoresis Unit" – Pharmacia – LKB, Suécia) foi utilizado, conforme as técnicas descritas por TOWBIN *et al* (1979).

A corrente utilizada foi de 0,8 mA por cm² do gel e a voltagem foi de 250V.

Após 2 horas de transferência, as membranas de nitrocelulose foram coradas com solução Ponceau a 0,5% em ácido acético a 1%, para se verificar a eficiência da transferência. As mesmas foram cortadas

em pequenas tiras de 0,3 cm e colocadas em placas com canaletas apropriadas para a realização do *Immunoblotting*.

As tiras de nitrocelulose foram lavadas em água destilada e subseqüentemente bloqueadas com solução de PBS-T a 0,05% acrescido de 5% de leite desnatado (Molico, Nestlé, São Paulo-Brasil) por duas horas à temperatura ambiente, para bloquear os sítios ativos ligantes de proteínas.

As tiras de uma mesma corrida eletroforética foram posteriormente incubadas com as amostras de soros, em triplicata, diluídas em solução de PBS-T acrescido de 1% de leite desnatado (PBS-TM). As diluições utilizadas para cada amostra de soro foram aquelas onde, no teste ELISA detectou-se o menor índice de avidéz ou o segundo menor índice, caso o menor estivesse na última diluição (Limiar de reatividade).

Em cada canaleta foi adicionado um volume de 500 μ L das amostras de soros. Paralelamente, amostras de soros não reativas a *T. gondii* foram também testadas servindo como controles negativos das reações.

Após incubação por 18 horas a 4°C, sob agitação lenta, uma das tiras de nitrocelulose da triplicata foi lavada em PBS-TM, por 3 vezes durante 5 minutos, enquanto a segunda e a terceira tiras de nitrocelulose da triplicata foram lavadas em soluções de uréia a 6M e a 8M em PBS, respectivamente, por 3 vezes durante 5 minutos. Finalmente, as 3 tiras

de nitrocelulose pertencentes à cada amostra de soro foram submetidas igualmente a 3 ciclos de lavagem em PBS-TM por 5 minutos.

O conjugado anti-IgG humana marcada com peroxidase (Sigma Chemical Co.) foi adicionado em cada canaleta a 1:300 em PBS-TM e incubado novamente por 2 horas à temperatura ambiente, sob agitação lenta e continua.

Após um novo ciclo de lavagens em PBS-TM por 6 vezes durante 5 minutos, as tiras foram reveladas com solução contendo 2,5 mg de 3,3-diaminobenzidina (DAB, Sigma Chemical Co.) e H₂O₂ a 0,45%.

A reação foi interrompida pela adição de água destilada às canaletas, quando as bandas protéicas foram visualizadas.

3.6-Análise estatística

Os pesos moleculares aparentes das bandas antigênicas de *T. gondii* foram estimados por regressão linear, a partir de cálculos da mobilidade relativa (RF).

As freqüências das bandas antigênicas reconhecidas pelas amostras de soros humanos, dos pacientes pertencentes aos três perfis sorológicos para *T. gondii*, submetidas às diferentes condições dos ensaios, foram analisadas a partir de uma análise comparativa entre duas proporções, utilizando (Statistic for Windows - Release 4.5 A-Statesoft, Inc. 1993). A hipótese nula foi rejeitada quando $p < 0,05$.

3.7-Immunoplot

Um método gráfico para medir a frequência (f) de 0 a 100% de cada banda antigênica reconhecida por anticorpos IgG específicos de cada amostra de soro humano através do *Immunoblotting-Avidez*, foi adotado para identificar os marcadores antigênicos, de acordo com as análises de frequência descritas por RAHMAH & ANUAR (1992). Assim, (f) representa o número de vezes que a banda foi reconhecida, dividido pelo número total de amostras do grupo.

A interpretação deste método gráfico foi estabelecida pela construção de quadrantes, tendo como referência a frequência de 50%. Deste modo, as proteínas situadas nos quadrantes II e III foram consideradas duplo-positivas (imunodominantes) e duplo-negativas (não-imunodominantes), respectivamente, não sendo consideradas, portanto, como marcadores de diagnóstico. Por outro lado, as proteínas situadas nos quadrantes I e IV foram consideradas como os melhores candidatos a marcadores antigênicos de diagnóstico.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1-ELISA AVIDEZ

Os índices de avidéz (IA) foram calculados para cada diluição das amostras de soros humanos, correspondentes aos grupos classificados de acordo com seus perfis sorológicos da infecção toxoplásmica.

Assim, nas amostras de soros de fase recente da infecção (Perfil I), os índices de avidéz apresentaram valores que variaram de 12 a 56% (Tabela 1).

Nas amostras de soros referentes ao Perfil II, correspondente à fase de transição da infecção toxoplásmica, os índices de avidéz variaram de 22 a 100% (Tabela 2).

No Perfil III (fase crônica) da infecção por *T. gondii*, as amostras de soros apresentaram índices de avidéz variando entre 42 a 100% (Tabela 3).

Tabela 1. Índice de avidéz de anticorpos IgG específicos correspondente à cada amostra de soros da fase recente (Perfil I) da infecção por *T. gondii*.

Soros	Índice de Avidéz (%)								
	Diluições								
	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/102 4	1/204 8	1/4086
1	96	75	73	58	56	38			
2	48	47	27	18	15	16	14		
3	54	33	26	18	17	12	16		
4	67	51	41	28	26	22	16	13	
5	100	84	81	71	68	53	43	22	
6	68	44	36	27	27	21	17		
7	85	55	47	40	32	30	23	18	17
8	100	90	82	73	59	51	47	35	30
9	56	39	22	24	25	17	20	18	20
10	61	48	38	48	37	29	28		
11	95	30	20	19	18				
12	93	76	92	73	55	51	65		
13	81	49	51	38	33	22	33		
14	81	73	62	57	48	40	33	22	27
15	60	40	29	26	21	22			
16	86	67	64	50	40	33	32	28	25
17	66	66	55	44	40	34	34	22	27
18	60	47	34	36	27				
19	65	70	71	71	59	49	42	34	38
20	74	51	44	38	32	34	27	25	

Os índices de avidéz foram calculados para cada diluição até o limiar de reatividade de cada amostra de soro, pelo teste ELISA-Avidéz.

Os valores em negrito representam os menores índices considerados para a definição da diluição ótima de cada soro para o teste *Immunoblotting*.

Tabela 2. Índice de avidéz de anticorpos IgG específicos correspondente à cada amostra de soros da fase de transição (Perfil II) da infecção por *T. gondii*.

Soros	Índice de Avidéz (%)								
	Diluições								
	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4086
1	73	60	47						
2	93	80	85	86					
3	73	88	68	75					
4	52	36	22	44	21				
5	91	88	67	55					
6	97	93	97	100	98	100	100	87	
7	85	65	51	34					
8	75	64							
9	99								
10	83	66	57	76					
11	43								
12	87	82	75	72	59	61	47		
13	89	80	71	82					
15	95	98	100	97	96	100			
16	91	82							
17	84	85	68						
18	79	79	85	74					
19	92	89	96	85	82	73			
20	97	100	85	57	72				
21	91	84	77	66					
22	91	84	77	66					
23	79	42	76	100					
24	55	42	42	28					
25	80	100	91	76					
26	100	95	93						
27	98	100	87	80	78				
28	100	92	93	76	78	80			
29	99	95	79						
30	100	100	88	100	98	84	93		
31	58	57	60						
32	93	96	100						
33	100	100							
34	67	55	50						
35	88	61	78	54	49				
36	100	89	81	71	71	42	36		
37	92	97	83	79	60				
38	85	67	68	92	51				
40	95	69	85	59	54				
41	92	86	81	74	80	78			
42	87	74	65	52	48				
44	90	79	85	83					
45	86	80	80	98	91	86	52		
46	84	71	71	66					
47	92	89	87	88	94	81			
48	96	84	86	84	100				

Os índices de avidéz foram calculados para cada diluição até o limiar de reatividade de cada amostra de soro, pelo teste ELISA-Avidéz.

Os valores em negrito representam os menores índices considerados para a definição da diluição ótima de cada soro para o teste *Immunoblotting*.

Tabela 3. Índice de avidéz de anticorpos IgG específicos, correspondentes à cada amostra de soros da fase crônica (Perfil III) da infecção por *T. gondii*.

Soros	Índice de Avidéz (%)								
	Diluições								
	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4086
2C	100	100	93	88	87	100	99		
10C	100	88	86						
23C	100	100							
9D	100								
10D	100	100	100	100	100	100			
20D	100	98	80	100	100	94			
23D	100	100	92	91	100	100			
28D	100	98	82	92	98				
9E	71	82	100	90	76				
11E	92	100	99	99	99				
8C	61	63	59	87	82	66			
11C	98	92	85	100	83	100	80	90	73
15C	64	63	50	59	88				
5D	85	70	62	62	68	81			
7D	79	90	73	68	78	87	82	100	
15D	70	78	82	70	92	76	87	75	100
21D	59	84	69	68	86	100			
24D	73	75	64	83	99				
2E	82	69	58	80	81				
15E	81	90	94	100	94	75			
1H	90	71	71	67	74				
2H	91	77	73	64	90				
1I	85	70	80						
2I	72	76							
3I	78								
4I	83	57	43	57	46				
5I	93	95	75	72	57	50	42	42	
6I	91	65	54	43	46				
1J	47	39							
2J	52								
3J	74	69	77						
4J	100								
5J	94	85	78	90	63				
6J	100	100							
1M	73	64	56						
2M	92	82	77	69					
3M	92	91	74	72	97				
4M	84	86	83						
5M	72	79	77						
6M	100	100	91	88	84				
7M	82	100	100	100					
8M	100	100	100						
9M	100	100							
10M	100	73	54	50	45				
11M	74	66	76	79					
12M	72	59	60	42					
13M	77	60	51	53					
15M	46	39							
16M	79								
17M	76	82							
18M	97								
1N	59	54							
3N	60	60	59						
4N	84	74	84						
5N	83	88							
7N	71	69							
10N	65	77	71						
11N	42								
12N	87	100	72						
14N	73	73							

Os índices de avidéz foram calculados para cada diluição até o limiar de reatividade de cada amostra de soro, pelo teste ELISA-Avidéz.

Os valores em negrito representam os menores índices considerados para a definição da diluição ótima de cada soro para o teste *Immunoblotting*.

4.2-Immunoblotting–Avidez

As diluições utilizadas para cada amostra de soro no teste *Immunoblotting-Avidez* corresponderam àquelas onde se determinou o menor índice de avidéz ou o segundo menor índice, caso o primeiro estivesse na última diluição (limiar de reatividade), pelo teste ELISA-Avidez. Deste modo, as diluições das amostras de soros que apresentaram uma maior freqüência na aplicação deste teste foram: 1/512 (Perfil I), 1/32 (Perfil II) e 1/16 (Perfil III).

As freqüências das proteínas antigênicas de *T. gondii* que foram reconhecidas pelos anticorpos IgG específicos de amostras de soro do Perfil I (fase recente), Perfil II (fase de transição) e Perfil III (fase crônica) sem o tratamento com uréia, estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4. Frequências de bandas antigênicas de *T. gondii* reconhecidas por anticorpos IgG em amostras de soros humanos das fases recente, de transição e crônica (Perfis I, II e III) da infecção toxoplásmica, determinadas pelo teste *Immunoblotting* sem o tratamento com uréia.

