

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

AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS REATIVOS
AOS ANTÍGENOS P30, P22 E P97 DE *Toxoplasma gondii*,
EM ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO REVERSO, UTILIZADOS
NA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG, IgM E IgA PARA O
SORODIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE HUMANA

FERNANDO DOS REIS DE CARVALHO

UBERLÂNDIA - MG

2006

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

**AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS REATIVOS
AOS ANTÍGENOS P30, P22 E P97 DE *Toxoplasma gondii*,
EM ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO REVERSO, UTILIZADOS
NA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG, IgM E IgA PARA O
SORODIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE HUMANA**

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

FERNANDO DOS REIS DE CARVALHO

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ ROBERTO MINEO

CO-ORIENTADORA: DRA. DEISE APARECIDA DE OLIVEIRA SILVA

UBERLÂNDIA - MG

2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de
Catalogação e Classificação

- C331d Carvalho, Fernando dos Reis de, 1980-
 Detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA reativos aos antígenos P30,
 P22 e P97 de *Toxoplasma gondii* para o sorodiagnóstico da Toxoplasmose
 humana induzida por *Toxoplasma gondii* / Fernando dos Reis de Car-
 valho. - 2006.
 98 f. : il.
 Orientador: José Roberto Mineo.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Progra-
 ma de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
 Inclui bibliografia.
 1. Toxoplasmose - Teses. 2. *Toxoplasma gondii* - Teses. I. Mineo, José
 Roberto. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Gra-
 duação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 616.993.1

Dedico este trabalho aos meus pais, *Natal e Ana Valéria*.

À minha avó, *Saturnina*.

À minha esposa, *Lisiane*.

Aos meus filhos, *Ana Elisa e Paulo Fernando*.

*“Todo saber e todo aumento de nosso saber, em vez de terminar em uma
solução, dá antes, início a nova dúvida.
Aumentar o saber significa aumentar as dúvidas.
E a cada resposta nova, nova pergunta se segue.”*
(Herman Hesse)

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A DEUS,

pela coleção de oportunidades oferecidas no meu caminho, por ter me enriquecido com coragem, persistência e força de vontade para enfrentar os desafios impostos pela vida, por ter permitido que eu trilhasse meu caminho e chegasse até onde estou e por ter colocado, em meu caminho, pessoas incríveis, com as quais posso contar em qualquer circunstância.

Aos meus pais, Natal e Ana Valéria,

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

À minha esposa Lisiane,

pelo apoio a todas as minhas realizações, pela compreensão nos momentos de ausência durante a conclusão deste trabalho, pela força nos momentos difíceis da caminhada, pela lucidez nos momentos de desespero e pelo carinho e alegria que tem trazido à minha vida.

Aos meus pequenos, Ana Elisa e Paulo Fernando,

pelo brilho e pela alegria que trouxeram à minha vida e pela compreensão nos muitos programas “furados” dos últimos tempos.

Ao meu orientador, *Prof. Dr. José Roberto Mineo*,
pelos valiosos conhecimentos adquiridos durante este curso, pela compreensão e
paciência nos momentos de falhas e nas situações especiais, pelas “broncas” necessárias
nos momentos adequados, pelas brilhantes contribuições apresentadas durante a
execução deste trabalho, pela conversa franca e sincera no momento mais delicado e por
ser um grande exemplo de profissionalismo, ética e competência.

À minha co-orientadora, *Dra. Deise A. O. Silva*,
pela inigualável e irretribuível contribuição prestada em todos os momentos da
execução deste trabalho, desde sua concepção até sua completa conclusão, pela
disposição e boa vontade com que se dispôs a me ajudar a todos os instantes, inclusive
nos seus momentos de descanso, pelas palavras amigas e encorajadoras nos momentos
difíceis, pelo espírito materno com que trata a todos com quem trabalha e pelas grandes
lições de vida apresentadas neste período.

Aos amigos e colaboradores, *Carolina Salomão, Gabriele Garcias*,
Renan Henriques, Samantha Béla e Taísa Carrijo,
pela grande ajuda na execução dos procedimentos experimentais, sem a qual a
conclusão deste trabalho não teria sido possível e pela disposição em deixar seus
próprios trabalhos para me auxiliar.

AGRADECIMENTOS

Aos professores *Dr. Ernesto Taketomi, Dra. Janethe Pena e Dra. Divina Queiroz*, pela participação na banca de qualificação e pelas valiosas contribuições apresentadas a este trabalho.

Ao amigo *Jair Júnior*, pelos ensinamentos em algumas técnicas de laboratório e por ter cedido os sobrenadantes de cultura de hibridomas contendo alguns dos anticorpos monoclonais usados neste trabalho.

À amiga *Flávia Chaves*, pelos ensinamentos práticos e por ter cedido algumas amostras de soros usadas neste trabalho.

À Profa. *Dra. Neide Silva*, pelas lições práticas e pelos ensinamentos práticos no laboratório, além do exemplo de dedicação e profissionalismo.

Aos amigos e companheiros do grupo Apicomplexa: *Ana Cláudia, Cristina, Janaína, Celene, Mônica, Bellisa, Idessânia, Mariana, Lorena, Carla, Dâmaso*, pelo excelente convívio neste período, pelas contribuições a este trabalho e a outras atividades e pelos bons momentos compartilhados no dia-a-dia do laboratório.

Aos demais amigos e companheiros de convívio do laboratório: *Leandro, Rafael, Priscilla, Ronaldo, Cristiane, Jorge, Sheila, Fabíola, Maria Margarida*, pelos bons e alegres momentos de convivência no laboratório e pelos conhecimentos compartilhados.

Aos demais colegas da Pós-Graduação: *Camila, Lourenço, Núbia, Cristiane, Hamílton, Flávio, Maria Cecília, Patrícia, Lizandra, Meimei*, pelo companheirismo durante a conclusão das disciplinas do curso.

Aos técnicos do Laboratório de Imunoparasitologia, *Andréia, Júnior e Marley*, pelo apoio na rotina laboratorial e pelo cuidado com os animais de experimentação.

Aos secretários do Laboratório de Imunologia, *Max*, e da Pós-graduação, *João Neto e Lucileide*, pela atenção e boa vontade na solução dos nossos problemas.

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

Às agências brasileiras financiadoras de pesquisa, *CAPES*, *CNPq* e *FAPEMIG*, pelo apoio financeiro fornecido à aquisição de material e reagentes para a execução deste trabalho, em especial à *CAPES* e ao *CNPq*, pelas bolsas de auxílio financeiro oferecidas durante este curso.

À *Lúcia Chaves*, pela compreensão e flexibilização dos meus horários de trabalho nos últimos meses, para a conclusão deste trabalho.

À *Tianinha*, pela atenção, pelo carinho, pela força positiva e pela torcida durante todo este trabalho.

Aos meus amigos, *Daniel*, *Mirela*, *Raquel* e *Laureane*, pela compreensão, pelos bons momentos de convívio e pela ajuda doméstica nos momentos mais complicados.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS	Absorbância
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis-3-etil-benzotiazolina sulfônico
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BSA	Soroalbumina bovina
CCR 5	Receptor 5 de quimiocinas CC
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
cm	Centímetro
C-18	Ciclofilina 18
DAT	Teste de Aglutinação Direta
DC	Célula dendrítica
Der p 2	Alérgeno do grupo 2 de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
DL100	Dose Letal de 100%
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DO	Densidade óptica
ELISA	Ensaio imunoenzimático
ESA	Antígenos secretados e/ou excretados de <i>Toxoplasma gondii</i>
Fc	Fração cristalizável de imunoglobulina.
fg	Fentograma
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
g	Grama
g	Força relativa da gravidade
GPI	Glicosil-fosfatidil-inositol.
GRA	Antígeno de grânulo denso de <i>Toxoplasma gondii</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
Hz	Hertz
IA	Índice de avides
IC	Intervalo de confiança
IE	Índice ELISA
IFAT	Teste do anticorpo fluorescente indireto
IFN-γ	Interferon- γ
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IHAT	Teste de hemaglutinação indireta
IHC	Imuno-histoquímica
IL	Interleucina
kDa	KiloDalton
LXA₄	Lipoxina A ₄
M	Molar
mA	MiliAmpére
mAb	Anticorpo monoclonal
MAT	Teste de aglutinação direta modificada
MGE	Elementos genéticos móveis.
MIC	Antígeno de micronema de <i>Toxoplasma gondii</i>
mg	Miligrama
mL	Mililitro

mM	MiliMolar
mm	Milímetro
Mr	Massa molecular
NK	Célula <i>natural killer</i>
nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
pb	Pares de bases
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PBS-T	PBS acrescido de Tween 20 a 0,05%
PBS-TM	PBS-T acrescido de leite desnatado a 5%
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG 1500	Polietilenoglicol 1500
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoreto
RNI	Reativos intermediários do nitrogênio
ROI	Reativos intermediários do oxigênio
ROP	Antígeno de roptria de <i>Toxoplasma gondii</i>
RPMI 1640	Meio de cultura desenvolvido no <i>Roswell Park Memorial Institute</i> (1969)
SAG	Antígeno de superfície de <i>Toxoplasma gondii</i> ligados a âncoras de glicosil-fosfatidil-inositol
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
SFDT	Teste do corante de Sabin-Feldman
SRS	Superfamília de seqüências relacionadas à SAG1
STAg	Antígeno solúvel de taquizoítas de <i>Toxoplasma gondii</i>
TBS-T	Solução salina tamponada com Tris acrescida de Tween 20 a 0,05%
Th1	Resposta imune do subtipo T <i>helper</i> 1
TLA	Antígeno lisado de <i>Toxoplasma gondii</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	MicroMolar
°C	Grau Celsius
2ME	2-mercaptoetanol

RESUMO

O diagnóstico da toxoplasmose se baseia na detecção de anticorpos específicos em amostras de soro de pacientes, por meio de técnicas sorológicas, particularmente as imunoenzimáticas. As maiores dificuldades na interpretação destes testes referem-se aos resultados falso-positivos e falso-negativos, principalmente com relação à detecção de anticorpos IgM e IgA anti-*Toxoplasma gondii*, tornando difícil o estabelecimento do diagnóstico da infecção primária e infecção congênita. O presente trabalho objetivou avaliar a utilização de anticorpos monoclonais (mAbs) A3A4 (anti-p30), A4D12 (anti-p22) e 1B8 (anti-p97) em um ensaio imunoenzimático (ELISA) reverso para a detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA contra os antígenos p30, p22 e p97 de *T. gondii* em soros humanos. Foram analisadas 175 amostras de soros de pacientes com infecção recente (n=45), na fase de transição (n=40) e com infecção crônica (n=55), bem como de indivíduos soronegativos (n=35), definidos por testes sorológicos convencionais. Os resultados obtidos por ELISA reverso usando mAbs (ELISA-mAb) foram comparados aos do ELISA indireto clássico usando antígeno solúvel de *T. gondii* (ELISA-STAg). O mAb A3A4 reconhece um epítipo conformacional no antígeno de superfície p30, enquanto os mAbs A4D12 e 1B8 reconhecem epítopos lineares, respectivamente, no antígeno de superfície p22 e no antígeno citoplasmático p97 de taquizoítas de *T. gondii*. Em testes ELISA de inibição utilizando soros positivos para competir com os mAbs pela ligação a seus respectivos antígenos, o mAb A3A4 apresentou maior capacidade de competição que os mAbs A4D12 e 1B8. Os resultados dos ELISA-mAbs A3A4 e A4D12 para a detecção de IgG anti-p30 e anti-p22, respectivamente, foram altamente correlacionados com aqueles obtidos pelo ELISA-STAg. Em relação à detecção de IgM e IgA, os resultados do ELISA-mAb A4D12 (anti-p22) foram mais correlacionados com aqueles determinados pelo ELISA-STAg. ELISA-mAb 1B8 não mostrou associações significativas com ELISA-STAg para todos os isotipos de anticorpos analisados. Em conclusão, a detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA específicos aos antígenos p30, p22 e p97 de *T. gondii* foi demonstrada, pela primeira vez, utilizando um ELISA reverso com mAbs que capturam estes antígenos presentes no STAg. Desta forma, os ELISA-mAbs A3A4 e A4D12 para a captura dos antígenos p30 e p22 mostraram representar métodos alternativos para a detecção de anticorpos específicos a *T. gondii* e podem ser considerados como ferramentas adicionais para um diagnóstico mais seguro da toxoplasmose, particularmente nos casos de infecção primária e congênita.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*. Sorodiagnóstico. Anticorpos monoclonais. ELISA indireto. ELISA reverso.

SUMMARY

The diagnosis of toxoplasmosis can be achieved by detecting specific antibodies in patient serum samples using serological methods, mainly the enzymatic ones. But these tests give a lot of false-positive and false-negative results, mostly for IgM and IgA antibodies, making the diagnosis of primary and congenital infections a challenging situation. This way, the present study aimed to evaluate the diagnostic performance of the monoclonal antibodies (mAbs) A3A4 (anti-p30), A4D12 (anti-p22) e 1B8 (anti-p97) in a reverse ELISA (ELISA-mAb) to detect IgG, IgM and IgA antibodies anti-*T. gondii* in human serum samples. It was analysed 175 serum samples from patients at different stages of infection: recent (n=45), transitional phase (n=40) and chronic (n=55), and negative subjects (n=35) defined by conventional *T. gondii* serology. The achieved results were compared with those obtained by indirect ELISA using soluble *T. gondii* antigen (ELISA-STAg). The mAb A3A4 recognizes a conformational epitope in the p30 surface antigen of *T. gondii* tachyzoites, while A4D12 and 1B8 recognize linear epitopes in the p22 surface and p97 cytoplasmatic antigens, respectively. In an inhibition ELISA test, in which human sera with specific *T. gondii* IgG antibodies were used to compete with the mAbs for binding to their specific antigens, it was demonstrated that the mAb A3A4 rather than A4D12 and 1B8 showed a better competition capability. The results achieved by reverse ELISA-IgG using the mAbs A3A4 or A4D12 to detect IgG antibodies anti-p30 and anti-p22, respectively, were highly correlated with those obtained by ELISA-STAg, whereas the ELISA-mAb using A4D12 (anti-p22) for the detection of IgM and IgA isotypes showed the highest correlation with ELISA-STAg for both isotypes. ELISA-mAb using 1B8 did not showed significant associations with ELISA-STAg for all the immunoglobulin isotypes researched. In conclusion, this is the first report analyzing the performance of a reverse ELISA for the detection of IgG, IgM and IgA isotypes towards native p22, p30 and p97 molecules from STAg, using a panel of human sera from patients with recent and chronic toxoplasmosis. Thus, reverse ELISA based on capture of native p22 and p30 antigens of STAg by mAbs constitutes an alternative approach that may be considered as an additional tool for the serological diagnosis of toxoplasmosis, particularly in cases of primary and congenital infections.

Keywords: *Toxoplasma gondii*. Serodiagnosis. Monoclonal antibodies. Indirect ELISA. Reverse ELISA.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	15
1.2 Hospedeiros intermediários e definitivos.....	15
1.3 Ciclo Biológico.....	16
1.4 Transmissão.....	17
1.5 Características morfológicas e ultraestruturais.....	20
1.6 Linhagens de <i>T. gondii</i>	24
1.7 Patogênese e interação parasita-hospedeiro.....	26
1.8 Antígenos de <i>T. gondii</i>	28
1.9 Resposta imune.....	30
1.9.1 Imunidade celular.....	30
1.9.2 Imunidade humoral.....	32
1.10 Quadro clínico.....	33
1.11 Diagnóstico.....	35
1.11.1 Métodos diretos.....	36
1.11.1.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	36
1.11.1.2 Imunohistoquímica.....	38
1.11.1.3 Isolamento em animais ou cultura celular.....	38
1.11.2 Métodos indiretos.....	39
1.11.2.1 Teste do corante de Sabin-Feldman (SFDT).....	39
1.11.2.2 Testes de aglutinação (DAT, MAT, IHAT).....	39
1.11.2.3 Teste de imunofluorescência indireta (IFAT).....	40
1.11.2.4 Reações de <i>immunoblotting</i>	40
1.11.2.5 Ensaio imunoenzimático (ELISA).....	41
1.11.3 Perfis sorológicos da infecção por <i>T. gondii</i>	44
1.12 Epidemiologia, soroprevalência e prevenção.....	45
2. OBJETIVOS.....	48
2.1 Objetivo Geral.....	48
2.2 Objetivos específicos.....	48
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
3.1 Amostras de soros.....	49

3.2 Manutenção e obtenção de <i>T. gondii</i>	49
3.3 Preparação de antígenos de <i>T. gondii</i>	50
3.3.1 Taquizoítas intactos (formolizados).....	50
3.3.2. Antígenos solúveis.....	50
3.3.3 Antígenos totais.....	51
3.4 Produção de anticorpos monoclonais (mAbs).....	51
3.5 Purificação de anticorpos por afinidade.....	52
3.6 <i>Immunoblotting</i>	52
3.7 Imunofluorescência indireta.....	53
3.8 Ensaio imunoenzimático (ELISA).....	54
3.8.1 ELISA indireto (ELISA-STAg).....	54
3.8.2 ELISA de inibição.....	55
3.8.3 ELISA de captura IgM e IgA.....	55
3.8.4 ELISA reverso (ELISA-mAbs).....	56
3.9 Análise estatística.....	57
4. RESULTADOS.....	58
4.1 Purificação dos mAbs por afinidade.....	58
4.2 <i>Immunoblotting</i> para caracterização dos antígenos reconhecidos pelos mAbs.....	58
4.3 Imunolocalização dos antígenos reconhecidos pelos mAbs.....	61
4.4 Inibição dos epítomos reconhecidos pelos mAbs A3A4, A4D12 e 1B8 por soros humanos.....	61
4.5 Distribuição das amostras de soros humanos de acordo com o perfil sorológico da infecção por <i>T. gondii</i>	64
4.6 Padronização da técnica ELISA-mAb.....	66
4.7 Detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA anti- <i>T. gondii</i> por ELISA-mAbs em comparação com ELISA –STAg.....	68
4.8 Correlação entre os resultados obtidos por ELISA-mAbs e ELISA-STAg..	73
4.9 ELISA-mAbs em grupos sorologicamente atípicos.....	77
5. DISCUSSÃO.....	79
6. CONCLUSÕES.....	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii é um protozoário parasita intracelular obrigatório que infecta uma grande variedade de hospedeiros. Foi identificado pela primeira vez em um pequeno roedor norte-africano, popularmente chamado de gundi (*Ctenodactylus gundi*), no Instituto Pasteur da Tunísia (NICOLLE; MANCEAUX, 1908) e, no mesmo ano, foi isolado também de coelhos mantidos no Instituto Biológico de São Paulo, Brasil (SPLENDORE, 1908). O gênero *Toxoplasma* foi introduzido um ano depois, após o parasita ter sido diferenciado de parasitas do gênero *Leishmania*, e apenas uma espécie, *Toxoplasma gondii*, tem sido identificada em isolados de animais e humanos. O primeiro relato de infecção congênita humana por *T. gondii* foi feito em 1923, enquanto a primeira infecção no ser humano adulto foi diagnosticada em 1940. (SUKTHANA, 2006).

Taxonomicamente, este parasita é classificado como pertencente ao Reino Protista, Sub-reino Protozoa, Filo Apicomplexa, Classe Sporozoea, Subclasse Coccidia, Ordem Eucoccidiida, Subordem Eimeriina, Família Sarcocystidae, Subfamília Toxoplasmatinae, Gênero *Toxoplasma* e Espécie *Toxoplasma gondii* (NEVES, 2000).

1.2 Hospedeiros intermediários e definitivos

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

T. gondii apresenta uma grande variedade de hospedeiros intermediários, nos quais ocorrem as fases assexuadas de sua reprodução, podendo infectar qualquer célula nucleada de seus hospedeiros. Virtualmente, qualquer animal homeotérmico, incluindo aves e mamíferos domésticos, silvestres, selvagens ou marinhos, além de seres humanos, pode funcionar como hospedeiro intermediário deste parasita. Além disso, sua presença já foi demonstrada em seres pecilotérmicos, como peixes, anfíbios e répteis,

embora não se conheça a viabilidade do parasita nestes animais e a importância dos mesmos no seu ciclo de vida (STONE; MANWELL, 1969).

Já os hospedeiros definitivos de *T. gondii*, nos quais ocorrem as fases sexuadas de seu ciclo de vida, são os mamíferos carnívoros pertencentes à família Felidae, dentre os quais estão os gatos domésticos (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

1.3 Ciclo Biológico

T. gondii apresenta um ciclo biológico heteroxeno, alternando entre fases de reprodução assexuada em seus hospedeiros intermediários e fases de reprodução sexuada em seus hospedeiros definitivos.

Seu ciclo de vida complexo envolve três formas infecciosas: taquizoítas (formas livres), bradizoítas (formas presentes em cistos teciduais) e esporozoítas (formas presentes nos oocistos).

Taquizoítas e bradizoítas são encontradas nos hospedeiros intermediários. Taquizoítas invadem ativamente qualquer célula de seus hospedeiros, não apresentando um tropismo especial por nenhum tipo celular, e correspondem a uma fase de multiplicação rápida por endodiogenia. Estes ciclos de reprodução levam à produção de vários outros taquizoítas, que rompem a célula hospedeira, são liberados e invadem novas células, onde ocorrerá novo ciclo de reprodução. Deste modo, os taquizoítas espalham-se pelos diversos tecidos do hospedeiro, disseminando-se, preferencialmente, para as células do sistema nervoso central, olho, músculos esqueléticos e músculo cardíaco. Nesta primeira fase da infecção (fase aguda), os taquizoítas estimulam o desenvolvimento de forte resposta inflamatória, levando a sérios danos teciduais, que correspondem às manifestações clínicas da toxoplasmose. Em virtude da pressão da resposta imune do hospedeiro sobre os taquizoítas, estes se convertem nas formas bradizoítas, que ficam confinadas no interior de cistos teciduais intracelulares, principalmente em tecidos neurais (sistema nervoso central e olho) e tecidos musculares (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

Bradizoítas são formas de multiplicação lenta, que também se reproduzem por endodiogenia, e são encontrados nos cistos teciduais. Tais cistos podem persistir por toda a vida do hospedeiro, caracterizando a fase crônica da infecção. Quando o cisto é ingerido por um hospedeiro definitivo, sua parede é digerida pelas enzimas proteolíticas do estômago e do intestino do hospedeiro, o que leva ao seu rompimento e à liberação das formas bradizoítas. Estas invadem as células epiteliais intestinais e iniciam uma fase

de reprodução assexuada rápida, por esquizogonia, que resulta na formação dos esquizontes e liberação dos merozoítas. Após a formação dos merozoítas, inicia-se a fase de reprodução sexuada, por gamogonia, resultando na produção de oocistos não esporulados (imaturos), os quais são eliminados juntamente com as fezes dos felídeos. No ambiente, em condições ótimas de temperatura, umidade e oxigenação, ocorre o processo de esporogonia, por meio do qual os oocistos se tornam infecciosos (oocistos esporulados) em 1-5 dias após a eliminação, podendo permanecer viáveis no solo por períodos indeterminados (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

Quando os hospedeiros intermediários ingerem tais oocistos esporulados, sua parede protetora é digerida pelas enzimas digestivas, resultando na liberação dos esporozoítas. Estes invadem as células epiteliais intestinais, bem como outros tipos celulares locais e, após alguns ciclos de reprodução rápida, são liberados diversos taquizoítas, que invadem novas células nucleadas, disseminando-se pelos vários tecidos do organismo. Sob pressão da resposta imune do hospedeiro, estes taquizoítas convertem-se em bradizoítas, que formarão novos cistos teciduais (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998).

1.4 Transmissão

As três formas de *T. gondii* (taquizoítas, bradizoítas e esporozoítas) são infecciosas, tanto para os hospedeiros intermediários quanto para os hospedeiros definitivos.

Seres humanos podem se tornar infectados pelas seguintes vias (Figura 1):

- (1) ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cistos teciduais com a forma bradizoíta, principalmente as carnes de suínos, ovinos e caprinos;
- (2) ingestão de água e alimentos contaminados com oocistos excretados nas fezes de felídeos infectados, principalmente gatos domésticos;
- (3) transmissão congênita, por meio da transferência de taquizoítas da mãe para o feto através da placenta (transmissão vertical), principalmente na fase aguda da infecção;
- (4) transplante de órgãos de um doador infectado para um receptor soronegativo, principalmente transplantes de coração, pulmão, fígado e rim;
- (5) transfusão sanguínea de doadores infectados para receptores soronegativos;

(6) acidentes laboratoriais ou entre profissionais de saúde com objetos perfurantes e/ou cortantes contaminados com taquizoítas viáveis presentes em secreções, ou acidentes laboratoriais envolvendo animais infectados.

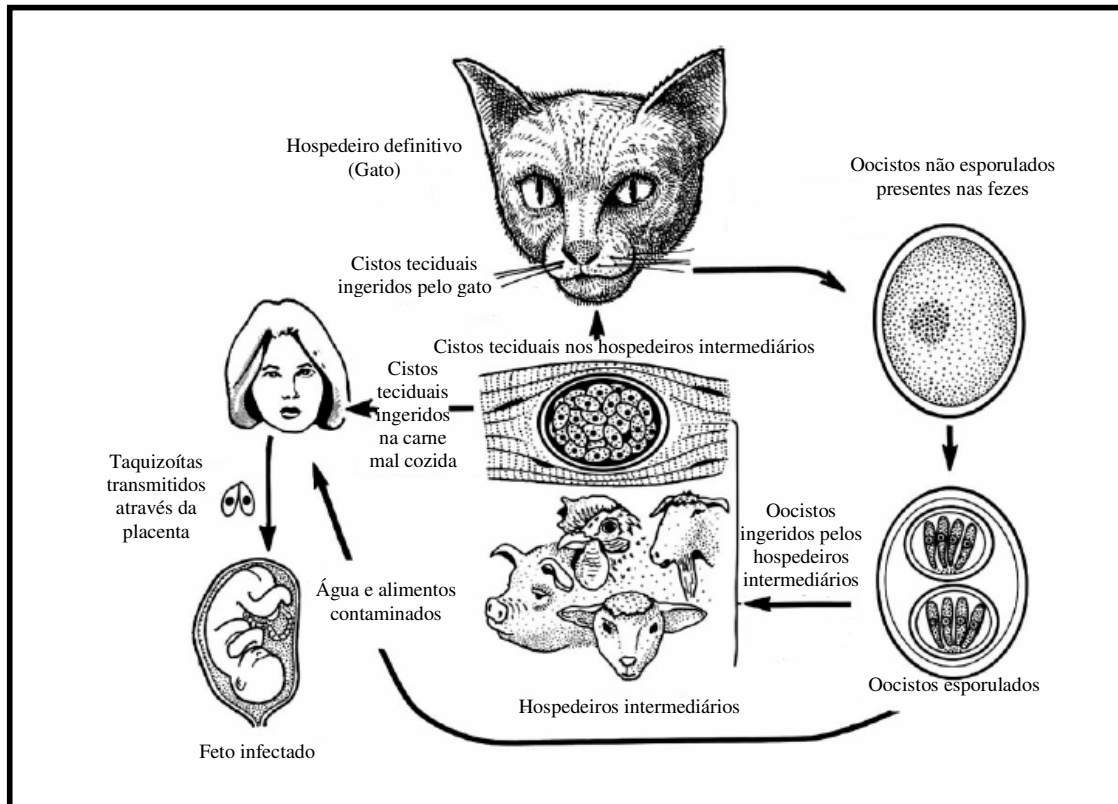


Figura 1 – Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*. Ciclo de vida apresentando as principais formas de transmissão do parasita para os hospedeiros definitivos e para os hospedeiros intermediários.

Fonte: Dubey (2004).

A rota oral de infecção por *T. gondii* parece ser a mais importante, geralmente relacionada a hábitos culturais, alimentares e de higiene das populações humanas de diferentes regiões geográficas, levando a diferenças significativas na soroprevalência mundial deste parasita. O hábito de ingerir alguns tipos de carnes cruas, procedentes de animais sem controle sanitário adequado e de abates clandestinos está relacionado com uma maior taxa de transmissão por meio da ingestão de bradizoítas presentes em cistos teciduais (COOK et al., 2000).

A infecção por meio da ingestão de oocistos eliminados nas fezes de gatos infectados também é alta em algumas regiões, indicando um importante papel destes animais na propagação do parasita entre seres humanos e outros animais domésticos e selvagens. Vários surtos de toxoplasmose em seres humanos estão relacionados à ingestão de água não filtrada e não tratada contaminada com oocistos, bem como à ingestão de alguns tipos de alimentos vegetais crus também contaminados com oocistos (BOWIE et al., 1997; BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003). Já foi comprovado que gatos infectados eliminam oocistos nas fezes apenas uma vez, por um período curto, em torno de 1-2 semanas após a infecção primária (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). A transmissão mecânica de oocistos por outros animais tem também sido relatada e pode constituir em uma fonte de infecção para seres humanos. Alguns animais, como cães e pombos podem ingerir oocistos presentes em alimentos ou água contaminados e eliminá-los intactos e viáveis juntamente com suas fezes, facilitando sua disseminação. Além disso, os cães, devido ao hábito de “rolar” no solo, podem adquirir oocistos e retê-los nos pêlos, podendo transmiti-los para pessoas com as quais mantenham contato próximo (FRENKEL; PARKER, 1996; LINDSAY et al., 1997; SCHARES et al., 2005).

A transmissão por via placentária da mãe para o filho é a forma de transmissão que mais merece a atenção das autoridades de saúde, pois resulta na toxoplasmose congênita, forma mais grave da infecção, que leva a diversas consequências negativas para o feto ou para o recém-nascido. A transmissão congênita ocorre quando formas taquizoítas do parasita atravessam a placenta durante uma infecção materna primária adquirida durante a gestação, sendo denominada, atualmente, de transmissão transplacentária exógena (MOMBRO et al., 2003). A frequência de transmissão congênita varia muito de acordo com o estágio da gestação em que a mulher adquire a infecção. Em geral, quando a mãe adquire a infecção no primeiro trimestre de gestação, a taxa de transmissão congênita é de aproximadamente 9%, aumentando para 27% e 59% quando a infecção é adquirida no segundo e no terceiro trimestre de gestação, respectivamente. Porém, a frequência de transmissão e a gravidade das consequências da infecção para o feto ou recém-nascido são inversamente proporcionais, de modo que as consequências mais graves são observadas quando a transmissão ocorre no primeiro trimestre de gestação, enquanto a transmissão que ocorre no terceiro trimestre geralmente resulta em toxoplasmose subclínica (HOHLFELD et al., 1994; DUNN et al., 1999; WALLON et al., 1999).

A transmissão congênita durante a infecção crônica, ou seja, quando a infecção materna é adquirida antes da gestação, é menos comum, mas pode ocorrer em algumas situações, tais como, quando a gestante apresenta doenças imunossupressoras, como a AIDS, ou está sob uso de drogas imunossupressoras, como corticosteróides ou outras drogas usadas por portadores de doenças autoimunes ou receptores de transplantes de órgãos. Tais situações levam à reativação de uma infecção crônica, com a conversão de bradizoítas presentes em cistos teciduais em taquizoítas, que atravessam a placenta (MINKOFF et al., 1997). Esta forma de transmissão caracterizada pela reativação de uma infecção crônica tem sido denominada atualmente como transmissão transplacentária endógena (TREES; WILLIAMS, 2005). Há trabalhos relatando a transmissão transplacentária de *T. gondii* após re-infecção materna durante a gestação em mulheres imunocompetentes (GAVINET et al., 1997), bem como a transmissão transplacentária em uma mulher imunocompetente infectada antes da gestação (VOGEL et al., 1996).

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

A transmissão por meio de transfusão sangüínea de um doador infectado para um receptor soronegativo, apesar de rara, pode acontecer desde que o doador apresente taquizoítas de *T. gondii* circulantes no plasma ou no interior de células sangüíneas, como os leucócitos (KRAVETZ; FEDERMAN, 2005).

A transmissão por meio de transplantes de órgãos também ocorre, numa proporção pequena e pouco significativa, desde que o órgão doado apresente cistos de *T. gondii* e o receptor seja soronegativo, no qual ocorrerá a fase aguda da infecção. Outro problema mais comum relacionado à toxoplasmose e ao transplante de órgãos consiste na reativação de infecção crônica presente no receptor após o transplante, em virtude das drogas imunossupressoras utilizadas no tratamento pós-transplante, as quais reduzem a pressão imune sobre as formas bradizoítas, promovendo sua conversão em taquizoítas (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

1.5 Características morfológicas e ultraestruturais

As três formas infecciosas de *T. gondii* (taquizoítas, bradizoítas presentes em cistos teciduais e esporozoítas presentes em oocistos) apresentam várias diferenças

morfológicas quando analisadas sob microscopia óptica, bem como diversas diferenças ultraestruturais, evidenciadas por análises de microscopia eletrônica.