Bandas Antigênicas (kDa)	Frequências (%) de bandas antigênicas reconhecidas por soros de pacientes com infecção por <i>T. gondii</i>		
	Perfil I	Perfil II	Perfil III
p10 ^{b, c}	30	22	0
p16 ^{a, b, c}	95	9	71
p19 ^{a, c}	60	97	81
p23	35	51	48
p30	100	100	100
p32 ^c	90	93	78
p38 ^{a, b, c}	80	98	41
p40	100	100	95
p43 ^{a, b}	70	33	27
p50 ^{a, c}	0	95	0
p54 ^{a, b, c}	40	89	68
p57 ^{a, c}	30	95	41
p60 ^{a, b, c}	100	73	53
p66 ^a	85	100	97
p70	90	98	95
p75 ^{a, c}	90	40	85
p83 ^{a, c}	20	97	12
p97 ^{a, b, c}	70	0	32

n = 125 amostras (Perfil I= 20; Perfil II= 45; Perfil III= 60)

^a Diferenças estatisticamente significativas entre os perfis I e II (p<0,05)

^b Diferenças estatisticamente significativas entre os perfis I e III (p<0,05)

^c Diferenças estatisticamente significativas entre os perfis II e III (p<0,05)

Diferenças estatisticamente significativas entre as frequências das bandas antigênicas reconhecidas por amostras de soros dos perfis I e II, foram observadas para as seguintes bandas de peso molecular aparente, expressas em kDa: p16, p19, p38, p43, p50, p54, p57, p60, p66, p75, p83 e p97. Destas bandas, p16, p43, p60, p75 e p97 foram predominantes no grupo de perfil I da infecção, enquanto as restantes predominaram no grupo de Perfil II ($p < 0,05$) (Figura 1).

Comparando-se as frequências das bandas antigênicas de *T. gondii* reveladas por anticorpos IgG específicos em amostras de soros dos perfis I e III, observou-se diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) para as seguintes bandas: p10, p16, p38, p43, p54, p60 e p97. Destas, a proteína p54 foi a única predominante no grupo de Perfil III (Figura 1).

Entre os grupos de perfis II e III, as comparações entre as frequências de bandas antigênicas determinadas por *Immunoblotting* revelaram que as proteínas p10, p16, p19, p32, p38, p50, p54, p57, p60, p75, p83 e p97 apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) (Figura 1). Contudo, destas bandas, somente p16, p75 e p97 foram predominantes no grupo de Perfil III.

Merecem destaques na análise comparativa entre as frequências das bandas antigênicas nos diferentes perfis sorológicos, a banda p10 que não foi observada no grupo de Perfil III, a banda p50 que foi exclusiva de Perfil II (95%), a banda p97 que não foi detectada nas

amostras de soro do Perfil II e a banda p30 apresentou uma frequência de 100% em todas as fases da infecção por *T. gondii*.

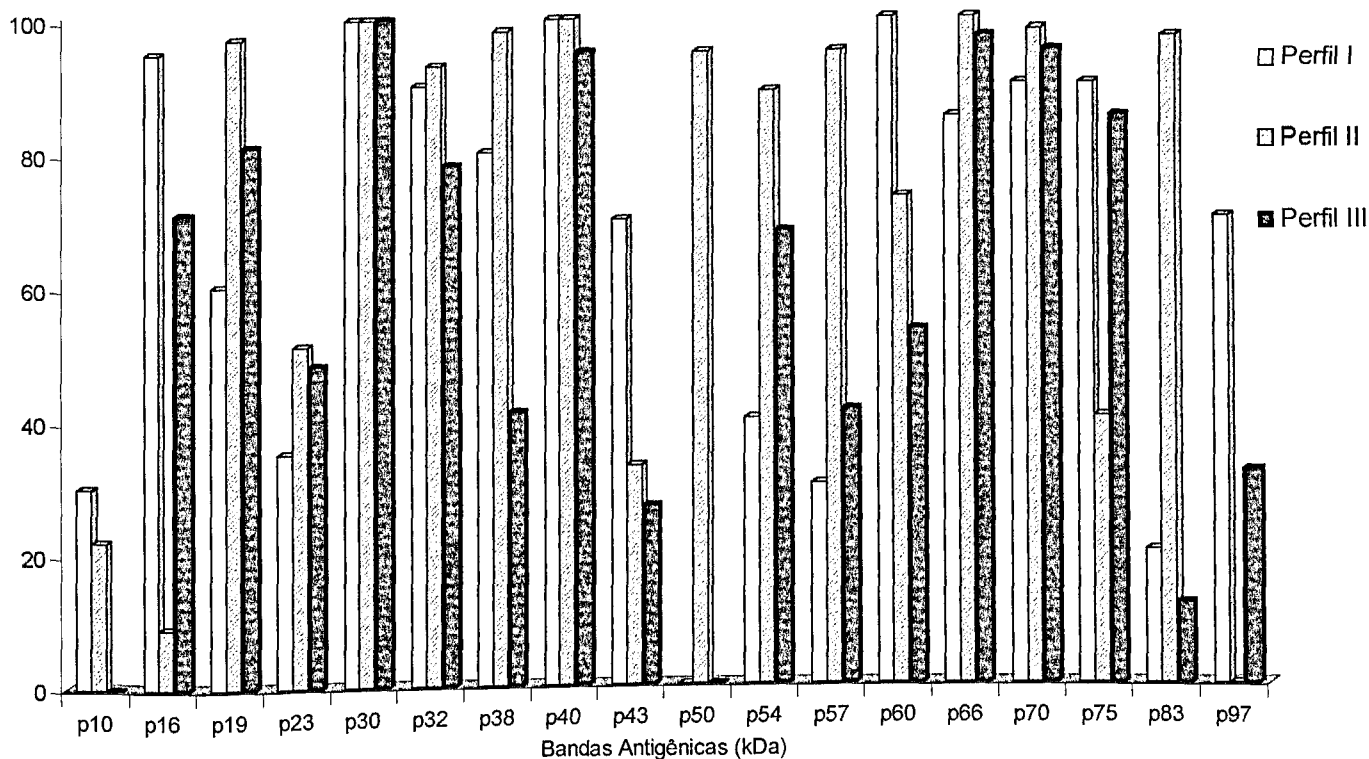


Figura 1. Frequências de bandas antigênicas de *T. gondii* reconhecidas por anticorpos IgG em amostras de soros humanos das fases recente, de transição e crônica (Perfis I, II e III) da infecção toxoplásmica, determinadas por *Immunoblotting*.

Após o tratamento com uréia 6M, as freqüências de bandas antigênicas de *T. gondii* reconhecidas por anticorpos IgG específicos em amostras de soros do Perfil I (fase recente), que apresentaram reduções estatisticamente significativas foram: p16, p32, p38, p40, p43, p54, p60, p66 e p97 (Tabela 5). A banda p38 apresentou acentuada redução na sua freqüência, de 80% a 0%, após o tratamento com uréia 6M. Contudo, pela análise no *Immunoplot* (Figura 2), as bandas p16, p19, p32, p38, p43, p60 e p97 foram situadas no quadrante IV. Adicionalmente, após o tratamento com uréia 8M, outras cinco bandas (p19, p23, p30, p70 e p75) apresentaram significantes reduções ($p < 0,05$) nas suas freqüências, quando comparado com as respectivas amostras de soros não tratadas com uréia (Tabela 5). Dentre estas bandas, somente p19 e p75 foram situadas no quadrante IV do *Immunoplot* (Figura 3).

TABELA 5. Freqüências de bandas antigênicas de *T. gondii* reconhecidas por anticorpos IgG em soros humanos da fase recente (Perfil I) da infecção toxoplasmática, determinadas por *Immunoblotting-Avidez*, sem e com o tratamento com soluções de uréia 6M e 8M.

Bandas Antigênicas (kDa)	Freqüências (%) de bandas antigênicas reconhecidas por soros de pacientes de fase recente da infecção por <i>T.gondii</i>		
	Sem Uréia	Uréia 6M	Uréia 8M
p10	30	15	15
p16*	95	45	40
p19**	60	30	20
p23**	35	10	0
p30**	100	85	65
p32*	90	35	20
p38*	80	0	0
p40*	100	50	45
p43*	70	35	15
p50	0	0	0
p54*	40	0	0
p57	30	20	20
p60*	100	25	10
p66*	85	55	25
p70**	90	65	55
p75**	90	65	40
p83	20	10	10
p97*	70	25	20

n=20 amostras

* Diferenças estatisticamente significativas após ambos os tratamentos com uréia 6M e 8M ($p < 0,05$)

** Diferenças estatisticamente significativas somente após o tratamento com uréia 8M ($p < 0,05$)

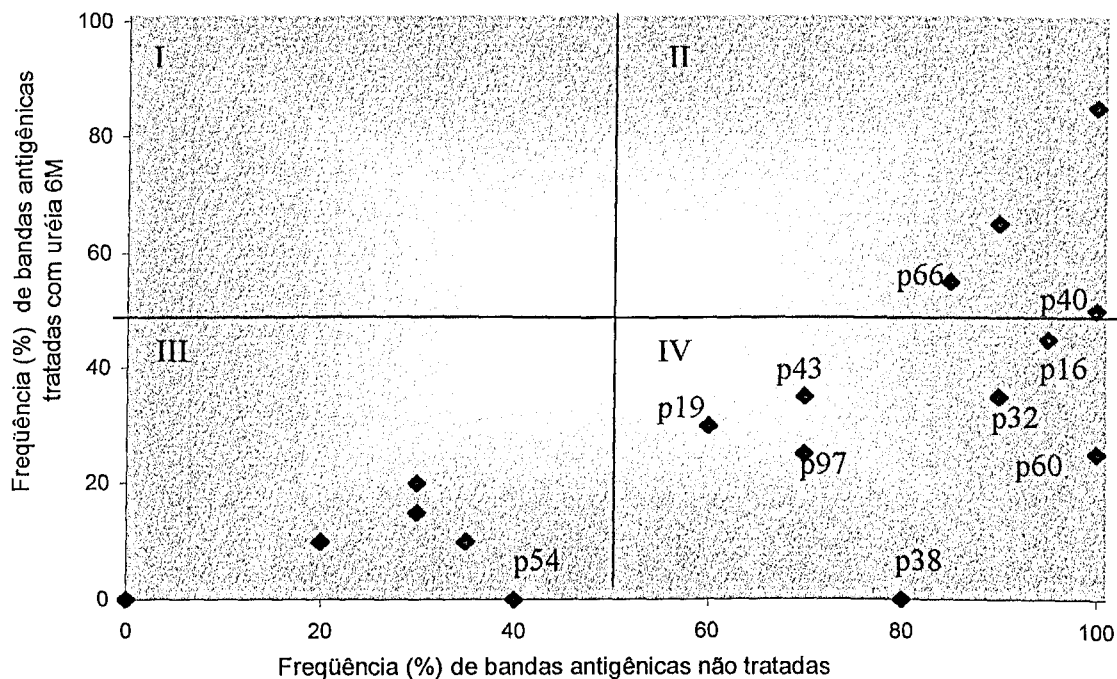


Figura 2. *Immunoplot* das freqüências de bandas antigênicas de *T. gondii* reconhecidas por anticorpos IgG em soros humanos do Perfil I (fase recente) da infecção toxoplásmica, determinadas por *Immunoblotting-Aidez*, sem e com tratamento com uréia 6M.

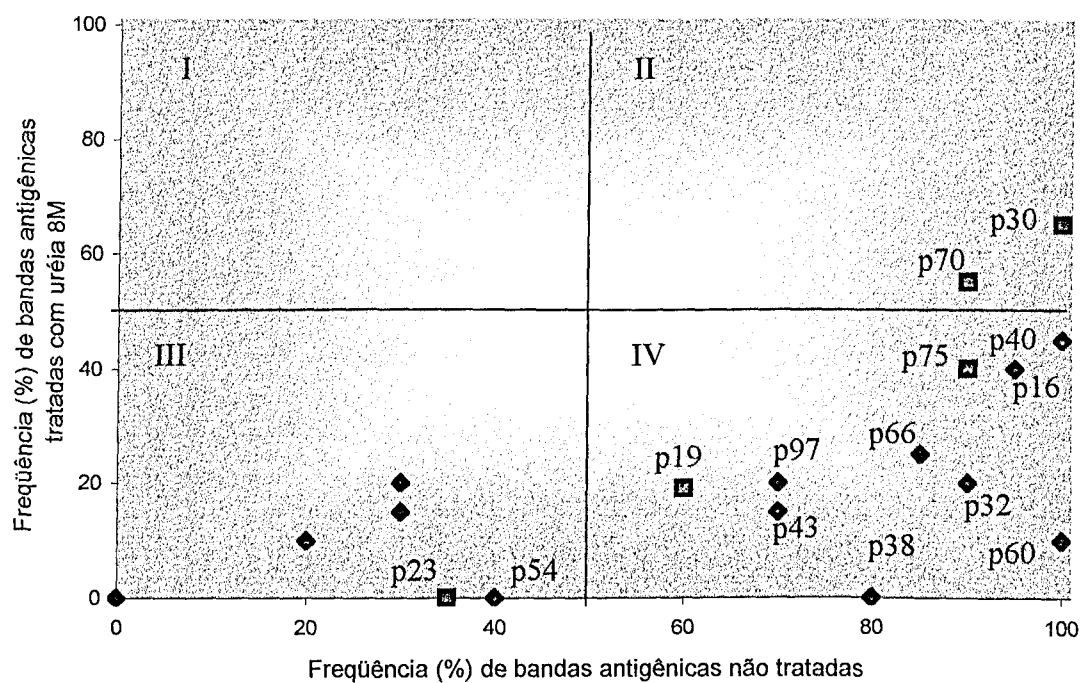


Figura 3. *Immunoplot* das freqüências de bandas antigênicas de *T. gondii* reconhecidas por anticorpos IgG em soros humanos do Perfil I (fase recente) da infecção toxoplásmica, determinadas por *Immunoblotting-Aidez*, sem e com tratamento com uréia 8M.