Taquizoítas: apresentam forma de meia-lua e representam os estágios de multiplicação rápida do parasita durante a fase aguda da infecção, a qual ocorre por meio do processo de endodiogenia no interior de vacúolos parasitóforos intracitoplasmáticos (Figura 2). Apresentam dimensões aproximadas de 4-8 μm x 2-4 μm . Possuem uma película externa, consistindo de uma membrana externa contínua (plasmalema) e um conjunto de duas membranas internas incompletas. Na extremidade anterior ou apical situa-se o conóide, composto por anéis de microtúbulos (anéis apicais 1 e 2 e anéis polares 1 e 2). O citoesqueleto subpelicular é composto por 22 microtúbulos que se dispõem de maneira espiral sob o complexo da membrana interna e se estendem do anel polar até a extremidade posterior do parasita, conferindo-lhe sua alta capacidade de motilidade (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998). Possuem também diversas organelas secretórias, como as roptrias, as micronemas e os grânulos densos. São encontradas cerca de 4-10 roptrias localizadas na região anterior ao núcleo, enquanto as micronemas são mais numerosas e concentradas na região anterior do parasita. Já os grânulos densos são encontrados dispersos por todo o citoplasma, concentrando-se na extremidade anterior. Na região central da película, localiza-se o microporo, que é considerado como um sítio ativo de endocitose. Além disso, são encontradas diversas outras organelas e inclusões citoplasmáticas típicas de células eucariontes e características de parasitas apicomplexas, tais como mitocôndrias, retículo endoplasmático, complexo de Golgi, grânulos de amilopectina, corpos lipídicos e o núcleo, organizado na porção central da célula (SPEER et al., 1999).

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

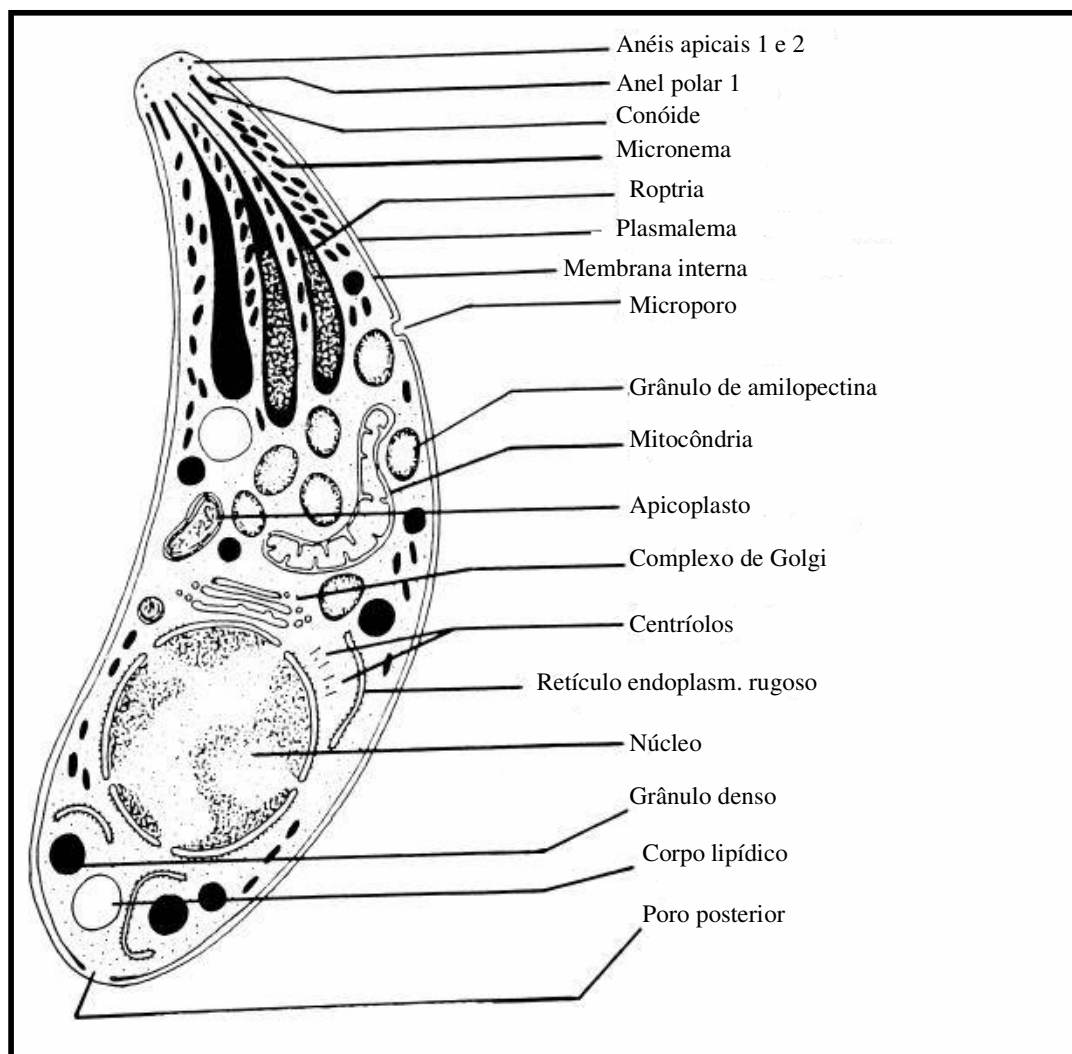


Figura 2 – Desenho esquemático de taquizoíta de *T. gondii*. Este esquema apresenta as principais organelas presentes em taquizoítas de *T. gondii*.

Fonte: Dubey; Lindsay; Speer (1998).

Bradizoítas: São morfologicamente idênticos aos taquizoítas, mas funcionalmente diferentes, pois se multiplicam de forma bem mais lenta e expressam algumas moléculas de superfície diferentes daquelas expressas pelos taquizoítas. As principais diferenças ultraestruturais observadas entre as duas formas estão relacionadas à posição do núcleo (próximo à extremidade posterior nos bradizoítas e centralizado nos taquizoítas), maior número de roptrias nos taquizoítas, predominância de grânulos de amilopectina nos bradizoítas e maior resistência dos bradizoítas à ação de enzimas proteolíticas (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998). Têm dimensões aproximadas de 7,5

μm x 2,5 μm , apresentando roptrias, micronemas e grânulos densos concentrados preferencialmente na porção anterior do parasita (SPEER et al., 1999).

Cistos de *T. gondii* podem ser encontrados em diversos tecidos, mas principalmente em tecidos neurais e musculares. Seu tamanho é muito variável, dependendo do número de bradizoítas no seu interior, de sua forma e do tecido onde se encontram. Geralmente, apresentam em torno de 50-500 bradizoítas, apresentam parede fina e lisa e seu interior não se encontra separado em compartimentos por meio de septos (SPEER et al., 1999). Cistos representam estágios infecciosos tanto para os hospedeiros intermediários quanto para os hospedeiros definitivos e, no seu interior, os bradizoítas persistem por toda a vida de seus hospedeiros. Porém, podem ser liberados e se converterem novamente em taquizoítas em situações de imunossupressão do hospedeiro (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

Esporozoítas: São estágios morfológicamente semelhantes aos taquizoítas, porém apresentam micronemas, roptrias e grânulos de amilopectina mais abundantes e estão contidos em esporocistos no interior dos oocistos. Os oocistos não esporulados de *T. gondii* apresentam dimensões aproximadas de 12 μm x 10 μm , com formato aproximadamente esférico, cujas paredes são formadas por duas camadas incolores. A esporulação ocorre no ambiente em torno de 1-5 dias após sua liberação nas fezes de felídeos infectados. Oocistos esporulados são subesféricos, medindo aproximadamente 13 μm x 11 μm e contêm dois esporocistos elipsóides, cada um medindo 8 μm x 6 μm , e cada esporocisto contém quatro esporozoítas (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998). Durante a fase aguda, um gato com infecção primária pelo parasita libera milhões de oocistos por um período de até 28 dias (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

A figura 3 ilustra os diferentes estágios morfológicos de *T. gondii*.

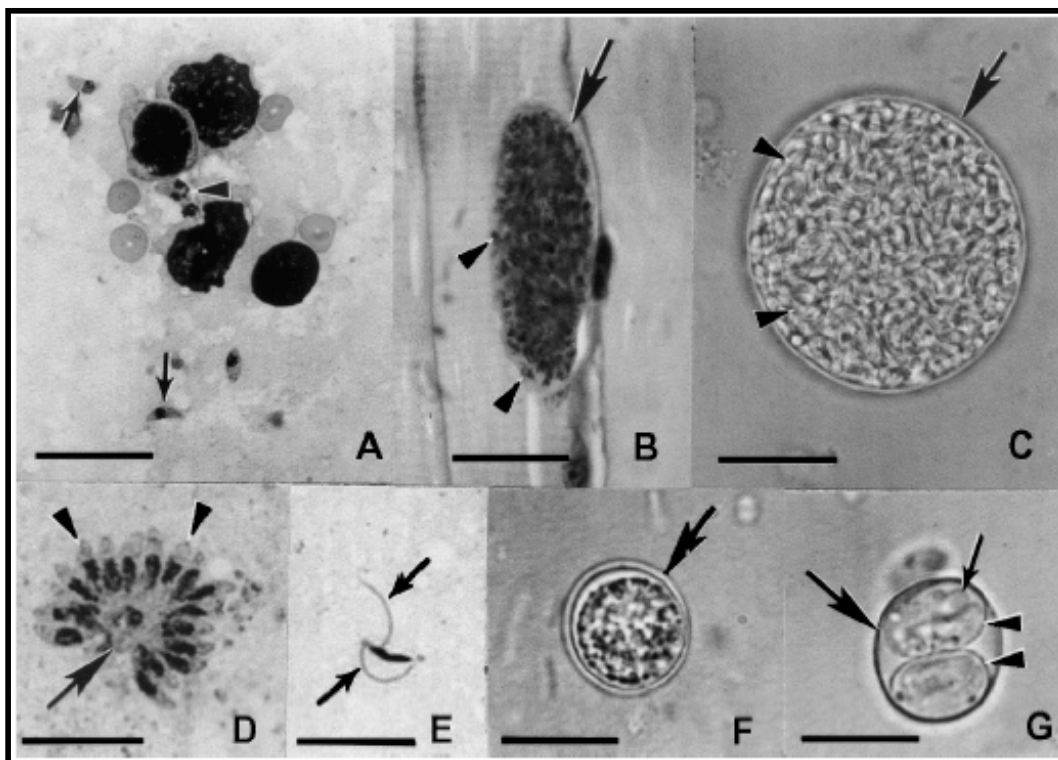


Figura 3 – Estágios morfológicos de *T. gondii*. (A) Taquizoítas circulantes. As setas apontam taquizoítas individuais em forma de crescente, enquanto as cabeças de seta apontam taquizoítas em divisão; (B) Cistos teciduais em corte de músculo esquelético. A seta está apontando para a fina parede do cisto, enquanto as cabeças de seta estão apontando para bradizoítas no seu interior; (C) Cisto tecidual separado dos tecidos do hospedeiro por homogeneização de cérebro infectado. A parede do cisto está apontada pela seta, enquanto centenas de bradizoítas no seu interior estão apontados pelas cabeças de seta; (D) Esquizonte com alguns merozoítas (cabeças de seta) presentes em tecido intestinal de gato infectado; (E) Gameta masculino com dois flagelos (setas) presente em tecido intestinal de gato infectado; (F) Oocisto não esporulado eliminado nas fezes de gato infectado. Sua parede é formada por duas camadas (seta) circundando uma massa central única; (G) Oocisto esporulado com uma parede mais fina (seta maior), dois esporocistos (cabeças de seta). Cada esporocisto contém quatro esporozoítas (seta menor), não totalmente focados nesta figura.

Fonte: Hill; Dubey (2002).

1.6 Linhagens de *T. gondii*

O genoma de *T. gondii* é haplóide, exceto durante a fase de reprodução sexuada que ocorre no interior das células intestinais de seus hospedeiros definitivos, e contém cerca de 8×10^7 pares de nucleotídeos (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). A maioria dos isolados de *T. gondii* compreende três linhagens clonais diferentes, as quais diferem geneticamente em uma taxa de aproximadamente 1% ou menos de seus genes. Alguns estudos de análise populacional demonstraram que recombinações entre os conjuntos

gênicos de dois ancestrais distintos produziram uma progênie recombinante, que vem sendo selecionada por seus hospedeiros, sendo que apenas um pequeno número de combinações genéticas tem sido observado nas infecções dos mais variados hospedeiros. Como resultado, existem apenas dois alelos gênicos diferentes para a maioria dos genes das linhagens do parasita (HOWE; SIBLEY, 1995; GRIGG et al., 2001).

As três linhagens clonais de *T. gondii* são designadas Tipo I, Tipo II e Tipo III, as quais diferem na virulência e nos padrões epidemiológicos de ocorrência. Linhagens do tipo I (RH, como exemplo) são altamente virulentas para camundongos, com uma DL100 (Dose Letal de 100%) menor que 10 parasitas, enquanto as linhagens do tipo II (ME49 e suas derivadas) são bem menos virulentas em camundongos, com uma DL100 superior a 1000 parasitas. As linhagens do tipo III (CEP e VEG, como exemplos) são consideradas moderadamente virulentas. Em geral, as linhagens do tipo II são cistogênicas, enquanto as linhagens tipo I têm uma capacidade bem reduzida de formar cistos em cultura de células ou em animais infectados, mas esta propriedade de formação de cistos é específica à linhagem e influenciada pela sua forma de propagação (KIM; WEISS, 2004; SAEIJ; BOYLE; BOOTHROYD, 2005; SWITAJ et al., 2005).

A maioria das linhagens isoladas de pacientes infectados cronicamente é do tipo II, enquanto as linhagens isoladas de pacientes com toxoplasmose congênita ou toxoplasmose ocular são do tipo I e linhagens do tipo III são predominantemente isoladas de animais (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Entretanto, em um estudo recente, a tipificação de isolados de *T. gondii* em amostras de líquido de pacientes imunocomprometidos (HIV positivos) revelou uma alta prevalência das linhagens do tipo I (KHAN et al., 2005). Mais recentemente, foi demonstrado que parece haver uma predominância (em torno de 94%) de isolados de *T. gondii* do tipo I circulando tanto em humanos como em animais da América do Sul (GALLEGO; SAAVEDRA-MATIZ; GOMEZ-MARIN, 2006). Estes resultados confirmam os achados anteriores de vários outros estudos em gatos (DUBEY et al., 2004; PENA et al., 2006) e galinhas caipiras (DUBEY et al., 2002; 2003a,b,c; 2005a) da América do Sul, mostrando a predominância dos tipos I e III e ausência do tipo II, em contraste à grande predominância de linhagens do tipo II em países da América do Norte. Vale destacar que muitos isolados do tipo III de *T. gondii* da América do Sul, particularmente do

Brasil e Colômbia, são virulentos para camundongos, sendo, portanto, fenotipicamente diferentes daqueles encontrados em outras partes do mundo (DUBEY et al., 2005b,c).

A rápida disseminação destes três genótipos de *T. gondii* tem sido atribuída à capacidade deste parasita ser transmitido diretamente de um hospedeiro intermediário para outro, tornando seu ciclo de reprodução sexuada não obrigatório para a sua transmissão. Esta característica o torna um parasita atípico entre os demais integrantes do filo Apicomplexa, os quais requerem o ciclo sexual para uma transmissão efetiva entre seus hospedeiros (SU et al., 2003).

Atualmente, diversos estudos têm sido conduzidos com o objetivo de investigar a correlação entre o genótipo de *T. gondii* e as manifestações da doença em humanos, verificando se há diferenças relacionadas à linhagem do parasita no que diz respeito à estimulação da resposta imune do hospedeiro e gravidade da doença (SAEIJ; BOYLE; BOOTHROYD, 2005).

1.7 Patogênese e interação parasita-hospedeiro

Os principais fatores que interferem na patogênese de *T. gondii* em hospedeiros humanos e animais são o tamanho do inóculo, a virulência da linhagem do parasita, o background genético do hospedeiro, bem como o seu sexo e o seu estado imunológico (ROBERTS; CRUICKSHANK; ALEXANDER, 1995; SUZUKI et al., 1996).