◆ = bandas antigênicas após tratamento com uréia 6M e 8M.

■ = bandas antigênicas após tratamento com uréia 8M.

Na análise das freqüências de bandas antigênicas reconhecidas por anticorpos IgG específicos em amostras de soros humanos referentes ao Perfil II (fase de transição) da infecção toxoplásmica, após o tratamento com uréia 6M, apresentaram reduções estatisticamente significativas, as bandas p10, p23, p38, p54, p57, p60 e p75 (Tabela 6). Analisando o *Immunoplot*, somente as bandas antigênicas p23, p54 e p60 foram situadas no quadrante IV (Figura 4).

Além destas bandas citadas, após o tratamento com uréia 8M, outras quatro bandas antigênicas (p32, p43, p50 e p66) apresentaram reduções significantes em suas freqüências ($p < 0,05$) (Tabela 6). Por outro lado, através do *Immunoplot*, estiveram situadas no quadrante IV as bandas p23, p38, p54, p57 e p60 (Figura 5).

Dentre todas as bandas analisadas no grupo de Perfil II, vale ressaltar que as bandas p23, p38, p54, p57, p60 e p75 apresentaram acentuada redução de suas freqüências após o tratamento com uréia (Tabela 6).

Tabela 6. Freqüências de bandas antigênicas de *T. gondii* reconhecidas por anticorpos IgG em soros humanos do Perfil II (fase de transição) da infecção toxoplasmática, determinadas por *Immunoblotting-Avidez*, sem e com o tratamento com soluções de uréia 6M e 8M.

Bandas Antigênicas (kDa)	Freqüências (%) de bandas antigênicas reconhecidas por soros de pacientes da fase de transição da infecção por <i>T.gondii</i>		
	Sem Uréia	Uréia 6M	Uréia 8M
p10*	22	4	4
p16	9	4	4
p19	97	91	89
p23*	51	22	18
p30	100	100	95
p32**	93	82	64
p38*	98	60	47
p40	100	98	98
p43**	33	20	15
p50**	95	87	73
p54*	89	29	20
p57*	95	58	44
p60*	73	33	22
p66**	100	93	89
p70	98	93	93
p75*	40	11	9
p83	97	95	95
p97	0	0	0

n=45 amostras

* Diferenças estatisticamente significativas após ambos os tratamentos com uréia 6M e 8M ($p < 0,05$)

** Diferenças estatisticamente significativas somente após o tratamento com uréia 8M ($p < 0,05$)

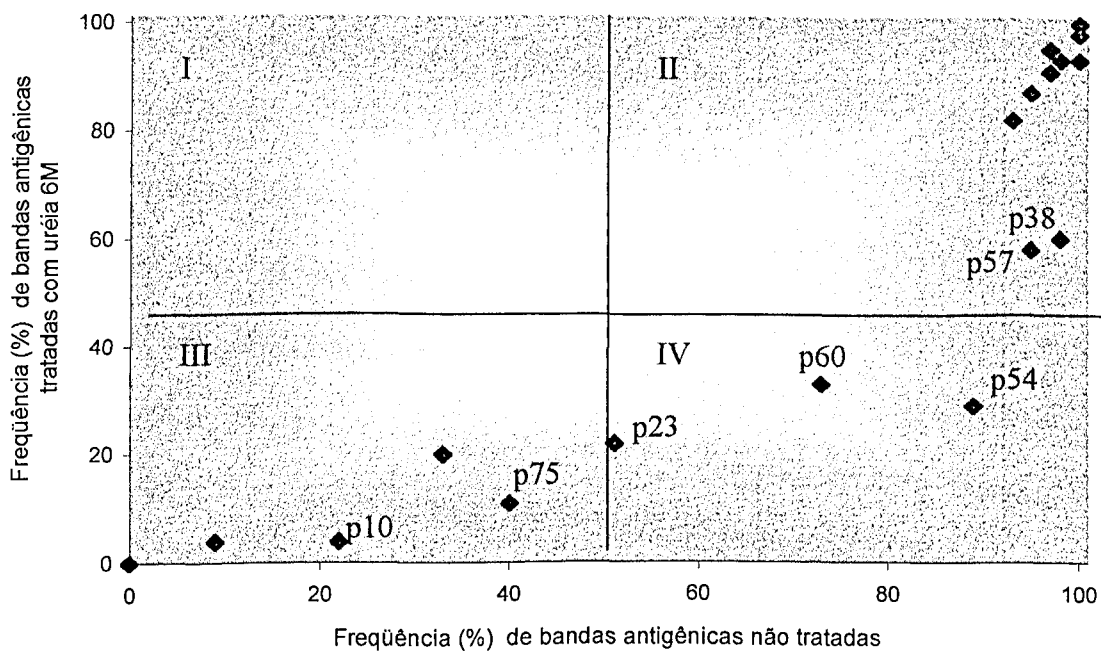


Figura 4. *Immunoplot* das frequências de bandas antigênicas de *T. gondii* reconhecidas por anticorpos IgG em soros humanos do Perfil II (fase de transição) da infecção toxoplásmica, determinadas por *Immunoblotting-Avidez*, sem e com tratamento com uréia 6M.

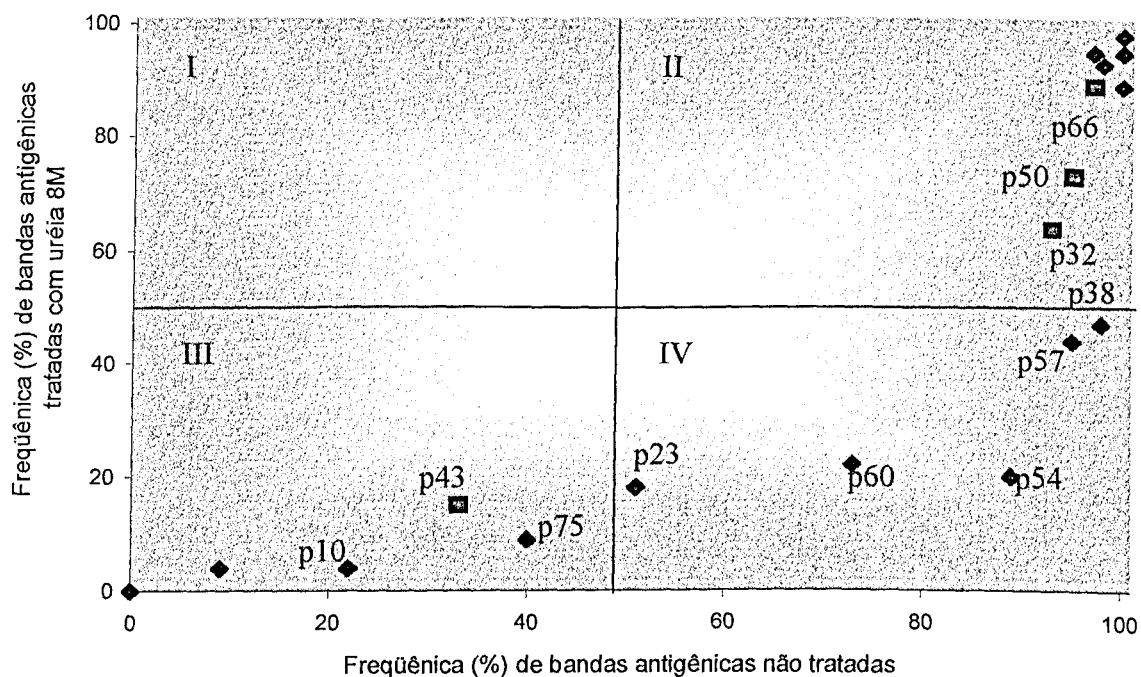


Figura 5. *Immunoplot* das freqüências de bandas antigênicas de *T. gondii* reconhecidas por anticorpos IgG em soros humanos do Perfil II (fase de transição) da infecção toxoplásmica, determinadas por *Immunoblotting-Avidez*, sem e com tratamento com uréia 8M.

◆ = bandas antigênicas após tratamento com uréia 6M e 8M.

■ = bandas antigênicas após tratamento com uréia 8M.

Pela análise das amostras de soros do Perfil III (fase crônica), diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) foram encontradas nas freqüências das bandas p23 e p66 após o tratamento com uréia 6M quando comparado às respectivas amostras não tratadas. Contudo, após o tratamento com uréia 8M somente a banda antigênica p83 não apresentou diferenças significantes ($p < 0,05$) na redução de sua freqüência quando comparado às mesmas amostras não tratadas (Tabela 7).

No *Immunoplot*, comparando-se as freqüências das bandas não tratadas e as tratadas com uréia 6M, observou-se que p23 e p66 foram situadas nos quadrantes III e II, respectivamente (Figura 6) e a banda antigênica p60 foi a única situada no quadrante IV. Por outro lado, as bandas p16, p54, p60 e p66 que apresentaram reduções significativas ($p < 0,05$) nas suas freqüências somente após o tratamento com uréia 8M, situaram-se no quadrante IV (Figura 7).

Vale ressaltar que o antígeno SAG1 (p30) principal antígeno de superfície de *T.gondii*, não sofreu redução significativa em suas freqüências em todas as fases da infecção, após o tratamento com uréia 6M. Entretanto, após o tratamento com uréia 8M, p30 sofreu redução significativa em sua freqüência somente na fase recente (Perfil I).

Tabela 7. Frequências de bandas antigênicas de *T. gondii* reconhecidas por anticorpos IgG em soros humanos da fase crônica (Perfil III) da infecção toxoplasmática, determinadas por *Immunoblotting*-Aidez, sem e com o tratamento com soluções de uréia 6M e 8M.

Bandas Antigênicas (kDa)	Frequências (%) de bandas antigênicas reconhecidas por soros de pacientes de fase crônica da infecção por <i>T.gondii</i>		
	Sem Uréia	Uréia 6M	Uréia 8M
p10	0	0	0
p16**	71	62	48
p19**	81	78	53
p23*	48	28	22
p30	100	95	93
p32**	78	68	55
p38**	41	30	10
p40**	95	88	78
p43**	27	18	3
p50	0	0	0
p54**	68	57	31
p57**	41	32	15
p60**	53	40	17
p66*	97	75	48
p70**	95	85	68
p75**	85	83	65
p83	12	10	5
p97**	32	32	13

n=60 amostras

* Diferenças estatisticamente significativas após ambos os tratamentos com uréia 6M e 8M ($p < 0,05$).