Uma vez o parasita tendo sido ingerido por via oral, ele invade ativamente as células epiteliais do intestino delgado de modo ativo, iniciando o ciclo de reprodução (LIESENFELD, 1999; BARRAGAN; SIBLEY, 2002). Deste modo, o processo de invasão ativa da célula hospedeira é o principal evento da infecção pelos parasitas do filo Apicomplexa. Tal processo é muito semelhante entre todos os integrantes deste filo e envolve a participação de receptores específicos presentes na superfície da membrana da célula hospedeira e uma série de proteínas liberadas consecutivamente pelas roptrias, micronemas e grânulos densos do parasita (BUXTON; McALLISTER; DUBEY, 2002).

Desta forma, a invasão celular pode ser resumida em três etapas consecutivas, esquematizadas na figura 4 (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003; SIBLEY, 2004; KEELEY; SOLDATI, 2004):

- 1) A adesão inicial do parasita à célula hospedeira ocorre sem qualquer orientação especial e envolve antígenos imunodominantes da superfície do parasita. Após a adesão inicial, os parasitas reorientam-se de modo que a extremidade anterior se posiciona para a extrusão do conóide, seguida por invaginação da membrana da célula

hospedeira para dar origem ao vacúolo parasitóforo (VP), onde várias proteínas dos parasitas são secretadas. Entre elas, as adesinas secretadas pelos micronemas são responsáveis pela espessa zona de adesão e formação da junção de movimento, que juntamente com o citoesqueleto do parasita, força-o para o interior do vacúolo parasitóforo em formação. A membrana plasmática da célula hospedeira é também usada para formar a membrana do vacúolo parasitóforo, o qual não se funde com lisossomos, impedindo, portanto, a degradação intracelular do parasita.

2) Em seqüência, proteínas de roptrias são liberadas dentro do vacúolo parasitóforo, as quais estendem sua membrana para formar uma associação com organelas da célula hospedeira, de modo que mitocôndrias e retículo endoplasmático são posicionados adjacentes ao vacúolo parasitóforo.

3) Proteínas dos grânulos densos são secretadas e modificam a membrana do vacúolo parasitóforo, contribuindo para a remodelação e maturação deste, com a formação de uma rede de maturação intravacuolar metabolicamente ativa para a reprodução e desenvolvimento do parasita.

A penetração de *T. gondii* em suas células hospedeiras é um processo ativo, por meio de um complexo de adesão-movimentação, sendo um processo diferente da fagocitose, uma vez que ocorre a reorientação do parasita em direção à membrana da célula e rearranjo do citoesqueleto do mesmo. Após a penetração, o parasita é encontrado no interior do vacúolo parasitóforo, cuja membrana é lisa, formada por cerca de 20% de membrana fornecida pelo parasita durante a invasão e 80% de membrana da célula hospedeira. O vacúolo parasitóforo não funde com lisossomos da célula hospedeira e, portanto, não se torna um meio ácido, pois marcadores necessários para esta fusão são excluídos pelo parasita durante a invasão (MORDUE et al., 1999).

No interior do vacúolo parasitóforo, os parasitas replicam sincronicamente, de forma assexuada, sendo encontrados agrupado uns aos outros, em números múltiplos de 2 (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003).

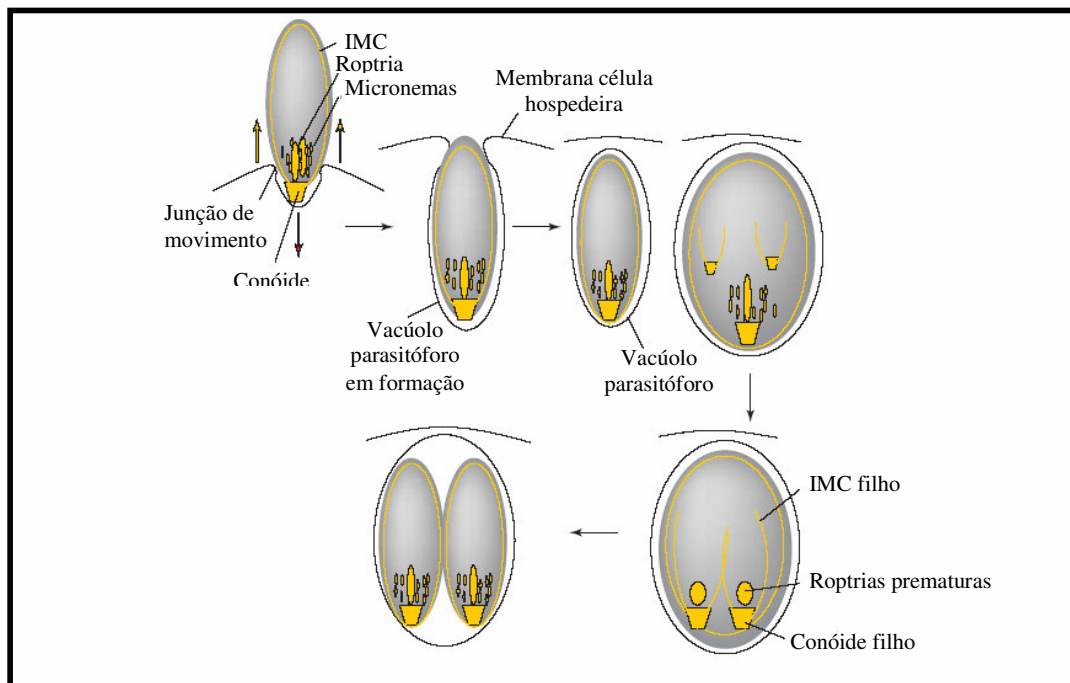


Figura 4 – Invasão da célula hospedeira por *T. gondii*. A invasão da célula hospedeira por *T. gondii* envolve duas organelas secretórias especializadas (roptrias e micronemas), a protrusão do conóide e a formação de uma junção de movimento no ponto de contato entre as membranas do parasita e da célula hospedeira. Dentro do vacúolo, o parasita divide-se por endodiogenia, um processo que é iniciado pelo aparecimento do conóide e de microtúbulos subpeliculares, bem como a formação concomitante do complexo de membranas internas (IMC) da célula filha.

Fonte: Keeley; Soldati (2004).

1.8 Antígenos de *T. gondii*

Diferentes linhagens de *T. gondii* possuem diferentes antígenos, os quais afetam a extensão e a gravidade da infecção, bem como os órgãos afetados. Estudos de polimorfismos de DNA entre diferentes isolados de *T. gondii* resultaram na identificação de diferentes grupos de antígenos do parasita: antígenos comuns que determinam a patogenicidade, antígenos específicos aos diferentes estágios do ciclo de vida do parasita, antígenos específicos ao tecido ou ao órgão parasitado, além de um grupo de antígenos correspondentes à infecção em pacientes com AIDS (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003).

Um grupo comum de antígenos é compartilhado entre os diferentes estágios de vida do parasita, incluindo os taquizoítas, bradizoítas e esporozoítas. Tais antígenos

estão localizados em diferentes regiões do parasita, principalmente na superfície celular e na região das roptrias. Dentre os antígenos de superfície, merece destaque o antígeno p30 (SAG1), que é o principal antígeno de superfície e a proteína mais abundante da forma taquizoíta, compreendendo 5% do seu total de proteínas. Este antígeno encontra-se distribuído na superfície e no interior do taquizoíta e dentro do vacúolo parasitóforo. É identificado no soro de pacientes com infecção aguda e crônica, sendo capaz de estimular a produção de altos níveis de anticorpos específicos pelo sistema imunológico do hospedeiro, sendo, por isso, um dos principais candidatos para o desenvolvimento de uma vacina efetiva na prevenção da infecção por *T. gondii* (KASPER; CURRIE; BRADLEY, 1985; BULOW; BOOTHROYD, 1991; ANGUS et al., 2000; LETSCHER-BRU et al., 2003).

Outro importante antígeno de superfície de *T. gondii* é o antígeno p22 (SAG2), que também é capaz de estimular o sistema imunológico do hospedeiro, induzindo a produção de altos títulos de anticorpos específicos (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003). Outros antígenos são também reconhecidos por anticorpos presentes no soro de pacientes infectados e parecem exercer importantes papéis na estimulação do sistema imune do hospedeiro, merecendo destaque o antígeno p97, localizado intracelularmente nas formas taquizoíta e bradizoíta, além de ser encontrado dentre as proteínas secretadas e/ou excretadas pelo parasita (MINEO; KHAN; KASPER, 1994).

Diversas proteínas secretórias associadas com o processo de invasão da célula hospedeira têm sido identificadas e associadas com a estimulação da resposta imune do hospedeiro, tais como proteínas de micronemas (MIC), roptrias (ROP) e grânulos densos (GRA). Pela capacidade destas proteínas em estimular respostas imunes específicas, elas também têm sido alvo de investigações quanto a seus papéis em procedimentos de imunização de animais, com o objetivo de desenvolvimento de vacinas efetivas contra *T. gondii*.

Alguns antígenos específicos à forma bradizoíta também têm sido identificados, tais como os antígenos BAG e o antígeno MAG1, que é secretado pela matriz do cisto e é reconhecido por soros imunes do hospedeiro (PARMLEY; SGARLATO; REMINGTON, 1993).

1.9 Resposta imune

A imunidade à infecção é uma batalha constante entre o patógeno invasor e os mecanismos de defesa do hospedeiro contra a invasão. Nesta batalha, o parasita usa todas as estratégias possíveis para evadir das defesas do hospedeiro e conseguir efetivar uma infecção duradoura, enquanto o hospedeiro tenta responder a todas estas estratégias e eliminar o patógeno, evitando que este se instale e lhe cause maiores danos. A resposta imune a *T. gondii* já está bem estabelecida e, como parasita intracelular obrigatório, a resposta protetora é fundamentalmente mediada por células, mas a resposta imune humoral participa diretamente na neutralização e destruição de taquizoítas extracelulares e, assim, é capaz de auxiliar no controle da disseminação da infecção (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003).

1.9.1 Imunidade celular

A imunidade mediada por células é o mais importante mecanismo na regulação da infecção por *T. gondii*, com a participação das células T CD4⁺ e T CD8⁺, macrófagos e células *natural killer* (NK). Durante a fase aguda da infecção, macrófagos e células dendríticas (DCs) produzem e secretam altos níveis de interleucina-12 (IL-12), em resposta a alguns antígenos e proteínas liberados por taquizoítas, tais como a ciclofilina-18 (C-18), que é uma proteína ligante do receptor 5 de quimiocinas CC (CCR5). IL-12 estimula células NK a produzirem e secretarem altos níveis de interferon- γ (IFN- γ), o qual induz a diferenciação de células T CD4⁺ na subpopulação Th1 produtora de IL-2 e IFN- γ . Altos níveis de IFN- γ estimulam macrófagos e células dendríticas a liberarem mais IL-12, amplificando ainda mais a liberação de IFN- γ . Células T CD8⁺ também são ativadas pela secreção de IL-12 e contribuem significativamente para controlar a infecção aguda, uma vez que produzem IFN- γ , levando à ativação de macrófagos. Além disso, células T CD8⁺, em função de sua atividade citotóxica, destroem células infectadas, liberando taquizoítas, que ficam acessíveis a vários mecanismos imunológicos, tais como anticorpos, sistema complemento, macrófagos ativados e células NK (DENKERS; GAZZINELLI, 1998; HEGAB; AL-MUTAWA, 2003; ALIBERTI, 2005).

IFN- γ representa o principal mediador de resistência a *T. gondii* através da ativação de macrófagos, os quais inibem a replicação dos parasitas por meio da produção de intermediários reativos do oxigênio (ROI) e do nitrogênio (RNI), tais como óxido nítrico (NO), que promovem a inativação de enzimas fundamentais para o

metabolismo do parasita e, portanto, para a sua sobrevivência. Além disso, macrófagos ativados secretam altos níveis de fator de necrose tumoral (TNF- α), que também estimula outras atividades microbidas (ALIBERTI, 2005).

Os efeitos da atividade pró-inflamatória mediada por IFN- γ podem ser tóxicos para o hospedeiro, levando a sérios danos teciduais no local da infecção. Desta forma, alguns mecanismos imunomodulatórios devem entrar em ação, de modo a diminuir a resposta pró-inflamatória e, com isso, evitar danos teciduais mais sérios ao hospedeiro. Um papel importante na regulação da resposta imune celular a *T. gondii* é exercido pela IL-10, que é produzida por alguns tipos celulares em locais com alta carga parasitária. IL-10 apresenta efeitos inibitórios sobre a atividade microbida de macrófagos ativados por IFN- γ , sobre a diferenciação de clones Th1 de células T, sobre a produção de IFN- γ por células NK e linfócitos T e sobre a produção de IL-12 por macrófagos e células dendríticas. Camundongos deficientes de IL-10 não conseguem controlar as respostas inflamatórias induzidas pela infecção e morrem durante a fase aguda, devido ao grande infiltrado leucocitário e à necrose tecidual no fígado e no intestino delgado, em virtude da produção descontrolada de TNF- α e IFN- γ (GAZZINELLI et al., 1996; SUZUKI et al., 2000a).

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

Alguns mecanismos podem ser usados por *T. gondii* para evadir da resposta imune do hospedeiro e garantir uma infecção bem sucedida. Um mecanismo inicial que garante a sobrevivência de *T. gondii* após a infecção é a prevenção da união do vacúolo parasitóforo com lisossomos da célula hospedeira, evitando sua digestão intracelular. Como macrófagos são as principais células efectoras na destruição dos parasitas, outro mecanismo de evasão é a invasão ativa dos próprios macrófagos, fazendo com que escapem do *burst* respiratório, processo microbida que se segue normalmente após a fagocitose de patógenos por fagócitos (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003). Muitos estudos

têm sido conduzidos com o objetivo de decifrar outras vias de evasão imune desenvolvidas por *T. gondii*, tais como a secreção de fatores imunossupressores, que podem limitar a secreção de citocinas pró-inflamatórias, interferir nas vias de sinalização intracelular de células imunes e, mesmo, prevenir a apoptose de células infectadas (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; ALIBERTI, 2005; DENKERS; BUTCHER, 2005).

1.9.2 Imunidade humoral

A imunidade humoral induzida por *T. gondii* é direcionada principalmente contra a forma taquizoíta, de modo que anticorpos específicos impedem a adesão do parasita aos receptores da célula hospedeira, prevenindo, assim, a sua invasão. Indivíduos com infecção crônica são usualmente resistentes à re-infecção por *T. gondii*, possivelmente devido à presença de imunoglobulinas circulantes, as quais podem ser produzidas no próprio sangue ou no tecido infectado (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003).

As principais imunoglobulinas, bem como sua participação no curso da infecção por *T. gondii* são descritas a seguir:

IgG: A imunoglobulina G corresponde à principal classe de anticorpos envolvida na resposta humoral contra *T. gondii*. Em seres humanos infectados, anticorpos IgG específicos a antígenos de *T. gondii* aparecem após 1-2 semanas de infecção e seus níveis aumentam muito lentamente até atingir um valor máximo por volta de 6-14 meses após a infecção, com uma ligeira queda após este período. Porém, níveis mais baixos de IgG podem permanecer circulantes indefinidamente. Em infecções recentes, a afinidade funcional da IgG pelos seus respectivos antígenos (avidez de IgG) é mais baixa e, à medida que a infecção avança, ocorre a maturação da resposta imune e estes anticorpos passam a apresentar avidez crescente pelos seus antígenos. Deste modo, em infecções de maior duração, encontra-se um predomínio de anticorpos IgG de alta avidez (CAMARGO et al., 1991). Altos títulos de IgG de baixa avidez não identificam uma infecção adquirida recentemente, mas altos níveis de IgG de alta avidez podem excluir infecções primárias ou adquiridas recentemente (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003).

IgM: A produção de anticorpos IgM específicos a antígenos de *T. gondii* é um sinal de infecção recentemente adquirida e não um sinal de re-infecção. Em seres humanos, estes anticorpos podem ser detectados logo nos primeiros 7 dias de infecção, aumentando gradualmente até atingir um pico cerca de 1-2 meses depois, diminuindo

gradativamente até níveis não detectáveis por volta de 8 meses. Porém, em muitos casos, anticorpos IgM podem permanecer persistentes por muitos meses e, até anos, tornando problemático o diagnóstico da infecção primária por *T. gondii* baseado na detecção de IgM específica (REMINGTON; THULLIEZ; MONTOYA, 2004). Anticorpos IgM detectados na circulação do recém-nascido são geralmente considerados como indicativo de infecção congênita, pois esta classe de imunoglobulina não atravessa a barreira placentária. A ausência de anticorpos IgM específicos pode excluir a possibilidade de infecção congênita em recém-nascidos ou de infecção recente em outros grupos de indivíduos (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003).

IgA: Durante uma infecção por *T. gondii*, anticorpos IgA são produzidos durante a fase digestiva do parasita, quando linfócitos sensibilizados circulam pela lâmina própria do trato digestivo do hospedeiro. Tais linfócitos sensibilizados podem circular por outros locais, podendo produzir anticorpos IgA em outros sítios ativos de infecção, diferentes da região intestinal. Anticorpos IgA são produzidos apenas durante a fase aguda de uma infecção primária, não sendo observados durante a infecção crônica, constituindo, portanto, um bom marcador imunológico de infecção recente. Durante a fase aguda de infecção, IgA persiste circulante no sangue por cerca de 8-9 meses após a infecção, enquanto anticorpos IgM podem persistir por períodos mais longos. Níveis persistentes de anticorpos IgM na ausência de anticorpos IgA indica uma imunidade já estabelecida de uma infecção mais tardia, caracterizando um período de transição no perfil imunológico de resposta à infecção. Apesar de ser secretada no colostro, IgA não atravessa a barreira placentária, mas pode ser detectada em recém-nascidos, quando a infecção congênita ocorre no terceiro trimestre de gestação. Se a infecção congênita ocorre no primeiro trimestre de gestação, esta imunoglobulina está ausente no sangue do recém-nascido (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003).

Além destas classes principais de anticorpos envolvidas na infecção por *T. gondii*, também são observados anticorpos IgE, mas poucos estudos têm explorado a importância desta imunoglobulina na resposta humoral contra este parasita, bem como seu valor no diagnóstico e na determinação da fase da infecção (ASHBURN et al., 1998).

1.10 Quadro clínico

Clinicamente, a infecção por *T. gondii* pode ser assintomática ou apresentar alguns sinais e sintomas que variam enormemente, dependendo do estado imunológico do

hospedeiro e do tipo da infecção. Deste modo, o quadro clínico da toxoplasmose pode variar de acordo com alguns grupos de pacientes apresentados a seguir:

Toxoplasmose em adultos e crianças imunocompetentes: A infecção primária por *T. gondii* em adultos e crianças imunocompetentes é assintomática na maioria dos pacientes, causando uma infecção auto-limitada e com sintomas não específicos, que raramente demandam tratamento. A manifestação clínica mais típica neste grupo de pacientes é uma linfadenopatia cervical ou occipital discreta e isolada, na qual os linfonodos podem permanecer aumentados por, no máximo, 6 semanas. Em casos muito raros, já foram relatadas miocardite, polimiosite, pneumonia, hepatite ou encefalite em indivíduos imunocompetentes durante infecção primária. Toxoplasmose aguda durante a gestação também é assintomática na maioria das mulheres (REMINGTON et al., 2001).

Toxoplasmose ocular: Coriorretinite toxoplásmica é um quadro comum na toxoplasmose adquirida ou na doença congênita, como resultado de uma infecção aguda ou reativação de uma infecção crônica. Os principais sinais de uma coriorretinite toxoplásmica são lesões focais brancas visíveis, com uma intensa reação inflamatória associada. Geralmente, manifestações de coriorretinite em adultos têm sido associadas a uma manifestação tardia ou à reativação de uma infecção congênita ocorrida, principalmente, no terceiro trimestre de gestação (MONTROYA; REMINGTON, 1996; BURNETT et al., 1998; HOLLAND, 1999; HEGAB; AL-MUTAWA, 2003).

Toxoplasmose em pacientes imunocomprometidos: Apesar de causar uma infecção assintomática na maioria dos indivíduos imunocompetentes, *T. gondii* pode causar doença grave, muitas vezes fatal, em indivíduos imunocomprometidos, como aqueles com AIDS ou em tratamento com drogas imunossupressoras. Nestes indivíduos, a toxoplasmose geralmente resulta da reativação de uma infecção crônica e afeta preferencialmente o sistema nervoso central, levando ao quadro típico de encefalite toxoplásmica. As manifestações clínicas mais comuns são: confusão mental, déficits motores focais, distúrbios dos nervos cranianos, anormalidades sensoriais, sinais cerebelares, desordens dos movimentos e sinais neuropsiquiátricos. Os achados neurológicos mais típicos são hemiparesia e distúrbios da fala. Deve ser feito o diagnóstico diferencial das lesões da encefalite toxoplásmica com linfoma do sistema nervoso central, leucoencefalopatia multifocal progressiva, ventriculite e encefalite causadas por citomegalovírus, abscessos cerebrais bacterianos e lesões focais causadas por outros organismos, como *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* sp.,

Mycobacterium tuberculosis e *Nocardia* sp. A toxoplasmose em indivíduos imunocomprometidos também pode se apresentar com coriorretinite, pneumonia e envolvimento de múltiplos órgãos (PORTER; SANDE, 1992; LUFT et al., 1993; MONTOYA; LIESENFELD, 2004).

Toxoplasmose congênita: A toxoplasmose congênita raramente pode ser diagnosticada por meio de exames ultrassonográficos, mas alguns sinais sugestivos de infecção por *T. gondii* no feto visualizáveis pela ultra-sonografia são calcificações intracranianas, dilatação ventricular, aumento do fígado e aumento da espessura da placenta. As manifestações clínicas da toxoplasmose congênita variam enormemente, em geral, de acordo com a fase da gestação em que ocorre a transmissão do parasita para o feto. Deste modo, as conseqüências mais comuns são: aborto espontâneo e morte fetal no interior do útero, ou nascimento de crianças com hidrocefalia, microcefalia, calcificações intracranianas, coriorretinite, estrabismo, cegueira, epilepsia, retardamento mental e motor, trombocitopenia e/ou anemia. Nenhum dos sinais descritos anteriormente em recém-nascidos com doença congênita é patognomônico para toxoplasmose, uma vez que pode ocorrer com infecções congênitas por outros patógenos, como o citomegalovírus, o vírus herpes simples, o vírus da rubéola e em casos de sífilis congênita (SWISHER; BOYER; McLEOD, 1994; MONTOYA; LIESENFELD, 2004; KRAVETZ; FEDERMAN, 2005).

1.11 Diagnóstico

Há quatro grupos de indivíduos em que o diagnóstico da infecção por *T. gondii* é mais crítico: mulheres grávidas que adquirem a infecção primária durante a gestação, fetos e recém-nascidos que adquirem a infecção congênita, indivíduos imunocomprometidos e indivíduos que apresentam coriorretinite (REMINGTON et al., 2001; MONTOYA, 2002). Porém, destes quatro grupos apresentados, a situação mais desafiadora no que diz respeito ao diagnóstico da toxoplasmose é determinar se uma mulher grávida adquiriu a infecção antes ou durante a gestação (REMINGTON; THULLIEZ; MONTOYA, 2004; SENSINI, 2006).

Deste modo, diversas técnicas têm sido desenvolvidas nas últimas décadas com o objetivo de se obter um diagnóstico mais preciso da infecção, bem como a determinação da fase da infecção que o indivíduo apresenta. Estas técnicas de diagnóstico podem se basear na detecção do próprio parasita ou de algumas de suas moléculas específicas

(métodos diretos) ou na detecção de anticorpos específicos a antígenos do parasita presentes no soro de indivíduos infectados (métodos indiretos ou sorológicos).

1.11.1 Métodos diretos

Estes métodos baseiam-se na demonstração direta do parasita em amostras biológicas, tais como sangue, líquido, saliva, humor aquoso e fragmentos de órgãos colhidos por biópsia ou necropsia, por meio das técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) e imunohistoquímica (IHC), ou ainda, por isolamento dos parasitas mediante inoculação de materiais biológicos em animais de laboratório (bioensaio) ou em cultura celular.

1.11.1.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

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

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

A primeira etapa da técnica envolve a hibridização de *primers* específicos a uma seqüência do genoma do parasita, escolhida, preferencialmente, com base na existência de várias cópias dessa seqüência no DNA do parasita. Para a detecção de *T. gondii*, a seqüência mais utilizada, com alta especificidade, é o gene B1, que apresenta 35 cópias genômicas (BURG et al., 1989). Alguns laboratórios europeus estão utilizando a seqüência AF146527 de 529 pb, que apresenta cerca de 200-300 cópias genômicas (HOMAN et al., 2000). Em um estudo comparativo por meio de *real-time* PCR, usando estas duas seqüências como *primers* específicos, foi verificado que a utilização da seqüência de 529 pb aumentou em 10 vezes a sensibilidade da técnica, pois o limite de

detecção do DNA genômico de *T. gondii* foi de 20 fg quando esta sequência foi utilizada e de 200 fg quando usado o gene B1 (REISCHL et al., 2003). Por outro lado, em outro estudo comparativo do uso destas duas sequências e de uma sequência do DNA ribossomal 18S como *primers*, não foi encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre estes três *primers* na especificidade e sensibilidade da técnica (FILISETTI et al., 2003).

Outras sequências repetitivas do genoma de *T. gondii* que podem ser utilizadas como *primers* na PCR são os elementos genéticos móveis (MGEs – *Mobile Genetic Elements*), que possuem cerca de 100-500 cópias por célula do parasita. O uso das MGEs na PCR permite a determinação direta da linhagem do parasita, por meio de análises de polimorfismos. Porém, os MGEs não têm sido utilizados rotineiramente, por não serem completamente espécie-específicos e a técnica ainda não estar devidamente padronizada (TERRY et al., 2001). Em laboratórios de pesquisa, algumas sequências que apresentam apenas uma cópia no genoma do parasita têm sido utilizadas, tais como os genes SAG1, SAG2, SAG3, SAG4 E GRA4 (MEISEL et al., 1995; RINDER et al., 1995; HOWE et al., 1997; PELLOUX et al., 1998).

O uso mais comum da PCR é para o diagnóstico pré-natal da infecção congênita usando amostras de líquido amniótico. Quando a coleta da amostra é realizada com 18 semanas de gestação, a técnica é mais sensível, mais rápida e mais segura que as técnicas convencionais usando amostras de sangue fetal. Este método é indicado para todas as mulheres grávidas com resultados positivos ou sugestivos de infecção aguda adquirida durante a gestação ou quando há evidência de danos fetais observados pelo exame ultrassonográfico (hidrocefalia e/ou calcificações cerebrais) (HOHLFELD et al., 1994). A especificidade e o valor preditivo positivo (VPP) da PCR de líquido amniótico para o diagnóstico pré-natal da toxoplasmose congênita são próximos de 100%, enquanto a sensibilidade e o valor preditivo negativo (VPN) variam de acordo com a idade gestacional em que a infecção materna foi adquirida, sendo significativamente maiores quando a infecção materna ocorre entre 17 e 21 semanas de gestação (ROMAND et al., 2001).

A principal vantagem da PCR, além da alta especificidade e sensibilidade, é a rapidez na obtenção dos resultados, principalmente pela *real-time* PCR (< 4 horas), mas a principal desvantagem se encontra nos altos custos dos equipamentos necessários e na falta de kits comerciais padronizados, levando a maioria dos laboratórios a desenvolverem protocolos próprios (SWITAJ et al., 2005). Outra desvantagem da PCR

é o fato de seus resultados não permitirem estabelecer uma relação com a fase da doença. Por exemplo, um resultado positivo obtido a partir da PCR em amostra de tecido cerebral não pode diferenciar entre um paciente com encefalite toxoplásmica ou um indivíduo com outra patologia cerebral, mas que apresenta infecção crônica por *T. gondii*, com cistos teciduais. Somente o isolamento do parasita a partir de fluidos corporais pode comprovar que se trata de infecção aguda (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

1.11.1.2 Imunohistoquímica

Técnicas de imunohistoquímica são particularmente utilizadas para a demonstração de taquizoítas em cortes de tecidos ou esfregaços de fluidos corporais (líquor e lavado broncoalveolar), sendo mais sensíveis e específicas que as técnicas histológicas convencionais. Taquizoítas podem ser detectados tanto em infecção primária (aguda) como em casos de reativação de infecção crônica, comprovando que o parasita é responsável pelas alterações patológicas encontradas no tecido observado (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

A técnica da imunoperoxidase é a mais empregada, utilizando antisoros específicos para *T. gondii*, especialmente anticorpos monoclonais, para se evitar reações cruzadas. Entretanto, a sensibilidade de tais técnicas é geralmente muito baixa, pois é necessário um grande número de cortes histológicos para se detectar os parasitas (DUBEY, 1999).

1.11.1.3 Isolamento em animais ou cultura celular

Técnicas de isolamento necessitam de parasitas viáveis e, por isso, geralmente são menos sensíveis. Bioensaios geralmente utilizam camundongos (*Mus musculus*) alogênicos ou isogênicos, nos quais são inoculadas amostras de diferentes materiais biológicos extraídos de pacientes com suspeita de infecção, desde fluidos corporais até macerados teciduais. Antes da inoculação do material, o animal é submetido à sangria prévia para avaliar seu estado sorológico (controle negativo) e, cerca de 21-30 dias após a inoculação, nova sangria é realizada para verificar a soroconversão do animal. Tecidos dos animais inoculados soropositivos podem ser coletados (cérebro, coração, fígado, pulmão, baço, rins e músculos esqueléticos) e analisados quanto à presença de cistos teciduais. O isolamento do parasita pode ser feito em cultura celular, tais como células VERO, fibroblastos e monócitos, permitindo a genotipagem da linhagem de *T. gondii*

presente na infecção (HITT; FILICE, 1992; MONTOYA; LIESENFELD, 2004; SCHARES et al., 2005).

1.11.2 Métodos indiretos

Os métodos sorológicos são os mais comumente utilizados para o diagnóstico da infecção por *T. gondii* e são baseados, principalmente, na detecção de anticorpos do isotipo IgG. No entanto, a presença de anticorpos detectados por estes testes indica somente o contato prévio ou a exposição ao parasita. Para definir uma infecção recente ou ativa por análises sorológicas, é necessária a demonstração de altos e crescentes títulos de anticorpos IgG específicos em amostras pareadas de soro com intervalos de 2-4 semanas (DUBEY, 1987) ou a demonstração de anticorpos IgM específicos em uma única amostra de soro (CAMARGO et al., 1978).

1.11.2.1 Teste do corante de Sabin-Feldman (SFDT)

O teste do corante de Sabin-Feldman (SFDT – *Sabin-Feldman dye test*) foi o primeiro teste a ser utilizado como referência para sorologia de *T. gondii* (SABIN; FELDMAN, 1948). Embora apresente boa reprodutibilidade e alta sensibilidade, alguns inconvenientes na sua execução o tornam pouco utilizado em vários laboratórios, como a necessidade de parasitas vivos e de soro fresco normal (presença de frações do sistema complemento) para que ocorra a lise do parasita. Contudo, este teste é ainda utilizado em inquéritos soroepidemiológicos em diversas espécies animais, inclusive silvestres, pois não necessita de anticorpos secundários ou conjugados imunoenzimáticos espécie-específicos (CAMARGO, 1964). Ainda hoje, este teste é considerado como um método sorológico padrão para o diagnóstico da toxoplasmose (SUKTHANA, 2006).

1.11.2.2 Testes de aglutinação (DAT, MAT, IHAT)

Técnicas de aglutinação têm sido largamente desenvolvidas para sorologia de *T. gondii*, tais como o teste de aglutinação direta (*direct agglutination test* – DAT), teste de aglutinação direta modificada (*modified agglutination test* – MAT) e teste de hemaglutinação indireta (*indirect hemagglutination test* – IHAT). São largamente utilizados em inquéritos soroepidemiológicos em diferentes espécies de animais domésticos e silvestres e em humanos, pois não utilizam anticorpos secundários espécie-específicos.