** Diferenças estatisticamente significativas somente após o tratamento com uréia 8 M ($p < 0,05$).

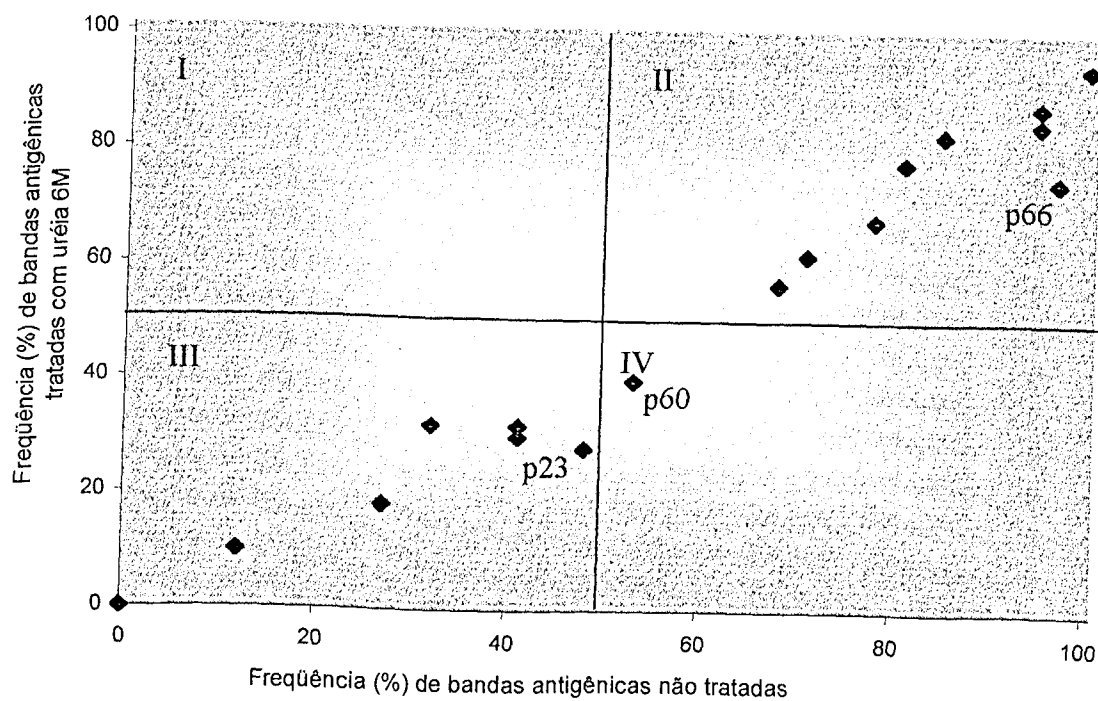


Figura 6. *Immunoplot* das frequências de bandas antigênicas de *T. gondii* reconhecidas por anticorpos IgG em soros humanos do Perfil III (fase crônica) da infecção toxoplásmica, determinadas por *Immunoblotting-Aidez*, sem e com tratamento com uréia 6M.

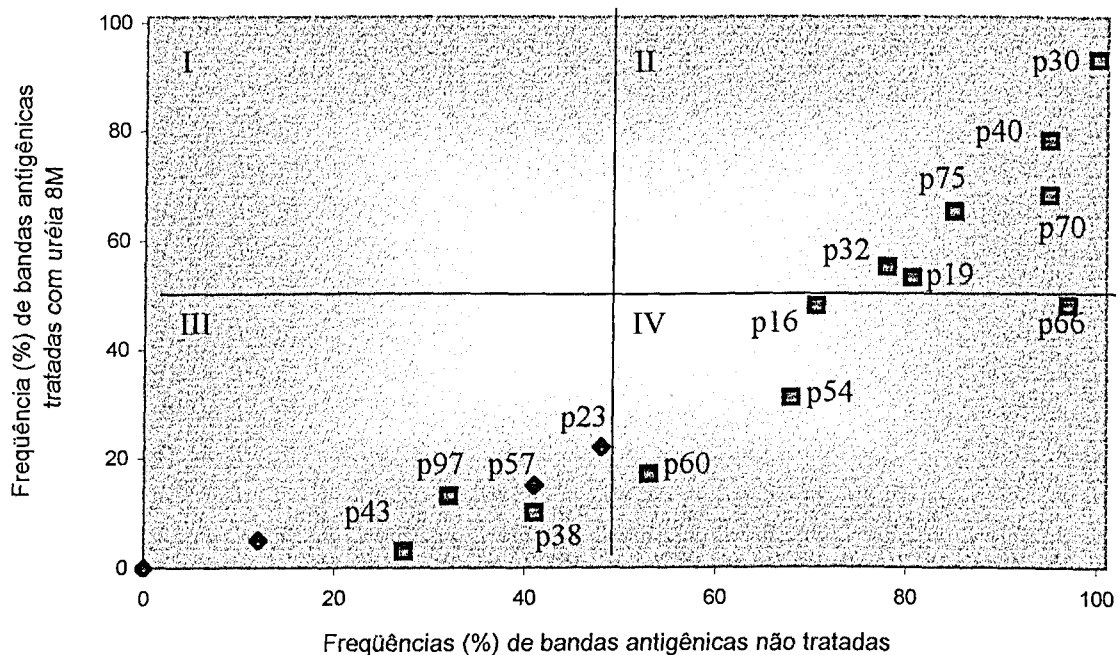


Figura 7. Immunoplot das frequências de bandas antigênicas de *T. gondii* reconhecidas por anticorpos IgG em soros humanos do Perfil III (fase crônica) da infecção toxoplásmica, determinadas por *Immunoblotting-Aidez*, sem e com tratamento com uréia 8M.

◆ = bandas antigênicas após tratamento com uréia 6M e 8M.

■ = bandas antigênicas após tratamento com uréia 8M.

As figuras 8, 9 e 10 mostram frações antigênicas de *T. gondii* reconhecidas pelos anticorpos IgG específicos das amostras de soro de perfis I, II e III da infecção toxoplásmica, quando submetidas aos diferentes tratamentos: sem uréia e com uréia 6M e 8M.

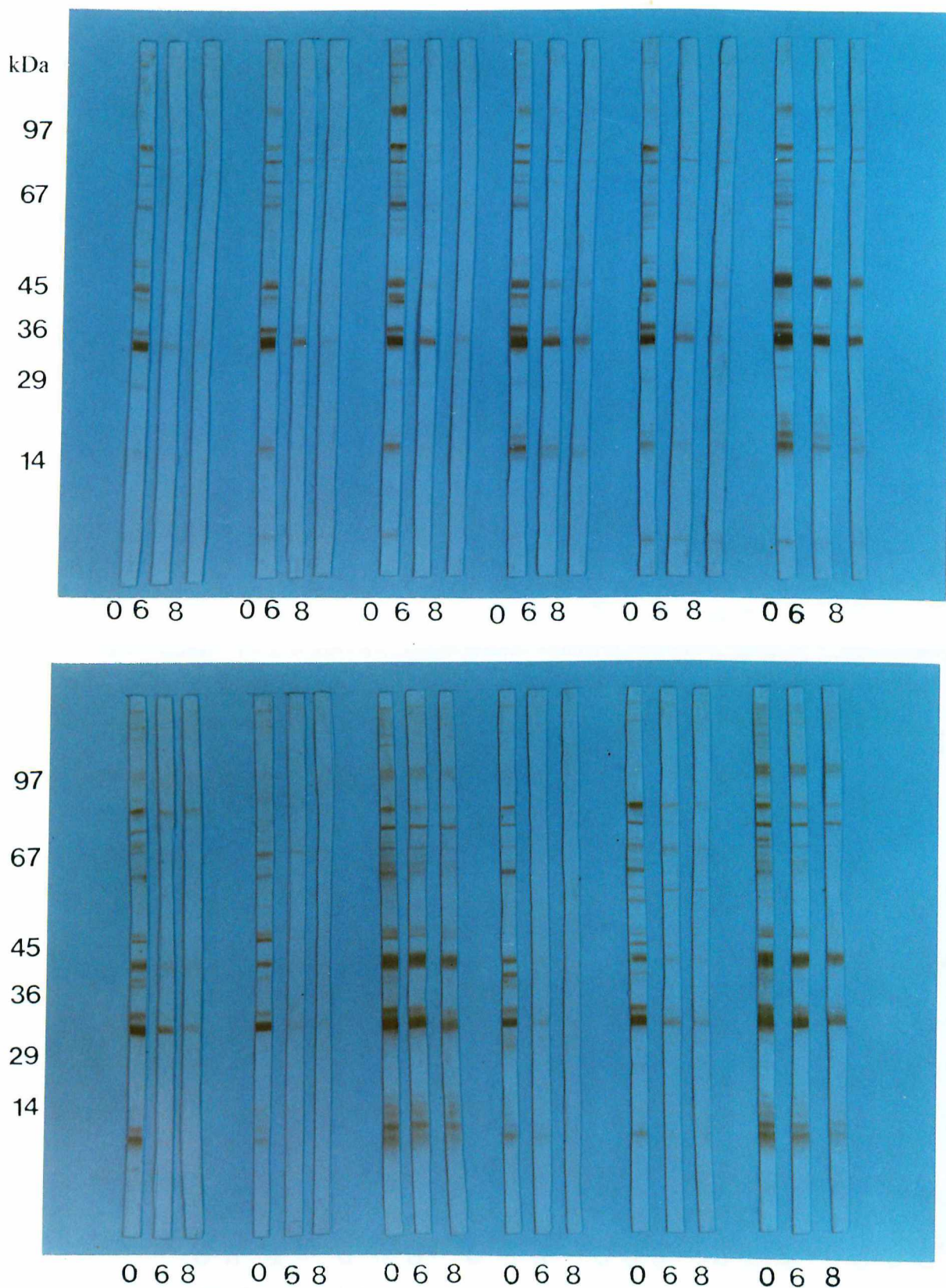


Figura 8 (A e B). Perfil antigênico de *T. gondii* reconhecido por anticorpos IgG específicos em doze amostras de soros humanos do Perfil I (fase recente), determinados por *Immunoblotting-Aidez*, sem e com tratamento com uréia 6M e 8M. 0 = sem uréia; 6 = uréia 6M e 8 = uréia 8M.

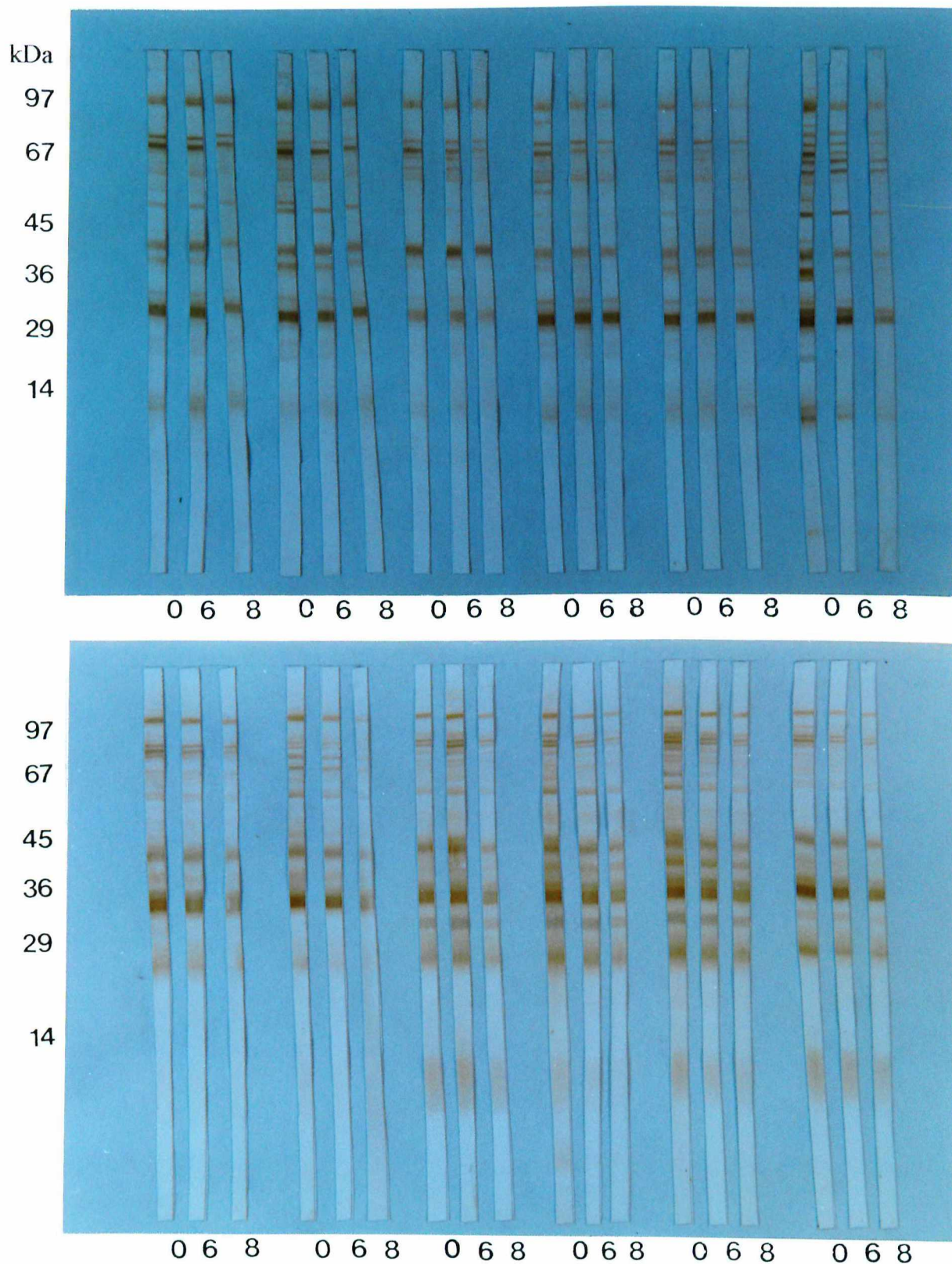


Figura 9 (A e B). Perfil antigênico de *T. gondii* reconhecido por anticorpos IgG específicos em doze amostras de soros humanos do Perfil II (fase de transição), determinados por *Immunoblotting-Avidez*, sem e com tratamento com uréia 6M e 8M. 0 = sem uréia; 6 = uréia 6M e 8 = uréia 8M.