DAT utiliza taquizoítas tratados com formalina, que aglutinam na presença de anticorpos específicos. Sua utilização para *T. gondii* foi descrita por Fulton e Turk (1959) e foi, posteriormente, modificado (MAT) com a utilização de 2-mercaptoetanol, que destrói anticorpos IgM específicos e não-específicos, detectando somente anticorpos IgG anti-*T. gondii* (DESMONTS; REMINGTON, 1980). Estes métodos apresentam altas sensibilidade e especificidade, simplicidade e versatilidade, podendo ser utilizados para diagnóstico em várias espécies animais, incluindo humanos. IHAT baseia-se na aglutinação passiva de hemácias previamente sensibilizadas com antígenos solúveis de *T. gondii* na presença de anticorpos específicos presentes no soro do paciente (JACOBS; LUNDE, 1957). Pode ser realizado com amostras de soro tratadas e não tratadas com 2-mercaptoetanol, permitindo assim a detecção de anticorpos IgM específicos e o diagnóstico de infecção recente. Entretanto, apesar da simplicidade e versatilidade, apresenta baixa sensibilidade em relação aos outros testes.

1.11.2.3 Teste de imunofluorescência indireta (IFAT)

O teste de imunofluorescência indireta (*indirect fluorescent antibody test* – IFAT) é amplamente utilizado para o diagnóstico da toxoplasmose em animais e humanos (CAMARGO, 1964). O antígeno utilizado nesta técnica é constituído por taquizoítas intactos, formolizados e fixados em lâminas de vidro para microscopia, que revelam uma fluorescência periférica e brilhante após incubação com amostras de soro (anticorpos primários) e anticorpos secundários espécie-específicos marcados com fluorocromos (conjugados fluorescentes). Fluorescência somente na extremidade apical (coloração polar) é considerada como reação não específica, devido a reações cruzadas com outros parasitas do grupo Apicomplexa. IFAT apresenta alta especificidade, pois detecta mais antígenos de superfície do que intracelulares, apresentando, assim, baixa reatividade cruzada com outros parasitas relacionados. As principais desvantagens deste teste são: necessidade de um microscópio de fluorescência, técnicos treinados e experientes, resultados relativamente subjetivos, e maiores dificuldades de utilização em grandes inquéritos soroepidemiológicos (CAMARGO, 1964).

1.11.2.4 Reações de *immunoblotting*

Vários antígenos de *T. gondii* têm sido definidos e caracterizados por anticorpos policlonais e monoclonais em reações de *immunoblotting*. A maioria destes antígenos está associada com estruturas na superfície do parasita, formando os antígenos de

superfície (SAG), ou no interior das organelas secretórias, como os micronemas (MIC), as roptrias (ROP) e os grânulos densos (GRA).

Os antígenos de superfície de *T. gondii* pertencem a uma superfamília de proteínas estruturalmente relacionadas ao principal antígeno de superfície do parasita (SAG1), conhecidas como proteínas SRS (Seqüências Relacionadas à SAG1), que são ancoradas na membrana via âncoras de glicosil-inositol-fosfolipídeos (GPI). SAG1 tem uma massa molecular estimada de 30 kDa (p30) e está homoganeamente distribuída na superfície. Além da SAG1, outros antígenos de superfície de *T. gondii* incluem SAG2 (22 kDa), SAG3 (43 kDa), SAG4 (23 kDa) e SAG5 (35 kDa), os quais são reconhecidos por soros humanos e animais em reações de *immunoblotting*. Vários componentes de micronemas (MIC1 a MIC11), de roptrias (ROP1 a ROP9) e de grânulos densos (GRA1 a GRA8) também têm sido reconhecidos e caracterizados em *T. gondii* (KASPER; CRABB; PFEFFERKORN, 1983; CESBRON-DELAUW et al., 1994; JUNG; LEE; GRIGG, 2004).

Na técnica de *immunoblotting*, antígenos totais de *T. gondii*, separados de acordo com a massa molecular em gel de poliacrilamida, por meio de eletroforese, e imobilizados em membranas de nitrocelulose, são incubados com amostras de soro e com conjugados imunoenzimáticos espécie-específicos. A revelação da reação é feita por meio da adição dos substratos enzimáticos e cromógenos, que revelam os antígenos imunodominantes do parasita reconhecidos pelos anticorpos presentes na amostra de soro testada. Esta técnica pode ser utilizada para a detecção de anticorpos dos isotipos IgG, IgM, IgA e IgE específicos a *T. gondii*, sendo mais amplamente utilizada para a detecção de IgG (GROSS et al., 1992).

1.11.2.5 Ensaios imunoenzimáticos (ELISA)

Os ensaios imunoenzimáticos (*enzyme linked immunosorbent assay* – ELISA) são atualmente os mais utilizados em sorologia para vários agentes infecciosos, inclusive *T. gondii*. Foram introduzidos por Voller e colaboradores (1976) e são baseados na reação de soros testes com antígenos imobilizados em placas de microtitulação de poliestireno. O anticorpo específico presente na amostra testada liga-se ao antígeno imobilizado nos poços das placas e é demonstrado pela adição de conjugados imunoenzimáticos (anti-imunoglobulina espécie-específica marcada com enzima) seguido pela reação da enzima com seu substrato e tampão cromógeno. A coloração gerada pode ser mensurada (densidade óptica) por meio de leitura em espectrofotômetro de placas e comparada com

a coloração desenvolvida por uma amostra controle negativo. As principais vantagens do ELISA são: obtenção de resultados mais objetivos, custo relativamente baixo e possibilidade de testar grandes quantidades de amostras em pequeno espaço de tempo, tendo larga aplicação em inquéritos soroepidemiológicos. As desvantagens estão relacionadas principalmente à reprodutibilidade dos resultados.

A sensibilidade e especificidade do ELISA são altamente dependentes do tipo de antígeno e modalidade de testes utilizados. Assim, diferentes preparações de antígeno têm sido desenvolvidas: (1) antígenos solúveis e totais de taquizoítas contendo uma mistura de antígenos de superfície e intracelulares obtidos por criólise, sonicação ou solubilização em detergentes, como o STAg (antígeno solúvel de taquizoítas de *T. gondii*); (2) antígenos de taquizoítas fixados com formalina (maioria de superfície); (3) antígenos excretados e/ou secretados pelo parasita, como o ESA (*excreted/secreted antigens*); (4) proteínas nativas purificadas por meio de cromatografia de afinidade utilizando anticorpos monoclonais; (5) proteínas recombinantes de antígenos imunodominantes dos parasitas. Desta forma, quanto maior o grau de purificação dos antígenos, maior é a especificidade do teste (ELISA utilizando proteínas nativas ou recombinantes) e, por outro lado, quanto menos purificada a preparação antigênica (ELISA utilizando antígeno total), maior é a probabilidade de ocorrer reatividade cruzada com parasitas relacionados (SENSINI, 2006; SUKTHANA, 2006).

Por meio dos ensaios imunoenzimáticos, podem ser detectados anticorpos específicos de diferentes isotipos (IgG, IgM, IgA e IgE) no soro de pacientes, mas também podem ser detectados em outras amostras biológicas, como saliva, leite (colostró), líquido e líquido amniótico (REMINGTON; THULLIEZ; MONTOYA, 2004).

Anticorpos do isotipo IgG constituem a primeira classe de imunoglobulinas que foi detectada em ensaios imunoenzimáticos padronizados para sorologia de *T. gondii*. Como a toxoplasmose caracteriza-se por ser uma doença crônica, anticorpos IgG podem permanecer em níveis detectáveis por toda a vida do indivíduo infectado, sendo que a sua simples detecção não permite avaliar a fase da infecção (aguda ou crônica). Em mulheres grávidas, a presença de IgG específica no soro, na ausência de anticorpos IgM, geralmente é interpretada como infecção tardia e, portanto, sem riscos de transmissão placentária, enquanto a detecção de anticorpos IgG no feto ou recém-nascido tem pouco valor diagnóstico de infecção congênita, pois podem se tratar de anticorpos maternos transferidos passivamente por meio da placenta. Já mulheres grávidas com resultado

negativo de anticorpos IgG específicos não estão infectadas e devem ser acompanhadas sorologicamente durante toda a gestação, pois se adquirirem uma infecção primária durante este período, há alta probabilidade de infecção congênita do feto (HILL; DUBEY, 2002; MONTOYA; LIESENFELD, 2004; SENSINI, 2006).

O principal ensaio imunoenzimático utilizado na detecção de anticorpos IgG é o método ELISA indireto, no qual as placas são sensibilizadas com antígenos de *T. gondii*. Este ensaio apresenta boa sensibilidade e boa especificidade, sendo de larga utilização em inquéritos soroepidemiológicos. No mercado, são encontrados diversos kits comerciais disponíveis para a detecção desta imunoglobulina específica, os quais podem variar em sensibilidade e especificidade (MONTOYA; LIESENFELD, 2004).

Para auxiliar no diagnóstico da infecção primária, principalmente em mulheres grávidas e recém-nascidos, as técnicas imunoenzimáticas têm sido modificadas para a detecção de anticorpos IgM, IgA e IgE específicos a *T. gondii*. A presença de anticorpos IgM específicos é interpretada como infecção aguda (recente), uma vez que tais imunoglobulinas são produzidas apenas após infecção primária, podendo ser detectadas na primeira ou segunda semana de infecção. A principal vantagem da detecção de IgM é que um resultado negativo pode descartar a possibilidade de infecção recente, mas sua principal desvantagem está no fato de que pode persistir no soro, em níveis detectáveis, por muitos meses, de modo que um resultado positivo nem sempre pode ser interpretado como indicativo de uma infecção recente. As técnicas imunoenzimáticas para detecção de IgM apresentam sensibilidade e especificidade muito variáveis, sendo os resultados obtidos por meio da utilização de kits comerciais pouco confiáveis e seguros. O ELISA indireto apresenta uma grande porcentagem de resultados falso-negativos, apresentando, portanto, baixa sensibilidade (SENSINI, 2006; SUKTHANA, 2006). Uma técnica que apresenta maior sensibilidade é o ELISA de captura, em que as placas são sensibilizadas com anticorpos que capturam a porção Fc de anticorpos IgM presentes no soro testado, e aqueles específicos a *T. gondii* são selecionados mediante a adição subsequente de antígenos do parasita, seguidos de anticorpos anti-*T. gondii* conjugados com enzimas (CAMARGO et al., 1978; MINEO et al., 1986).

A detecção de IgA específica no soro pode ser usada para a confirmação de resultados, uma vez que geralmente é detectada em níveis mais elevados durante uma infecção recente, desaparecendo completamente antes da IgM, mas também em níveis muito variáveis. O ELISA de captura para IgA é mais específico e mais sensível que o ELISA indireto, mas um resultado positivo nem sempre significa infecção recente,

enquanto um resultado negativo nem sempre pode excluir uma infecção aguda (SENSINI, 2006).

A detecção de anticorpos IgE tem sido proposta para a diferenciação do estágio da infecção, uma vez que são detectados apenas durante a infecção aguda e a duração de sua soropositividade é menor que a de IgM e IgA. Porém, a demonstração de que pode ser detectada em casos de reativação de infecção crônica e a falta de testes padronizados para sua detecção torna sua pesquisa pouco utilizada no diagnóstico da toxoplasmose (FOUDRINIER et al., 2003; SENSINI, 2006).

Um teste que vem sendo largamente utilizado para auxiliar na discriminação entre infecção recente e infecção tardia é o teste da avidéz de IgG. Este teste baseia-se na medida da avidéz (afinidade funcional) de anticorpos IgG específicos a antígenos de *T. gondii*. No teste ELISA-avidéz, agentes desnaturantes de proteínas, tais como uréia, são usados para dissociar a ligação dos complexos antígeno-anticorpo, de modo que apenas os anticorpos com maior afinidade (mais ávidos) permanecem ligados aos antígenos (HEDMAN et al., 1989). Anticorpos de baixa avidéz são indicativos de infecção aguda ou recente, enquanto anticorpos de alta avidéz são indicativos de infecção crônica (mais tardia). (LAPPALAINEN et al., 1993; SENSINI et al., 1996; COZON et al., 1998; BEGHETTO et al., 2003; REMINGTON; THULLIEZ; MONTOYA, 2004).

1.11.3 Perfis sorológicos da infecção por *T. gondii*

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

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

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

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

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

A definição correta e mais precisa destes perfis sorológicos e, conseqüentemente, o correto diagnóstico da infecção devem ser feitos com base na combinação de diferentes métodos, para a pesquisa de diferentes classes de imunoglobulinas.

Muitos estudos têm sido realizados por diferentes investigadores, com o intuito de se encontrar antígenos mais específicos e/ou antígenos recombinantes, cuja utilização em métodos sorológicos possa ser útil para melhorar o desempenho dos ensaios para detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em diferentes amostras biológicas (AUBERT et al., 2000; LI et al., 2000; SUZUKI et al., 2000b; GIRALDO et al., 2002; KAUL; CHEN; BINDER, 2004; PIETKIEWICZ et al., 2004). Outros estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de se obter maiores informações que estabeleçam conexões entre as estruturas antigênicas e genômicas de *T. gondii* e o diagnóstico preciso da infecção (CONTINI et al., 2006). Além disso, a utilização de anticorpos monoclonais que capturam moléculas específicas do antígeno solúvel do parasita, como a SAG1 (p30), em ensaios imunoenzimáticos, tem sido pouco explorada, mas pode constituir uma importante ferramenta no diagnóstico da toxoplasmose (MOLEÓN et al., 1993; SOHN; NAM, 1999).

1.12 Epidemiologia, soroprevalência e prevenção

Toxoplasmose é uma das zoonoses mais comuns no mundo. É estimado que cerca de um terço da população mundial está infectada por *T. gondii*. Porém, a soroprevalência varia enormemente entre diferentes países, entre diferentes áreas geográficas do mesmo país e entre diferentes grupos étnicos vivendo na mesma área. Deste modo, anticorpos anti-*T. gondii* podem ser encontrados numa taxa que varia de 0-100% da população, dependendo do grupo analisado. Uma dificuldade em se estabelecer a taxa de prevalência real da infecção em diferentes regiões reside na grande

diversidade de métodos utilizados nos inquéritos, os quais podem variar muito em sensibilidade, especificidade e valores preditivos (TENTER; HECKEROTH, WEISS, 2000; MONTOYA; LIESENFELD, 2004).

Com o objetivo de prevenir a infecção por *T. gondii*, algumas recomendações devem ser levadas em consideração. Carnes devem ser bem cozidas, para que ocorra a destruição total de possíveis cistos teciduais, que são completamente destruídos quando submetidos a temperaturas superiores a 67°C ou inferiores a -13°C. Devem ser evitados alimentos preparados com carnes cruas ou mal cozidas, lavando-se as mãos e os utensílios utilizados no preparo de carnes. Para se evitar infecção por meio da ingestão de oocistos, alimentos ingeridos crus, tais como frutas e verduras, devem ser bem lavados com água e, quando aplicável, sabão. A água ingerida deve ser tratada e filtrada, uma vez que alguns surtos de toxoplasmose têm sido atribuídos à contaminação de fontes de água. Contato com gatos ou suas excreções deve ser evitado, principalmente por mulheres grávidas, bem como o acesso destes animais a reservatórios de água ou plantações de hortaliças. Além disso, devem ser usadas luvas durante procedimentos de jardinagem ou quando houver necessidade de contato com o solo, tendo-se o cuidado de lavar as mãos após contato com solo ou com animais, que podem ter oocistos presos aos pêlos (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000; HILL; DUBEY, 2002; DUBEY, 2004; KRAVETZ; FEDERMAN, 2005; SUKTHANA, 2006).

Mulheres grávidas devem fazer o completo exame pré-natal e, caso sejam soronegativas, devem intensificar as medidas anteriormente propostas e fazer o acompanhamento sorológico até o parto, pois devem receber tratamento adequado se forem infectadas durante a gestação (MONTOYA; LIESENFELD, 2004; KRAVETZ; FEDERMAN, 2005).

Uma vacina efetiva contra o parasita ainda não foi desenvolvida, existindo apenas uma vacina preparada a partir de parasitas vivos atenuados, usada na vacinação de ovelhas (BUXTON; INNES, 1995). Muitas pesquisas têm sido realizadas no desenvolvimento de vacinas que possam induzir forte resposta imune humoral (IgA) ou celular (Th1) protetoras que confirmem imunidade duradoura contra a infecção. Estas pesquisas têm investigado a aplicação de antígenos de superfície de *T. gondii* purificados ou recombinantes, parasitas vivos atenuados, parasitas mutantes ou plasmídeos com genes que codifiquem antígenos do parasita e/ou fatores estimuladores de colônias (ISMAEL et al., 2003; LETSCHER-BRU et al., 2003; MEVÉLÉC et al., 2005).