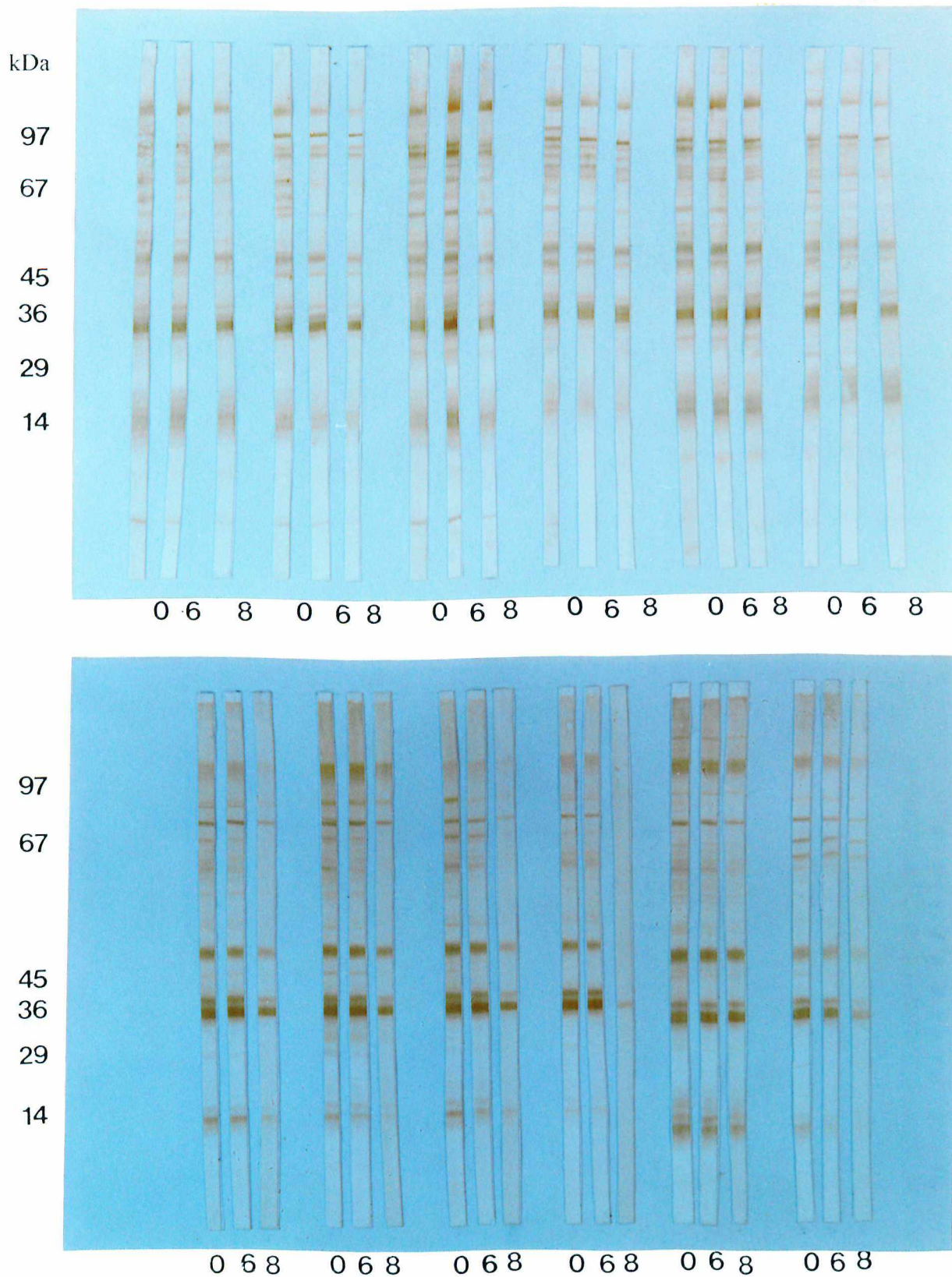


Figura 10 (A e B). Perfil antigênico de *T. gondii* reconhecido por anticorpos IgG específicos em doze amostras de soros humanos do Perfil III (fase crônica), determinados por *Immunoblotting-Aidez*, sem e com tratamento com uréia 6M e 8M. 0 = sem uréia; 6 = uréia 6M e 8 = uréia 8M.

Discussão

5. DISCUSSÃO

A avaliação sorológica do tempo exato da aquisição da infecção por *T. gondii* assume fundamental importância em mulheres grávidas, uma vez que a infecção recente e adquirida requer intervenção e tratamento (LAPALLAINEN *et al.*, 1993). *Toxoplasma* pode atingir o feto a partir da parasitemia materna e, conseqüentemente, causar infecção na placenta, e tanto mais facilmente quanto esta for mais desenvolvida e com melhor irrigação sangüínea (WONG & REMINGTON, 1994). Por isto, é diminuta a probabilidade de contaminação fetal no início da gestação (ASHBURG *et al.*, 1998). Paralelamente, as lesões fetais são tanto mais graves quanto mais precocemente o feto é atingido (CAMARGO, 1996). Constatado a soroconversão, ou diante de um perfil sorológico de infecção recente, eventuais manifestações clínicas e possivelmente toxoplasmose congênita podem ocorrer (LAPALLAINEN *et al.*, 1993). Contudo, a distinção entre as fases da infecção não é fácil.

O aparecimento de anticorpos para a toxoplasmose assinalando a soroconversão de negatividade para positividade dos testes sorológicos traduz a resposta imunológica humoral à infecção recém-adquirida (CAMARGO, 1995).

Os mais característicos marcadores sorológicos no estudo da imunidade anti-toxoplásmica envolvem anticorpos IgG em altos títulos ou em rápida elevação que geralmente refletem imunidade ao parasito e, de

anticorpos IgM que, se presente, revelam infecção recente. Assim, resultados provenientes de indivíduos assintomáticos que possuem títulos não significativamente variáveis de anticorpos IgG anti-toxoplasma em seu soro e que são positivos para anticorpos IgM, são de difícil interpretação quanto ao estágio da infecção em que se encontram (HEDMAN *et al.*, 1989).

Para determinar os anticorpos IgM como indicadores de fase recente, vários ensaios vêm sendo utilizados (CAMARGO, 1995). Porém, em alguns pacientes, os anticorpos IgM podem ser detectados por um longo tempo após a fase aguda da infecção (HEDMAN *et al.*, 1989, CAMARGO, 1995).

A grande sensibilidade de determinados métodos sorológicos aumenta também a possibilidade de obtenção de resultados falso-positivos, sugerindo que a presença de anticorpos IgM não é sempre indicador de infecção recente (FUCCILO *et al.*, 1987) e somente altos títulos destes anticorpos podem ser tomados como limiar seguro entre as formas recentes e crônicas da infecção por *T. gondii* (SIBALIC *et al.*, 1993).

Muitos estudos têm enfatizado o valor da detecção dos anticorpos IgA anti-toxoplasma como marcador diagnóstico da toxoplasmose recente (TAKAHASHI & Rossi, 1994), todavia estes anticorpos são mais detectados em estágios primários da infecção e sua permanência é mais limitada do que os anticorpos IgM (FOUDRINER *et al.*, 1995). Deste modo,

a detecção de anticorpos IgA permite uma maior eficiência como marcador de diagnóstico da toxoplasmose aguda quando realizada juntamente com testes para verificação de anticorpos IgM. Mas, novamente, a presença destes anticorpos pode ter longa persistência de meses ou até anos a partir da infecção primária (WONG & REMINGTON, 1994).

A avidéz de anticorpos IgG específicos representa uma importante ferramenta capaz de distinguir entre infecções recentes e crônicas (HEDMAN *et al.*, 1989; JOYNSON *et al.*, 1990; CAMARGO *et al.*, 1991; LAPPALAINEN *et al.*, 1993; HOLLIMAN *et al.*, 1994 e CAMARGO, 1995).

Nas infecções recentes, uma alta porcentagem desses anticorpos mostra baixa avidéz, isto é, baixa afinidade para os antígenos correspondentes. Durante semanas ou meses, esses anticorpos vão apresentando avidéz crescente, de modo que nas infecções de mais longa duração, encontra-se um predomínio marcante de anticorpos de alta afinidade (WERBLIN *et al.*, 1973).

No presente estudo, o índice de avidéz dos anticorpos IgG específicos obtidos pelo teste ELISA-Avidéz mostrou-se comparável a estudos prévios (CAMARGO *et al.*, 1991; HEDMAN *et al.*, 1989), devido à presença de anticorpos IgG de baixa avidéz na fase recente da infecção. Altos índices de avidéz foram característicos da fase crônica, como descrito por HEDMAN *et al.*, (1989) e LAPPALAINEN *et al.*, (1993), evidenciando uma progressiva maturação da afinidade destes anticorpos

IgG específicos aos antígenos de *T. gondii*, após o desafio antigênico inicial.

A escolha da solução uréica 6M como agente dissociante dos complexos imunes, como proposto por HEDMAN *et al.*, (1989), mostrou ser satisfatório no teste imunoenzimático ELISA-Avidez, resultando em pequenas quedas da reatividade nas amostras de soros de fase crônica (Perfil III) e quedas maiores dos índices de avides nas amostras de soro pertencentes ao grupo de fase recente (Perfil I). Contudo, os resultados do teste ELISA-Avidez exibiram uma grande variação dos índices de avides para os perfis sorológicos I (22-56%), II (22-100%) e III (42-100%) da toxoplasmose, havendo sobreposições de índices de avides principalmente da fase de transição nas fases recentes e crônicas. Deste modo, pode conduzir a resultados de difícil análise para uma caracterização do estágio de infecção em que se encontra o paciente.

Assim, a sorologia da toxoplasmose avaliada pela avides em que os anticorpos IgG ligam-se a seus respectivos antígenos, determinada pelo teste imunoenzimático ELISA-Avidez, não possibilitou uma distinção do Perfil II (fase de transição) aos demais perfis sorológicos.

Um ensaio *Immunoblotting* descrito para a caracterização de antígenos de *T. gondii* reconhecidos por amostras de soros de fase crônica e recente em camundongos infectados, evidenciou componentes antigênicos predominantes ou exclusivos das diferentes fase da infecção

(RAHMAH & ANUAR, 1992), antígenos de vários pesos moleculares e específicos para cada estágio (KASPER, 1989).

As proteínas antigênicas de *T. gondii* reconhecidas por anticorpos IgG humanos, pela técnica *Immunoblotting*, demonstraram que são proteínas estágio-específicas, possibilitando a definição de marcadores de diagnóstico das fases da toxoplasmose (MOIR *et al.*, 1991; GALVAN-RAMIREZ *et al.*, 1998).