O tratamento da toxoplasmose pode ser feito com o uso de drogas do grupo dos antagonistas de folato (reduzem a proliferação do parasita por meio da inibição de enzimas envolvidas na síntese de folato), macrolídeos (apresentam efeito tóxico ao parasita, como a espiramicina, usada durante a gestação), hidroxinaftoquinonas (apresentam efeito tóxico ao parasita, pois inibem moléculas envolvidas na cadeia respiratória), fluoroquinolonas (impedem a proliferação do parasita, pois inibem enzimas envolvidas na replicação de seu DNA), bem como corticosteróides (drogas que atuam reduzindo a resposta imune do hospedeiro, inibindo algumas vias pró-inflamatórias) (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003). A escolha da droga deve ser feita, principalmente, de acordo com o grupo ao qual pertence o paciente (mulher grávida, indivíduo imunocomprometido, indivíduo imunocompetente ou recém-nascido) e o estágio da infecção (MONTROYA, LIESENFELD, 2004).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a viabilidade da utilização de anticorpos monoclonais (mAbs) reativos aos antígenos p30, p22 e p97 de *T. gondii* em um ELISA reverso para a detecção de anticorpos das classes IgG, IgM e IgA em amostras de soro de pacientes em diferentes estágios da infecção.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar a natureza dos antígenos e epítomos reconhecidos pelos mAbs A3A4, A4D12 e 1B8 por meio da técnica de *immunoblotting*.
- Verificar a localização celular dos antígenos reconhecidos por estes mAbs por meio da técnica de imunofluorescência indireta.
- Avaliar a habilidade de inibição dos epítomos reconhecidos por estes mAbs por soros humanos através de um teste ELISA de inibição.
- Padronizar um ELISA reverso usando estes mAbs como anticorpos de captura para as moléculas p30, p22 e p97 presentes no antígeno solúvel de *T. gondii* (STAg) e avaliar a sua utilização para a detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA específicos a *T. gondii* em amostras de soro humano.
- Comparar os resultados do ELISA reverso usando mAbs com aqueles obtidos pelo ELISA indireto usando STAg para a detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA específicos a *T. gondii* em amostras de soro humano.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras de soros

Um total de 175 amostras de soro humano foi obtido a partir do banco de soros do Laboratório de Imunoparasitologia da Universidade Federal de Uberlândia. Tais amostras foram divididas em quatro grupos, de acordo com o perfil sorológico da infecção por *T. gondii*, conforme determinado por meio de ensaios sorológicos convencionais (ELISA indireto para detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* e ELISA de captura para detecção de anticorpos IgM e IgA específicos).

De acordo com os resultados obtidos por meio destes ensaios convencionais e conforme os critérios de seleção, os grupos de estudo ficaram assim constituídos:

(1) **Grupo I:** 45 amostras de soro de pacientes com infecção recente, definida pela presença de anticorpos IgG, IgM e IgA específicos a *T. gondii*.

(2) **Grupo II:** 40 amostras de soro de pacientes com infecção na fase de transição, definida pela presença de anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii* e ausência de anticorpos IgA específicos.

(3) **Grupo III:** 55 amostras de soro de pacientes com infecção crônica, definida pela presença de anticorpos IgG anti-*T. gondii* e ausência de anticorpos IgM e IgA específicos.

(4) **Grupo IV:** 35 amostras de soro de indivíduos com sorologia negativa para *T. gondii* (ausência de anticorpos IgG, IgM e IgA específicos).

Além disso, dois grupos sorologicamente atípicos também foram analisados: um grupo constituído por 4 amostras de soro negativas para anticorpos IgG anti-*T. gondii* e positivas para anticorpos IgM e IgA específicos (G-M+A+); e um grupo formado por 4 amostras de soro negativas para anticorpos IgM anti-*T. gondii* e positivas para anticorpos IgG e IgA específicos (G+M-A+).

3.2 Manutenção e obtenção de *T. gondii*

Parasitas da cepa RH de *T. gondii* foram mantidos por meio de inoculação intraperitoneal em camundongos Swiss, através de passagens seriadas a intervalos de 48-72 horas de um inóculo de aproximadamente 10^6 taquizoítas obtidos do exsudato peritoneal de camundongos previamente infectados (MINEO; CAMARGO; FERREIRA, 1980). Os exsudatos peritoneais foram obtidos por meio de lavagem da

cavidade abdominal do animal com solução salina estéril tamponada com fosfato a 0,01 M (PBS, pH 7,2) e, em seguida, as suspensões parasitárias foram submetidas a uma centrifugação rápida (45 x g, 1 minuto, 4°C) para remover debris celulares do hospedeiro. O sobrenadante foi coletado e lavado por duas vezes (720 x g, 10 minutos, 4°C) com PBS. O sedimento final da suspensão parasitária foi ressuscitado em 10 mL de PBS e os parasitas contados em câmara hemocitométrica. Após nova lavagem com PBS, o sedimento foi armazenado a -20°C para posterior preparação de antígenos solúveis de *T. gondii*.

3.3 Preparação de antígenos de *T. gondii*

3.3.1 Taquizoítas intactos (formolizados)

Taquizoítas intactos de *T. gondii* foram preparados como previamente descrito (CAMARGO, 1964). Suspensões parasitárias foram ajustadas a uma concentração de 1×10^6 taquizoítas/mL e tratadas com formaldeído a 1% em PBS por 30 minutos à temperatura ambiente sob agitação lenta. Após uma centrifugação rápida (45 x g, 1 minuto, 4°C) para remover parasitas aglomerados, o sobrenadante foi lavado com PBS por duas vezes (720 x g, 10 minutos, 4°C). O sedimento final foi ressuscitado em água destilada estéril até obter uma concentração de 20-30 parasitas por campo microscópico (aumento 400X). Um volume de 10 µL da suspensão parasitária foi adicionado a áreas demarcadas de lâminas para imunofluorescência (Perfecta Ind. e Com. de Lâminas de Vidro Ltda., São Paulo, SP, Brasil) e incubadas por 3-4 horas à temperatura ambiente. As lâminas com taquizoítas intactos formolizados foram individualmente embaladas e armazenadas a -20°C para serem usadas nos ensaios de imunolocalização pela técnica de imunofluorescência indireta.

3.3.2 Antígenos solúveis

Antígeno solúvel de taquizoítas de *T. gondii* (STAg) foi preparado como descrito por Scott e colaboradores (1987), com algumas modificações. Suspensões parasitárias (1×10^8 taquizoítas/mL) foram tratadas com inibidores de proteases (fenil-metil-sulfonil-fluoreto [PMSF] a 1,6 mM, leupeptina a 50 µg/mL e aprotinina a 10 µg/mL; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) e então submetidas a seis ciclos rápidos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C seguido por seis ciclos de ultra-som (Thorton – INPEC Eletrônica S/A, Santo Amaro,

SP, Brasil) durante 1 minuto a 60 Hz em banho de gelo. Após centrifugação (10.000 x g, 30 minutos, 4°C), o sobrenadante foi coletado e a concentração protéica foi determinada (LOWRY et al., 1951). Alíquotas dos antígenos foram armazenadas a -20°C até serem utilizadas em testes ELISA.

3.3.3 Antígenos totais

Taquizoítas de *T. gondii* (1×10^8 taquizoítas/mL) foram lisados em tampão de amostra (Tris-HCl a 0,1 M pH 6,8; dodecil sulfato de sódio [SDS] a 4%; glicerol a 20% e azul de bromofenol a 0,2%). Parasitas solubilizados foram centrifugados (10.000 x g, 10 minutos, 4°C) e o sobrenadante foi recuperado e usado como antígeno lisado de *T. gondii* (TLA) nas reações de *immunoblotting*.

3.4 Produção de anticorpos monoclonais (mAbs)

Taquizoítas da cepa RH de *T. gondii* foram coletados do exsudato peritoneal de camundongos Swiss previamente infectados, parcialmente purificados por meio de lavagens em PBS e fixados com acetona a 30% em PBS (72 horas, 4°C). Após a fixação, os parasitas foram lavados em solução PBS e utilizados para imunização de camundongos BALB/C. Os animais foram imunizados por via intraperitoneal utilizando um volume de 100 µL de uma suspensão de 1×10^7 taquizoítas/mL em intervalos regulares de 15 dias em três inoculações sucessivas. Sete dias antes da realização do processo de fusão, os animais foram inoculados com a mesma concentração de parasitas por via endovenosa.

A produção dos hibridomas foi conduzida como previamente descrito por Kohler e Milstein (1975). Após o término do esquema de imunização, o baço dos animais foi coletado e a suspensão celular obtida foi adicionada às células de mieloma murino SP2O/Ag14 na proporção de 1:1 e, a seguir, as populações mistas de células foram centrifugadas (1.000 x g, 10 minutos). O sobrenadante foi descartado e ao sedimento de células foi adicionado lentamente polietilenoglicol 1500 (PEG 1500) na concentração de 50%, sob agitação constante a 37°C durante 1 minuto, quando então o volume foi completado para 50 mL com meio DMEM sem soro fetal bovino. As células fusionadas (hibridomas) secretando anticorpos foram selecionadas por ELISA indireto, clonadas por diluição limitante em placas de 96 poços, amplificadas em meio RPMI suplementado (soro fetal bovino a 10%, 2 mM de glutamina, 50 µM de β-mercaptoetanol e 40 µg/mL de gentamicina) e estocadas em nitrogênio líquido.

Os mAbs A3A4 e A4D12 utilizados neste trabalho foram assim obtidos e isotipados (IgG1, κ), enquanto sobrenadantes do mAb 1B8 (IgG2b, κ) foram gentilmente fornecidos por Lloyd H. Kasper (Dartmouth Medical School, Lebanon, NH, EUA). Os mAbs A3A4 e A4D12 foram previamente caracterizados por mapeamento de epítopo baseado na técnica de biblioteca de fagos (“phage display”) (Ph.D.-12 Peptide Library Kit, New England BioLabs Inc., Beverly, MA, EUA) conforme previamente descrito (CUNHA-JÚNIOR, 2005).

3.5 Purificação de anticorpos por afinidade

Para purificação dos mAbs A3A4, A4D12 e 1B8 a partir de sobrenadantes de cultura de hibridomas, uma coluna contendo resina de imunoafinidade de proteína G-sepharose (Amersham Biosciences, UK) foi pré-equilibrada com 50 mL de solução fosfato a 100 mM em pH 8,0 (10 volumes da resina). A seguir, 20 mL de sobrenadante de cada hibridoma foram diluídos 1:1 (v/v) com tampão fosfato e aplicado à resina com fluxo de 0,5 mL/minuto. Ao final da aplicação, a resina foi lavada com o mesmo tampão utilizado no equilíbrio e a densidade óptica (DO) foi monitorada a 280 nm até atingir a linha de base (DO mensurada antes da aplicação). As imunoglobulinas (mAbs) retidas na resina foram eluídas por adição de tampão glicina 0,2 M (pH 2,6) e coletadas em frações de 1-2 mL. As frações que apresentaram os maiores valores de DO a 280 nm foram reunidas e neutralizadas com solução tampão de Tris-HCl 1 M, pH 7,5. Posteriormente, a fração purificada de mAbs foi dialisada em PBS e concentrada em equipamento Amicon™ (Millipore, Billerica, MA, EUA) usando membranas com limite de filtragem de 30 kDa. O conteúdo protéico de cada mAb purificado foi determinado (LOWRY et al., 1951) e o perfil eletroforético das frações representativas da purificação foi analisado por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 8% em condições não redutoras. As alíquotas obtidas foram armazenadas a -20°C até serem utilizadas.

3.6 Immunoblotting

Antígeno lisado de *T. gondii* (TLA) foi aquecido a 100°C por 3 minutos na presença (condições redutoras) ou na ausência (condições não redutoras) de 2-mercaptoetanol (2ME) a 10% e submetido à SDS-PAGE a 10% (LAEMMLI, 1970), utilizando o sistema de eletroforese vertical em mini-gel (Hoefer Pharmacia Biotech Inc., San Francisco, CA, EUA). Um volume de 150 μ L foi aplicado em cada corrida

eletroforética e, em paralelo, padrões de pesos moleculares (Sigma Chemical Co., EUA; Amersham Life Science, EUA) foram também incluídos. Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (poros de 0,22 μm ; Sigma Chemical Co.) de acordo com método anteriormente descrito (TOWBIN; STAHELIN; GORDON, 1979), utilizando um sistema semi-úmido de transferência (Multiphor Novablot II, Pharmacia-LKB, Suécia) por 2 horas a uma corrente constante de 0,8 mA/cm^2 do gel. O sucesso da transferência foi confirmado pela visualização das frações protéicas e padrões de pesos moleculares coradas com solução de Ponceau a 0,5%.

As membranas de nitrocelulose foram cortadas em tiras de aproximadamente 3 mm de largura e colocadas em canaletas apropriadas para a reação. As tiras foram bloqueadas com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T) mais 5% de leite desnatado (PBS-TM) por 1 hora a 37°C e, após lavagem com PBS-T, foram incubadas por 2 horas a 37°C com os mAbs purificados A3A4 (anti-p30), A4D12 (anti-p22) e 1B8 (anti-p97). Após 6 lavagens de 5 minutos com PBS-T, a detecção da ligação dos mAbs aos antígenos imobilizados foi realizada pela subsequente incubação das tiras com anticorpo secundário de cabra anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase (1:1000; Sigma Chemical Co.) por 1 hora a 37°C. Posteriormente, as membranas foram novamente lavadas com PBS-T e reveladas pela adição de tabletes de 3,3'-diaminobenzidina (Sigma Fast™; Sigma Chemical Co.). A reação foi interrompida com água destilada quando bandas de coloração marrom foram visualizadas.

3.7 Imunofluorescência indireta

Para imunolocalização dos antígenos de taquizoítas de *T. gondii* reconhecidos pelos mAbs purificados, foi realizado o teste de imunofluorescência indireta usando taquizoítas formolizados aderidos a lâminas de vidro. As lâminas foram incubadas com Triton X-100 (Sigma Chemical Co.) a 0,1% por 10 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, com os mAbs A3A4, A4D12 ou 1B8 por 45 minutos a 37°C. Após este período, foram lavadas por três vezes com PBS durante 5 minutos cada e incubadas com anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC; Sigma Chemical Co.) diluído 1:50 em PBS acrescido de azul de Evans a 0,01% por 30 minutos a 37°C. Como controles negativos, foram utilizadas lâminas incubadas apenas com diluente, seguida da adição do conjugado fluorescente. Terminado este tempo, as lâminas foram lavadas novamente com PBS como descrito

anteriormente e montadas com lamínulas e glicerina tamponada com carbonato-bicarbonato 50 mM (pH 8,5). As lâminas foram analisadas em microscópio de epifluorescência (Olympus BH2, Tokyo, Japão) e a aquisição das imagens foi realizada em filme fotográfico *asa* 400 utilizando abertura do diafragma da câmera (módulo automático) por período de exposição de 2-4 minutos.

3.8 Ensaios imunoenzimáticos (ELISA)

3.8.1 ELISA indireto (ELISA-STAg)

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

Placas de microtitulação de poliestireno de alta afinidade (Corning Laboratories Inc., New York, NY, EUA) foram sensibilizadas com STAg (10 µg/mL) diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M (pH 9,6) durante 18 horas a 4°C. Após a incubação, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T e bloqueadas com PBS-T contendo 5% de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé, São Paulo, SP) (PBS-TM) por 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagem por três vezes com PBS-T, as placas foram incubadas com amostras de soro diluídas em PBS-TM (1:64 para detecção de anticorpos IgG e IgM e 1:16 para detecção de anticorpos IgA) por 1 hora a 37°C. Após lavagem por seis vezes, as placas foram incubadas com anticorpos de cabra anti-IgG humana (1:2000) ou anti-IgM humana (1:1000) ou anti-IgA humana (1:500) conjugados com peroxidase (Sigma Chemical Co.) por 1 hora a 37°C. Após nova lavagem por seis vezes com PBS-T, a reação foi revelada pela adição do substrato enzimático H₂O₂ a 0,03% e cromógeno 2,2'-azino-bis-3-etil-benzotiazolina ácido sulfônico (ABTS; Sigma Chemical Co.) a 0,01 M diluídos em tampão citrato-fosfato 0,07 M (pH 4,2).