Na análise do *Immunoplot*, as proteínas reconhecidas com frequências menores que 50% não foram consideradas como marcadores de diagnósticos da toxoplasmose.

No presente estudo, analisando as amostras de soros humanos dos três perfis sorológicos da toxoplasmose por *Immunoblotting*, foram evidenciadas frações antigênicas exclusivas das fases de perfis I e II, como a banda p10. Analisando a avidéz dos anticorpos IgG que reconheceram este antígeno, verificou-se que estes anticorpos são de alta avidéz durante a fase recente da infecção, não apresentando uma significativa redução em sua frequência após o tratamento com solução de uréia 6M ou 8M. No entanto, p10 não pode ser considerada como marcador antigênico de fase recente, por não estar situada no quadrante IV, devido a sua baixa frequência (30 e 22%, respectivamente) nos perfis I e II da infecção.

A banda antigênica p97 foi reconhecida somente por anticorpos IgG das amostras de soros dos perfis I e III. A avidéz dos anticorpos IgG

que reconheceram este antígeno foi baixa nas amostras do Perfil I e alta nas amostras do Perfil III, após o tratamento com solução de uréia 6M.

A fração antigênica exclusiva de apenas um estágio da infecção foi a p50, que foi evidenciada somente nas amostras do grupo de perfil II, onde demonstrou ser reconhecida por anticorpos IgG de alta avidéz após o tratamento com solução de uréia a 6M.

As bandas p16, p43, p60 e p97 apresentaram uma alta incidência na fase de Perfil I quando comparado aos outros Perfis (II e III), caracterizando-se como marcadores antigênicos deste estágio da infecção, e os anticorpos IgG que reconheceram esta fração baixa avidéz, após o tratamento com solução de uréia 6M e 8M.

Na análise dos diferentes tratamentos (sem uréia, com uréia 6M e 8M) nas amostras de soros de fase recente (Perfil I) da toxoplasmose, os antígenos p16, p32, p38, p40, p43, p54, p60, p66 e p97 foram reconhecidos por anticorpos IgG de baixa avidéz depois de submetidos ao tratamento com solução de uréia 6M. No *Immunoplot*, as bandas antigênicas p40, p54 e p66 não se situaram no quadrante IV, não sendo consideradas, portanto, como bons marcadores diagnósticos do Perfil I. Além das bandas antigênicas que sofreram quedas significativa de suas freqüências após o tratamento com uréia 6M, outras bandas também apresentaram significativas reduções após o tratamento com uréia 8M: p19, p23, p30, p70 e p75, e dentre estas, somente as bandas p19 e p75 situaram no quadrante IV do *Immunoplot*.

Nas amostras de Perfil II da infecção toxoplásmica, as bandas antigênicas p10, p23, p38, p54, p57, p60 e p75 foram reconhecidas por anticorpos IgG de baixa avidéz após o tratamento com solução de uréia 6M. Dentre estas frações antigênicas, somente p23, p54 e a p60 situaram se no quadrante IV do *Immunoplot*, portanto, podendo ser consideradas como marcadores antigênicos de baixa avidéz do Perfil II da toxoplasmose. Após o tratamento com solução de uréia 8M, outras bandas antigênicas sofreram significativas reduções em suas freqüências: p32, p43, p50 e p66. Pelo *Immunoplot* verificou-se que nenhuma destas frações antigênicas situaram-se nos quadrantes I ou IV, portanto, não sendo caracterizadas como marcadores de diagnóstico desta fase da infecção.

Todas as bandas antigênicas reconhecidas por anticorpos IgG das amostras de soros do Perfil III da infecção toxoplásmica, com exceção das bandas p23 e p66, que foram situadas nos quadrantes III e II respectivamente, no *Immunoplot*, não apresentaram reduções significativas em suas freqüências após o tratamento com uréia 6M. Os respectivos anticorpos destas frações antigênicas (p23 e p66) foram portanto, de baixa avidéz. Entretanto, após o tratamento com solução de uréia 8M, as bandas antigênicas p16, p19, p30, p32, p38, p40, p43, p54, p57, p60, p70, p75, p83 e p97 apresentaram diferenças significativas na dissociação do complexo imune, em comparação às amostras não tratadas ou tratadas com solução de uréia 6M. Na análise por

Immunoplot, somente as bandas p16, p54, p60 e p66 situaram-se no quadrante IV.

Estes dados sugerem que o tratamento com solução de uréia 8M leva a uma maior dissociação do complexo imune com um diminuição da avides dos anticorpos IgG na fase crônica da infecção (Perfil III), os quais apresentaram uma alta avides quando tratados com uréia 6M.

Assim, de acordo com os resultados obtidos, a solução de uréia 6M foi escolhida como a mais apropriada para caracterização de anticorpos IgG de baixa avides nas diferentes fases da infecção toxoplásmica.

Deste modo, caracterizamos como bons marcadores antigênicos para *T. gondii*, as bandas antigênicas que foram reconhecidas por anticorpos IgG de baixa avides na fase recente (Perfil I) e que no *Immunoplot* localizaram se no quadrante IV, após o tratamento com solução de uréia 6M; além disto, na fase de transição ou crônica, estas frações antigênicas não se dissociaram, caracterizando o reconhecimento por anticorpos IgG de alta avides. Portanto, as bandas antigênicas consideradas como marcadores de diagnóstico de fase recente foram: p16, p32, p38, p43, p60 e p97.

Dentre estas bandas acima citadas, podemos caracterizar ainda como um ótimo marcador antigênico a proteína p38, que apresentou reatividade com anticorpos de baixa avides na fase de perfil I da

toxoplasmose, com um acentuada queda na freqüência de 80% a 0% após o tratamento com solução de uréia 6M e 8M.

No grupo sorológico de Perfil II, foram considerados com bons marcador antigênico as bandas p23, p54 e p60 reconhecidas por anticorpos IgG de baixa avidéz e também presentes no quadrante IV do *Immunoplot*. Além disto, a banda antigênica p50 foi um marcador exclusivo deste estágio da infecção toxoplásmica.

No grupo sorológico de Perfil III, a presença da banda p60 reconhecida por anticorpos IgG de alta avidéz também podem ser caracterizados como marcadores antigênicos da fase crônica da infecção, na comparação de sua freqüência e avaliação do *Immunoplot*.

A banda p60 reconhecida por anticorpos IgG de alta avidéz na fase crônica pode ser devido à maturação destes anticorpos com o decorrer da infecção, onde os mesmos apresentavam uma baixa avidéz a esta fração antigênica para ambos os perfis I e II.

Através destas análises das frações antigênicas de *T. gondii*, a técnica de *Immunoblotting-Avidéz* demonstrou ter um papel complementar importante na evidenciação de marcadores de diagnósticos capazes de diferenciar as fases da infecção por *T. gondii*.

Conclusões

6. Conclusões

A técnica de Immunoblotting-Avidez foi padronizada e a concentração da solução de uréia na concentração 6M foi considerada a mais apropriada para a caracterização dos marcadores antigênicos que são reconhecidos por anticorpos IgG específicos de baixa avides nas diferentes fases da infecção toxoplásmica.

As bandas antigênicas reconhecidas por anticorpos IgG específicos de baixa avides situados no quadrante IV no Immunoplot foram consideradas como bons marcadores antigênicos nas diferentes fases da infecção toxoplásmica.

No grupo sorológico de Perfil I (fase recente) da toxoplasmose, as bandas antigênicas p16, p32, p38, p43, p60 e p97 foram consideradas como marcadores antigênicos desta fase, por ser reconhecidos por anticorpos de baixa avides na fase recente e alta na fase crônica.

No grupo de Perfil II (fase de transição) da infecção toxoplásmica, as bandas antigênicas p23, p54 e p60 foram consideradas como bons marcadores antigênicos desta fase.

As bandas antigênicas p60 foi reconhecida por anticorpos específicos de alta avidéz na fase crônica (Perfil III) e por anticorpos de baixa avidéz nos perfis I e II, podendo deste modo ser caracterizada como marcador antigênico desta fase da infecção toxoplásmica.

O antígeno p30 não foi considerado marcador antigênico para distinguir as diferentes fases da infecção, uma vez que os anticorpos IgG correspondentes foram determinados como de alta avidéz em todas as fases da infecção com uréia 6M.

A técnica Immunoblotting-Avidéz demonstrou ter um papel complementar importante na detreminação de marcadores antigênicos das fases recente, de transição e crônica da infecção por *T. gondii*.

Summary

7. Summary

We proposed to characterize antigenic markers recognized by human serum samples from patients presenting serological profiles I, II and III of *Toxoplasma* infection, by the determination of IgG antibody avidity, using a modified immunoblotting technique (avidity immunoblotting). This method includes the dissociation of the antigen-antibody interaction with 6M or 8M urea solutions. Human serum samples from 20 patients presenting recent infection (profile I), 45 patients presenting toxoplasmosis transient phases (profile II) and 60 patients with chronic infection (profile III) were analyzed. Good antigenic markers were considered for those antigenic bands recognized by low avidity IgG and situated in the quadrant IV of immunoplot. It was observed that antigenic bands p16, p32, p38, p43, p60 and p97 were more frequently recognized by low avidity IgG in recent infection and by high avidity IgG in chronic toxoplasmosis. From these antigenic bands, p38 can be characterized as an optimal antigenic marker of low avidity for recent form of toxoplasmosis, due to significantly high decrease of their frequency (from 80% to 0%), after treatment with 6M urea solution. The bands p23, p54 and p60 were considered as good antigenic markers for the serological group of profile II. In addition, p60 also was characterized as antigenic marker of the toxoplasmosis chronic phases, because it was recognized profiles I and II. The p30 antigen was not considered as a good marker to distinguish different phases of infection, since corresponding IgG antibodies were determined as high-avidity in all phases of the infection. Thus, the avidity immunoblotting assay demonstrated to be a useful and adequate tool to determine antigenic markers of recent, transient and chronic phases of *T. gondii* infection.

Keywords: *T. gondii*, human toxoplasmosis, IgG avidity immunoblotting

Resumo

8. Resumo

Caracterizamos marcadores antigênicos reconhecidos por amostras de soros humanos de pacientes com perfis sorológicos I, II e III da infecção por *Toxoplasma*, pela determinação da avidéz de anticorpos IgG específicos utilizando uma técnica de *Immunoblotting* modificada (*Immunoblotting-Avidéz*). Este método inclui a dissociação da interação antígeno-anticorpo com soluções de uréia a 6M e 8M. Amostras de soros humanos de 20 pacientes apresentando infecção recente (Perfil I), 45 pacientes na fase de transição da infecção (Perfil II) e 60 pacientes com infecção crônica (Perfil III) foram analisadas. Foram consideradas como bons marcadores antigênicos as bandas reconhecidas por anticorpos IgG de baixa avidéz situadas no quadrante IV do *Immunoplot*. Foi observado que as bandas antigênicas p16, p32, p38, p43, p60 e p97 foram reconhecidas mais freqüentemente por anticorpos IgG de baixa avidéz na infecção recente e por anticorpos IgG de alta avidéz na toxoplasmose crônica. Destas bandas antigênicas, p38 pode ser considerada como um ótimo marcador antigênico de baixa avidéz da fase recente da infecção, devido à acentuada redução na sua freqüência (80% a 0%), após tratamento com solução de uréia 6M. As bandas p23, p54 e p60 foram consideradas como bons marcadores antigênicos para o grupo sorológico de perfil II. Além disto, p60 também pôde ser caracterizada como marcador antigênico da fase, porque foi reconhecida por anticorpos IgG de alta avidéz nesta fase e por anticorpos de baixa avidéz nos perfis sorológicos I e II. O antígeno p30 não foi considerado como bom marcador para distinguir as diferentes fases da infecção, já que anticorpos IgG correspondentes foram determinados como de alta avidéz em todas as fases da toxoplasmose. Assim, a técnica *Immunoblotting-Avidéz* demonstrou ser uma ferramenta útil e adequada para determinar os marcadores antigênicos das fases recente, de transição e crônica da infecção por *T. gondii*.

Referência Bibliográfica

9. Referência Bibliográficas

ACHBAROU, A., MERCEREAU-PUJALON, O., SADAK, A., FORTIER, B., LERICHE, M. A., CAMUS, D. & DUBREMETZ, J. F. Differential targetting of dense granule proteins in the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, 103: 321-329, 1991.

ADES, A. E. Evaluating the sensitivity and predictive value of tests of recent infection: toxoplasmosis in pregnancy. **Epidemiology and Infectious**, 107:527-535, 1991.

AMENDOEIRA, M. R. R. Mecanismos de transmissão da toxoplasmose. In: "Simpósio sobre Toxoplasmose humana - Aspectos Atuais". **Anais da Academia Nacional de Medicina**, 155: 224-225, 1995.

ASAI, T., O'SULLIVAN, W. J. & TATIBANA, M. A protein nucleoside triphosphate hydrolase from the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. **Journal of Biological Chemistry**, 258: 6816-6822, 1983.

ASHBURN D., JOSS, A. W. L., PENNINGTON, T. H. AND HO-YEN, D.O. Do IgA, IgE, and IgG avidity tests have any value in the diagnosis of toxoplasma infection in pregnancy? **Journal of Clinical Pathology**, 51: 312-315, 1998.

BENCHIMOL, E & MOREIRA, R. B. Toxoplasmose ocular. In: "Simpósio sobre Toxoplasmose humana - Aspectos Atuais". **Anais da Academia Nacional de Medicina**, 155: 226-228, 1995.

BORGES, F. A. Pesquisa do antígeno SAG1 (p30) de *Toxoplasma gondii* simultaneamente à detecção de anticorpos e imune-complexos em amostras de líquido cefalorraquiano, reagentes e não reagentes para anticorpos anti- HIV. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 1996. 173p (Dissertação; Mestrado).

BURG, J. D., PERELMAN, D., KASPER, L. H., WARE, P. L. & BOOTHROYD, J. C. Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**, 141: 3584-3591, 1988.

CAMARGO, M. E. Alguns aspectos atuais do diagnóstico de laboratório da Toxoplasmose. In: "Simpósio sobre Toxoplasmose humana - Aspectos Atuais". **Anais da Academia Nacional de Medicina**, 155: 236-239, 1995.

70616.00-091 0536L 10311
CAMARGO, M. E. Toxoplasmose. In: FERREIRA, A. W. & ÁVILA, S. L. **M. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes**, Guanabara Koogan, 165-174, 1996.

- CAMARGO, M. E., LESER, P. G. & LESER, W. S. P. Definição de perfis sorológicos na toxoplasmose. Importância diagnóstica e epidemiológica. *Revista Brasileira Patologia Clínica*, 13: 113-127, 1977.
- CAMARGO, M. E., SILVA, S. M., LESER, P. G. & GRANATO, C. H. Avidéz de anticorpos IgG específicos como marcadores de infecção primária recente pelo *Toxoplasma gondii*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 33: 213-218, 1991.
- CESBRON-DELAUW, M. F., GUY, B., TORPIER, G., PIRCE, R. J., LENZEN, G., CHARIF, H., LEPAGE, P., DARCY, F., LECOCQ, J. P. & CAPRON, A. Molecular characterization of a 23-kilodalton major antigen secreted by *Toxoplasma gondii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83: 100-104, 1989.
- CESBRON-DELAUW, M. F., TOMANO, S., BEAUCHAMPS, P., FOURMAUX, M. F., CAMUS, D., CAPRON, A. & DUBREMETZ, J. F. Similarities between the primary structures of two distinct major surface proteins of *Toxoplasma gondii*. *American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, 269: 16217-16222, 1994.

- CHARIF, H., DARCY, F., TORPIER, G., CESBRON-DELAUW, M. F. & CAPRON, A. *Toxoplasma gondii*: characterization and localization of antigens secreted from tachyzoites. **Experimental Parasitology**, 71: 114-124, 1990.
- CHUMPITAZI, B. F. F., BOUSSAID, A., PELLOUX, H., RACINET, C., BOST, M. & GOULLIER-FLEURET, A. Diagnostic of congenital toxoplasmosis by immunoblotting and relationship with other methods. **Journal of Clinical Microbiology**. 33: 1479-1485, 1995.
- COUVREW, G., SADAK, A., FORTIER, B. & DUBREMETZ, J. F. Surface antigen of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, 97: 1-10, 1988.
- COZON, G. J. N., FERRANDIZ, J., NEBHI, H., WALLON, M. & PEYRON, F. Estimation of the avidity of immunoglobulin G for routine diagnosis of chronic *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women. **European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases**, 17: 32-36, 1998.
- DE ALENCAR, A. A. Toxoplasmose espontânea e inaparente em anfíbios dos gêneros *Leptodactylus* e *Bufo*. **Jornal Brasileiro de Neurologia**, 9, p137-146, 1957.

- DECOSTER, A., CARON, A., DARCY, F. & CAPRON, A. IgA antibodies against P30 as markers of congenital and acute toxoplasmosis. **The Lancet**. 1104-1106, 1988.
- DENKERS, E. Y. & GAZZINELLI, R. T. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. **Clinical Microbiology Reviews**, 11; 569-588, 1998.
- DESMONTS G., COUVREUR J. Congenital toxoplasmosis. A prospective study of the offspring of 542 women who acquired toxoplasmosis during pregnancy. Pathophysiology of congenital disease. In: Thalhammer O., Baumgarten k., Pollak A., eds. **Pathophysiology of congenital disease. Perinatal medicine. Sixth European Congress of Vienna. Stuttgart, Germany: Thieme, 51-60p, 1978.**
- FONSECA, G. L. & FACHADO, C. A. The identification and isolation of *Toxoplasma gondii* antigens. **Revista Cubana del Medicina Tropical**, 47: 171-177, 1995.

FOUDRINIER, F., MARX-CHEMLA, C., AUBERT, D., BONHOMME, A. & PINON J. M. Value of specific immunoglobulin A detection by two immunocapture assays in the diagnosis of toxoplasmosis. **European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases**, 14: 585-590, 1995.

FOURMAUX, M. N., ACHBAROU, A., MERCEREAU-PIUIJALON, O., BIDERRE, C., BRICHE, I., LOYENS, A., ODBERG-FERRAGUT, C., CAMUS, D. & DUBREMETZ, J. F. The MIC1 microneme protein of *Toxoplasma gondii* contains a duplicated receptor-like domain and binds to host cell surface. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 83: 201-210, 1996.

opção de citação (616.3 D6493)
 FRENKEL, J. K. Toxoplasmose. In: VERONESI, R., ÉMER, et al. **Doenças Infecciosas e Parasitárias**, 8ª ed., São Paulo: Guanabara Koogan, 88: 734-749, 1995.

FUCCILO, D. A., MADDEN, D. L., TZAN, N. & SEVER, J. L. Difficultes associated with serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infections. **Diagnostic Clinical Immunology**, 5: 8-13, 1987.

- GALVÁN-RAMIREZ, M.L., GUILLÉN-VARGAS, C., SAAVEDRA-DURAN, R. & RODRIGUES, A. Analysis of *Toxoplasma gondii* antigens with sera from toxoplasmosis patients. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 31; 271-277, 1998.
- GARCIA, A. Aspectos morfológicos feto- placentários na infecção congênita pelo *Toxoplasma gondii*. In: "Simpósio sobre Toxoplasmose humana - Aspectos Atuais". **Anais da Academia Nacional de Medicina**, 155: 229-2231, 1995.
- GARCIA, JL, NAVARO, IT, OGAWA, L, de OLIVEIRA RC & KOBILKA, E. Seroprevalence, epidemiology and ocular evaluation of human toxoplasmosis in the rural zone Jauguapita (Paraná) Brazil. **Revista Panamericana del Salud Publica**, 6: 157-163, 1999.
- GLASNER PD, SILVEIRA C, KRUSZON-MORAN D, MARTINS MC, BURNIER JUNIOR M, SILVEIRA S, CAMARGO ME, NUSSENBLATT RB, KASLOW RA, BELFORT JUNIOR R. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. **American Journal of Ophthalmology**, 114: 136-144, 1992.

- GOLDBLATT, D., PINTO, A. R. J. P. M. & MILLER, E. Antibody avidity as a surrogate marker of successful priming by *Haemophilus influenzae* type B conjugate vaccines following infant immunization. **Journal of Infectious Diseases**, 117: 1112-1115, 1998.
- GRIMWOOD, J. & SMITH, J. E. *Toxoplasma gondii*: the role of parasite surface and secreted proteins in host cell invasion. **Journal of Parasitology**, 26: 164-173, 1996.
- GROSS, U., KEKSEL, O. & DARDE, M.L. Value of detecting immunoglobulin E antibodies for the serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, 4: 247-251, 1997.
- GROSS, U., ROOS, T., APPOLDT, D. & HEESEMANN, J. Improved serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection by detection of immunoglobulin A (IgA) and IgM antibodies against P30 by using the immunoblot technique. **Journal of Clinical Microbiology**, 30: 1236-1441, 1992.

GUIMARÃES A. C., KAWARABAYASHI M., BORGES, M. M.,
TOLEZANO, J. E. & ANDRADE JUNIOR, H. F. Regional variation in
toxoplasmosis seronegativity in the São Paulo metropolitan region.
Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 35: 479-
483, 1993.

GUTIERREZ, J. & MAROTO, C. Are IgG antibody avidity assays useful in
the diagnosis of infections diseases? A review. **Microbios**. 87: 113-
121, 1996.

GUTIERREZ, J., RODRIGUES, M. J., DE ORY, F., PIEDROLA, G. &
MAROTO, M.C. Reliability of low avidity IgG and of IgA in the
diagnosis of primary infection by rubella virus with adaptacion of a
commercial test. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**. 13: 1-4,
1999.

HEDMAN, K., LAPPALAINEN, M., SEPPAIA, I. & MAKELA, O. Recent
primary toxoplasma infection indicated by a low avidity of specific IgG.
The Journal of Infectious Diseases, 159: 736-740, 1989.

HÉRION, P., HERNANDEZ-PANDO, R., DUBREMETZ, J. F. &
SAAVEDRA, R. Subcellular localization of the 54kDa antigen of
Toxoplasma gondii. **Journal of Parasitology**, 79 (2): 216-222, 1993.

- HERNE, V., HEDMAN, K. & REEDIK, P. Immunoglobulin G avidity in the serodiagnosis of congenital rubella syndrome. **European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases**, 16:763-766,1997.
- HOLLIMAN, R. E., RAYMOND, R., RENTON, N. & JOHNSON, J. D. The diagnosis of toxoplasmosis using IgG avidity. **Epidemiology and Infection**, 112: 399-408, 1994.
- JACKSON, M. H. & HUTCHISON, W. M. The prevalence and source of *Toxoplasma* infection in the environment. **Advances in Parasitology**, 28: 55-105, 1989.
- JACOBS, D., VERCAMMEN, M. & SAMAN, E. Evaluation of recombinant dense granule antigen 7 (GRA 7) of *Toxoplasma gondii* for detection of immunoglobulin G antibodies and analysis of a major antigenic domain. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, 6: 24-29, 1999.
- JENUN, P. A., STRAY-PEDERSEN, B. & GUNDERSEN, A. G. Improved diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in early pregnancy by determination of antitoxoplasma immunoglobulin G avidity. **Journal of Clinical Microbiology**, 35: 1972-1977, 1997.

- JOYNSON, D. H. M., PAYNE, R. A. & RAWAL, B. K. Potential role of IgG avidity for diagnosing toxoplasmosis. **Journal of Clinical Pathological**, 43: 1032-1033, 1990.
- KASPER, L. H. & MINEO, J. R. Attachment and invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. **Parasitology Today**, 10: 184-187, 1994.
- KASPER, L. H. Identification of stage-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. **Infectious Immunology**, 57: 668-672, 1989.
- KASPER, L. H., CRABL, J. H. & PFEFFERKORN, E. R. Purification of a major membrana protein of *Toxoplasma gondii* by immunoabsorption with a monoclonal antibody. **Journal of Immunology**, 130: 2407-2412, 1983.
- KASPER, L.H., JOHN, J. & BOOTHROYD, C. *Toxoplasma gondii* and toxoplasmosis. In: Warren, K.S. **Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infections**, 3th. Blackwell Scientific Publications, 269-301, 1993.
- KAWAZOE, U. *Toxoplasma gondii*. In: NEVES, D. P., MELO, A. L., GENARO, O. & LINARDI, P. M. **Parasitologia Humana**, 9^a ed., Atheneu, 174-200, 1995. 199
5-16-8:61 113187

KOPPE J. G., LOEWER-SIEGER D. H., de ROEVER-BONNET H.
Results of 20-year follow-up of congenital toxoplasmosis. **The Lancet**,
1: 254-256, 1986.

KORHONEN, M. H., BRUNSTEIN, J., HAARIO, H., KATNIKOV, A.
RESCALDANI, R. & HEDMAN, K. A new method with general
diagnostic utility for the calculation of immunoglobulin G avidity.
Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 6: 725-728, 1999.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the
head of bacteriophage T4. **Nature**, 227: 680-685, 1970.

LAFARGA, B., NOGUERA, F. J., PEREZ, M. C., COPADO, R., GARCIA,
A. & SORIA, E. Usefulness of determining low-avidity IgG antibodies
in the diagnosis of primary rubella infection in pregnancy women.
Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 16: 413-418, 1998.

LAPPALAINEN, M., KOSKELA, P., KOSKINIEMI, M., AMMALA, P.,
HIILESMAA, V., TERAMO, K., RAIVIO, K., REMINGTON, J. F. &
HEDMAN, K. Toxoplasmosis acquired during pregnancy: Improved
serodiagnosis based on avidity of IgG. **The Journal of Infectious
Diseases**, 167: 691-697, 1993.

- LAPPALAINEN, M., KOSKINIEMI, M., HIILESMAA, V., AMMALA, P., TERANO, K., KOSKELA, P., LEBECH, M., RAIPIO, K. O. & HEDMAN, K. Outcome of children after maternal primary *Toxoplasma* infection during pregnancy with emphasis on avidity of specific IgG. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, 14: 354-361, 1995.
- LECORDIER, L., MERCIER, C., TORPIER, G., TOURVIELLE, B., DARCY, F., LUI, J. L., MAES, P., TARTAR, A., CAPRON, A. & CESBRON-DELAUW, M. F. Molecular structure of a *Toxoplasma gondii* dense granule antigen (GRA 5) associated with the parasitophorous vacuole membrane. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 59: 143-153, 1993.
- LERICHE, M. A. & DUBREMETZ, J. F. Characterization of the proteins of rhoptries and dense granules of *Toxoplasma gondii* by subcellular fractionation and monoclonal antibodies. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 45: 249-260, 1991.
- LEVINE, N. D. Taxonomy of *Toxoplasma*. **Journal of Protozoology**, 24, p.36-41, 1977.

- LIMA, A. L. Toxoplasmose e AIDS. In: "Simpósio sobre Toxoplasmose humana - Aspectos Atuais". **Anais da Academia Nacional de Medicina**, 155: 232-235, 1995.
- MARTIN, V., ARCAVI, M., SANTILLAN, G., AMENDOEIRA, M. R. R., NEVES, E. S., GRIEMBERG, G., GUARNERA, E. GARBERI, J. C. & ANGEL, S. O. Detection of human toxoplasma-specific immunoglobulins A, M, and G with a recombinant *Toxoplasma gondii* Rop2 protein. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, 5: 627-631, 1998.
- MERCIER, C., LECORDIER, L., DARCY, F., DESLEE, D., MURRAY, A., TOURVIEILLE, B., MAES, P., CAPRON, A. & CESBRON-DELAUW, M. F. Molecular characterization of a dense granule antigen (GRA 2) associated with the network of the parasitophorous vacuole in *Toxoplasma gondii*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 58: 71-82, 1993.
- MEVELEC, M. N., CHARDES, T., MERCEREAU-PUIJALON., BOURGIN, I., ACCHABAROU, A., DUBREMETZ, J. F. & BOUT, D. Molecular cloning of GRA 4, a *Toxoplasma gondii* dense granule protein, recognized by mucosal IgA antibodies. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 56: 227-238, 1992.

- MINEO, J. R., CAMARGO, M. E. & FERREIRA, A. W. Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Toxoplasma gondii* polysaccharides in human toxoplasmosis. **Infection Immunity**, 27: 283, 1980.
- MOIR, I. L., DAVIDSON, M. M. & HO-YEN, D. O. Comparison of IgG antibody profiles by immunoblotting in patients with acute and previous *Toxoplasma gondii* infection. **Journal of Clinical Pathology**, 44: 569-572, 1991.
- MORGAN-CAPNER, P. & THOMAS, H. I. J. Serological Distinction between primary rubella and reinfection. **The Lancet** 1988.
- MORRISSETTE, N. S., BEDIAN, V., WEBSTER, P. & ROOS, D. S. Characterization of extreme apical antigens from *Toxoplasma gondii*. **Experimental Parasitology**, 79: 445-59, 1994.
- MOULIN, A. M. Historical Introduction: the Institut Pasteur's contribution. 48th Forum in Immunology. **Rev. Immunology**. Paris, 144: 8-13, 1993.
- NEVES, D. P., MELO, A. L., GENARO, O. et al. **Parasitologia Humana**. 9ª ed., São Paulo: Atheneu, 524p, 1995.

- OKAY, T. S. Etude de la Kystogenese di *Toxoplasma gondii* chez la rat immunocompetent ou immunodeprime et dans un modele d'infection congenitale. Caracterisation genotypique de differentes souches et clones toxoplasmiques por amplification aleatoire. Grenoble: Universit Joseph Fourier, 1994. 118p, (Tese; Doutorado).
- OSSORIO, P. N., SCHWARTZMAN, J. D. & BOOTHROYD, J. D. A. *Toxoplasma gondii* rhoptry protein associated with host cell penetration has unusual change asymmetry. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 50: 1-16, 1992.
- PARTANEN, P., TURUNEN, H. J., PAASIVUO, R. T. A. & LEINIKKI, P. O. Immunoblot analysis of *Toxoplasma gondii* antigens by human immunoglobulins G, M, and A antibodies at different stages of infection. **Journal of Clinical Microbiology**, 20: 133-135, 1984.
- PATEL, B., YONG, Y., DUFFY, K., TANNER, R. P., JOHNSON, J. & HOLLIMAN R. E. Immunoglobulin A detection and the investigation of clinical toxoplasmosis. **Journal of Medical Microbiology**, 38: 286-92, 1993.

PAUL, M. Immunoglobulin G avidity in diagnosis of toxoplasmic lymphadenopathy and ocular toxoplasmosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, 6: 514-518, 1999.

PAUL, M. Use of the ISAGA method in detection of specific IgM, IgA, IgE antibodies in acquired and congenital toxoplasmosis. **Wiad Parazytol.** 43: 39-51, 1997.

PELLOUX, H., BRUN, E., VERNET, G., MARCILLAT, S., JOLIVET, M., GUERGOUR, D., FRICKER-HIDALGO, H., GOULLIER-FLEURET, A. AND AMBROISE-THOMAS, P. Determination of anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulin G avidity: adaptacion to the vidas sistem (bio Merieux). **Diagnostic and Microbiology Infectious Diseases**, 32: 69-73, 1998.

PESSOA, S. B. Sporozoa - Família Sarcocystidae: Gênero *Toxoplasma* e *Sarcocystis*. In. Pêsoa, S. B.; Martins, A. V. **Parasitologia Médica**. 11ed. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, 252-274, 1982.

PFEFFERKORN, E. The cell biology of *Toxoplasma gondii*: In "Modern Parasite Biology": **Cellular Immunological and Molecular Aspects**. (D. J. WYLER, ed). Freeman, New York; 26-50, 1990.

- RAHMAH, N. & ANUAR, K. Demonstration of antigenic similarities and variations in excretor/secretory antigens of *Toxoplasma gondii*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 187: 294-298, 1992.
- REMINGTON, J. S. Toxoplasmosis in the adult. **Bull. N. Y. Acad. Med.**, 50: 211-227, 1974.
- REY, L. *Toxoplasma gondii* e Toxoplasmose. In: REY, L. **Parasitologia**, 2ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Kooga; 274-285, 1991.
- RICCIARDI, I. D., SABROZA, P. C., SANDOVAL, E. D. & MAYRINK, W. Seroepidemiological study in the prevalence human toxoplasmosis in Brazil. **Rev. Microbiol**, 9: 181-187, 1978.
- ROITT, I., BROSTOFF, J. & MALE, D. Reconhecimento dos antígenos. **Imunologia**, 4ed. Editora Manole LTDA, São Paulo-SP, 7.1-7.12, 1997.
- SADAK, A., TAGHY, Z., FORTIER, B. & DUBREMETZ, J. F. Characterization of a family of rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 29: 203-211, 1988.

- SCHUBERT, J., ZENS, W. & WEISSBRICH, B. Comparative evaluation of the use of immunoblots and of IgG avidity assays as confirmatory tests for the diagnosis of acute EBV infections. **Journal of Clinical Virology**, 11: 161-72, 1998.
- SIBALIC, D., BOBIC, B. & DJURKOVIC-DJAKOVIC, O. Specific IgM antibodies as parameters of toxoplasma infection in pregnancy. **Gyneccol. Obster. Invest**, 36: 91-95, 1993.
- SIBLEY, L. D., NIESMAN, I. R., ASA, T. & TAKEUCHI, T. *Toxoplasma gondii*: secretion of a potent nucleoside triphosphate hydrolase into the parasitophorous vacuole. **Experimental Parasitology**, 74: 303-311, 1994.
- SOUZA, W. Fine structure of the conoid of *Toxoplasma gondii*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 16: 32-38, 1974.
- SOUZA, W.J. S., COUTINHO, S.G., LOPES, C. W. G., SANTOS, C. S., NEVES, N. M. & CRUZ, A. M. Epidemiological aspects of toxoplasmosis in school children residing in localities with urban or rural characteristics within the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro)**, 82: 475-82. 1987.

- TAKAHASHI, E. E. H. & ROSSI, C. IgM and IgA antibody responses in 12 cases of human acquired toxoplasmosis. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 39: 327-331, 1997.
- TAKAHASHI, E. E. H. & ROSSI, C. L. Use of three immunological techniques for the detection of *Toxoplasma* sp IgA antibodies in acute toxoplasmosis. **Journal of Clinical Pathology**, 47: 1101-1104, 1994.
- THOMAS, H. I. J. & MORGAN-CAPTER, P. The use of antibody avidity measurements for the diagnosis of rubella. **Rev. Med. Virol.** 1: 41-50, 1991.
- THOMAS, H., I., J., MORGAN-CAPNER, P., ROBERTS, A. & HESKETH, L. Persistent rubella specific IgM reactivity in the absence of recent primary rubella and rubella reinfection. **Journal of Medical Virology**, 36: 188-192, 1992.
- TOWBIN, H., STAEBELIN, T. & GORDON, J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 76: 4350-4354, 1994.

VINHAL, F. A., PENA, J. D. O., KATINA, J. H., BRANDÃO, E. O., SILVA, D. A. O., OREFICE, F. & MINEO, J. R. Analysis of aqueous humor in ocular toxoplasmosis: detection of low avidity IgG specific to *Toxoplasma gondii*. **Applied Parasitology**, 35: 1-7, 1994.

WAN, K. L., CARRUTHERS, V. B., SIBLEY, L. D. & AJIOKA, J. W. Molecular characterisation of na expressed sequence tag locus of *Toxoplasma gondii* encoding the micronemal protein MIC 2. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 84: 203-214, 1997.

WONG, S. Y. & REMINGTON, J. S. Toxoplasmosis in pregnancy. **Clinical Infectious Diseases**, 18: 853-862, 1994.

ZANGERLE R, ALLERBERGER F, POHL P, FRITSCH P, DIERICH MP. High risk of developing toxoplasmic encephalitis in AIDS patients seropositive to *Toxoplasma gondii*. **Med. Microbiol. Immunol.** 180: 59-66, 1991.

ZOTTI, C., MAIELLO, A., MOIRAGHI-RUGGENINI, A., SACCO, T., PARUSSO, R., FERRERO, C. & BARALE, A. Reactivity of antigenic fractions obtained from *Toxoplasma gondii* evaluated with western blotting. **Boll. Ist. Sieroter Milan.** 68: 167-73, 1989.