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

3.8.2 ELISA de inibição

Um ELISA de inibição foi realizado para avaliar as propriedades imunológicas dos mAbs A3A4, A4D12 e 1B8 como ferramentas para o sorodiagnóstico da toxoplasmose, conforme previamente descrito (FORTIER et al., 1991; GRAILLE et al., 2005), com algumas modificações. Para isto, foram utilizadas 20 amostras de soro humano (10 soropositivas e 10 soronegativas para *T. gondii*) e seus respectivos perfis sorológicos para anticorpos IgG específicos foram determinados previamente por ELISA indireto usando STAg.

Placas de microtitulação de poliestireno com 96 poços (NUNC maxisorp^{RT} –Nalge Nunc International Co., Rochester, NY, EUA) foram sensibilizadas com STAg (10 µg/mL) diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M (pH 9,6) durante 18 horas a 4°C. As placas foram lavadas quatro vezes com PBS-T e incubadas com as amostras de soro humano (em quadruplicata) diluídas 1:64 em solução salina tamponada com Tris a 0,02 M contendo 0,05% de Tween 20 (TBS-T) ou com o controle (apenas TBS-T) por 30 minutos à temperatura ambiente. Após lavagem, as placas foram incubadas com os respectivos mAbs purificados (10 µg/mL em TBS-T) em poços duplicados por 30 minutos à temperatura ambiente. Após quatro lavagens adicionais, o conjugado de cabra anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase (1:1000; Sigma Chemical Co.) foi adicionado e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente. Após nova lavagem, a reação foi revelada pela adição do substrato enzimático H₂O₂ a 0,03% e cromógeno ABTS a 0,01 M diluídos em tampão citrato-fosfato 0,07 M (pH 4,2).

As leituras de DO foram determinadas a 405 nm e os resultados foram expressos como a porcentagem de inibição da ligação dos mAbs ao STAg em relação ao controle positivo (mAbs não inibidos por amostras de soro, que foram substituídas por TBS-T apenas).

3.8.3 ELISA de captura IgM e IgA

ELISA de captura foi realizada para a detecção de anticorpos IgM e IgA específicos a *T. gondii* em amostras de soro humano, seguindo o protocolo anteriormente descrito (MINEO et al., 1986), com algumas modificações.

Microplacas de poliestireno (Immulon 2, Dynex Technologies, Chantilly, VA, EUA) foram sensibilizadas com anticorpos de captura anti-IgM humana ou anti-IgA

humana (Sigma Chemical Co.) a 10 µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M (pH 9,6) durante 18 horas a 4°C. Após este período de incubação, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T e bloqueadas com PBS-TM por 1 hora à temperatura ambiente. Após serem lavadas por mais três vezes, as placas foram incubadas com amostras de soro humano diluídas em PBS-TM (1:16) por 2 horas a 37°C. Após novas lavagens, as placas foram incubadas com STAg (100 µg/mL) em PBS-TM por 2 horas a 37°C. O antígeno ligado foi detectado pela adição da porção F(ab')₂ de anticorpo de coelho anti-*T. gondii* conjugado com peroxidase (preparado segundo Wilson e Nakane, 1978) diluído 1:50 em PBS-TM, seguindo incubação por 1 hora a 37°C. As etapas de revelação, leitura e expressão dos índices de reatividade ELISA foram realizadas conforme descrito para ELISA indireto.

3.8.4 ELISA reverso (ELISA-mAbs)

Um ELISA reverso foi desenvolvido usando mAbs A3A4, A4D12 e 1B8 como anticorpos de captura para as moléculas correspondentes (p30, p22 e p97) presentes no antígeno solúvel de *T. gondii* (STAg), como previamente descrito para a detecção de anticorpos IgE específicos a Der p 2, um dos principais alérgenos do ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* (SILVA et al., 2001).

Placas de microtitulação de poliestireno de alta afinidade (Corning Laboratories Inc.) foram separadamente sensibilizadas com os mAbs purificados A3A4 (anti-p30), A4D12 (anti-p22) ou 1B8 (anti-p97) a 10 µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato a 0,06 M (pH 9,6) durante 18 horas a 4°C. Como um controle negativo da reação com os mAbs, em paralelo, placas foram sensibilizadas com isotipos IgG irrelevantes de camundongo (eBioscience, San Diego, CA, EUA) na mesma concentração. Após a incubação, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T e bloqueadas com PBS-TM por 1 hora à temperatura ambiente. Após o bloqueio, as placas foram novamente lavadas por três vezes e incubadas com STAg (20 µg/mL) diluído em PBS-TM por 1 hora a 37°C. Na sequência, as placas foram lavadas seis vezes e incubadas com amostras de soro humano diluídas em PBS-TM (1:64 para a detecção de anticorpos IgG e IgM ou 1:16 para a detecção de anticorpos IgA) por 1 hora a 37°C. Após lavagem por seis vezes, as placas foram incubadas com conjugados de cabra anti-IgG humana (1:2000) ou anti-IgM humana (1:1000) ou anti-IgA humana (1:500) marcados com peroxidase (Sigma Chemical Co.) por 1 hora a 37°C.

As etapas de revelação, leitura e expressão dos índices de reatividade ELISA foram realizados conforme descrito para ELISA indireto.

Experimentos preliminares foram realizados para a padronização da reação, com o objetivo de otimizar a solução bloqueadora de sítios inespecíficos e a concentração do STAg a ser utilizada, além de avaliar o controle negativo dos mAbs com isotipos irrelevantes. Deste modo, foram realizados ensaios como descrito anteriormente, utilizando 8 soros humanos positivos para IgG anti-*T. gondii* e 3 soros negativos, avaliando diferentes soluções bloqueadoras (leite desnatado a 5% em PBS-T [PBS-TM] ou soroalbumina bovina a 1% em PBS-T [PBS-T-BSA]) e concentrações do STAg (20 µg/mL ou 40 µg/mL).

Para confirmar os resultados obtidos para anticorpos IgG nestes ensaios de padronização, foram conduzidos novos ensaios para a detecção dos isotipos IgG, IgM e IgA, utilizando 3 amostras de soro humano positivas e 3 amostras negativas para os respectivos isotipos, seguindo as mesmas condições previamente estabelecidas.

3.9 Análise estatística

A análise estatística foi realizada por meio da utilização do programa computacional *GraphPad Prism* versão 3.0 (*GraphPad Software, Inc.*).

As porcentagens de soropositividade encontradas nos diferentes ensaios foram comparadas pelo teste χ^2 . As porcentagens de inibição foram expressas em intervalos de confiança (IC) de 95%. As correlações entre os níveis de anticorpos IgG, IgM e IgA específicos a *T. gondii* determinados pelo ELISA indireto usando STAg e pelo ELISA reverso usando os mAbs foram analisadas pelo teste de correlação de Spearman. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1 Purificação dos mAbs por afinidade

Com o objetivo de se obter frações purificadas dos mAbs A3A4, A4D12 e 1B8, sobrenadantes das respectivas culturas de hibridomas foram submetidos a uma coluna de proteína G-sepharose, para a retenção de anticorpos IgG por afinidade à proteína G.

A Figura 5 é representativa da purificação de cada um dos mAbs de interesse. Como demonstrado pelo cromatograma na Figura 5A, podem ser notados dois picos de absorbância registrados a 280 nm, sendo o primeiro deles correspondente à fração do sobrenadante de cultura dos hibridomas não ligada à resina, enquanto o segundo pico corresponde à fração purificada dos respectivos mAbs, eluída da resina por meio da aplicação de tampão glicina (pH 2,6). Na Figura 5B, é apresentado o perfil eletroforético em gel de poliacrilamida a 8% das frações obtidas por meio da purificação por afinidade. Observa-se, na linha 4, a fração eluída da resina, que revela uma única banda de 150 kDa, consistente com a massa molecular estimada para anticorpos IgG de camundongos.

4.2 Immunoblotting para caracterização dos antígenos reconhecidos pelos mAbs

Com o objetivo de determinar a massa molecular aparente e a natureza dos epítopos reconhecidos pelos mAbs A3A4, A4D12 e 1B8, foi realizado um ensaio de *immunoblotting* conformacional. Para a realização deste ensaio, antígenos de lisados de taquizoítas de *T. gondii* foram submetidos a tratamento na presença ou ausência de 2-mercaptoetanol (2ME) por 5 minutos a 100°C.

Conforme observado na Figura 6, o mAb 1B8 reconheceu um polipeptídeo de 97 kDa (p97), tanto na presença quanto na ausência do agente redutor. Um perfil similar de reatividade foi observado para o mAb A4D12, que reconheceu um polipeptídeo de 22 kDa em condições redutoras e não-redutoras. Por outro lado, o mAb A3A4 mostrou reatividade a polipeptídeos de 30/60 kDa na ausência do agente redutor, mas não demonstrou nenhuma reatividade quando o antígeno de *T. gondii* foi previamente submetido a condições redutoras. Estes resultados indicam que os mAbs 1B8 e A4D12 são anticorpos não sensíveis à conformação, que reconhecem, respectivamente, epítopos lineares dos antígenos de 97 kDa e 22 kDa de *T. gondii*, enquanto o mAb A3A4 é um anticorpo sensível à conformação, que reconhece um epítipo conformacional do antígeno de 30 kDa de *T. gondii*.

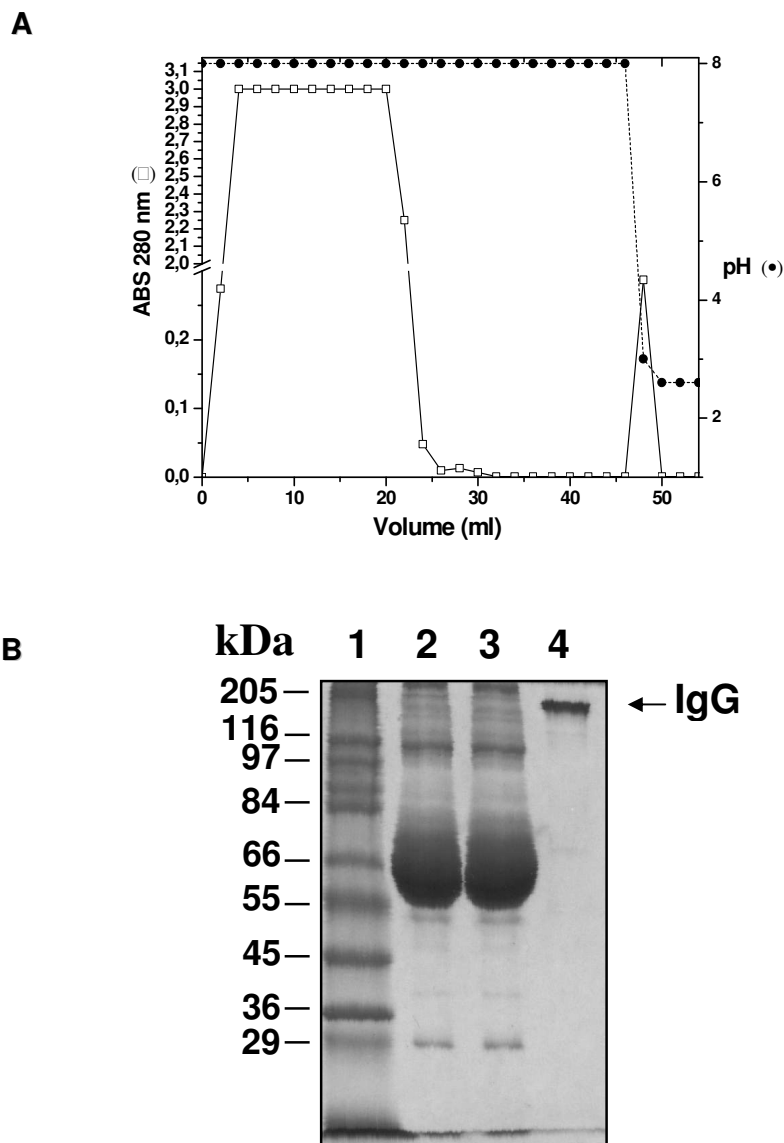


Figura 5. Purificação dos mAbs A3A4, A4D12 e 1B8 em resina de proteína G sepharose. (A) Cromatograma representativo da purificação dos mAbs A3A4, A4D12 e 1B8 em coluna de afinidade de proteína G-sepharose. O primeiro pico corresponde à fração aplicada (sobrenadante de cultura do respectivo hibridoma) e o segundo pico à fração purificada de IgG (mAb) obtida por eluição com tampão glicina (pH 2,6). (B) SDS-PAGE a 8% em condições não redutoras das frações representativas da purificação. Linha 1: padrão de massa molecular (em kDa); Linha 2: fração aplicada (sobrenadante de cultura do respectivo hibridoma); Linha 3: fração excluída da resina de proteína G-Sephareose (“void”); Linha 4: banda de IgG de camundongo purificada.

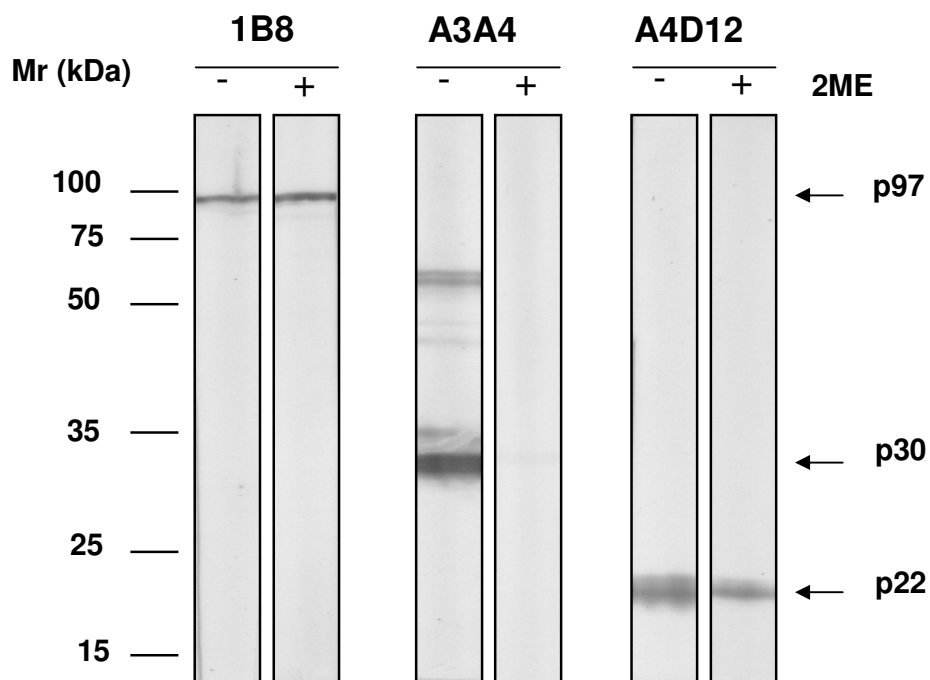


Figura 6. Immunoblotting de antígenos de *T. gondii* reconhecidos pelos mAbs 1B8, A3A4 e A4D12. Immunoblotting preparado com antígenos de lisados de taquizoítas de *T. gondii* (cepa RH) solubilizados em SDS, separados em SDS-PAGE a 10% na presença (+) ou ausência (-) de 2-mercaptoetanol (2ME) a 10% e sondados com os mAbs 1B8, A3A4 e A4D12. Os padrões de massa molecular (Mr) expressos em kiloDaltons (kDa) estão indicados à esquerda. As setas à direita indicam os antígenos reconhecidos pelos respectivos mAbs (p97, p30 e p22).

4.3 Imunolocalização dos antígenos reconhecidos pelos mAbs

Com o objetivo de investigar a localização celular dos antígenos reconhecidos pelos mAbs A3A4, A4D12 e 1B8, foi realizado um ensaio de imunolocalização por meio da técnica de imunofluorescência indireta usando taquizoítas intactos formolizados de *T. gondii* imobilizados em lâminas de vidro.

A Figura 7 demonstra que os mAbs A3A4 e A4D12 reagem fortemente com os taquizoítas de *T. gondii*, como evidenciado por uma fluorescência superficial linear. Por outro lado, a incubação dos taquizoítas com o mAb 1B8 revelou uma marcação granular heterogênea intracelular. Como controle negativo deste ensaio, taquizoítas foram incubados apenas com o diluente dos mAbs seguido da incubação com o conjugado fluorescente e, conforme observado na figura, nenhuma marcação foi evidenciada.

Estes resultados sugerem que os antígenos de 22 e 30/60 kDa reconhecidos pelos mAbs A4D12 e A3A4, respectivamente, estão localizados na superfície de taquizoítas de *T. gondii*, enquanto o antígeno de 97 kDa reconhecido pelo mAb 1B8 tem localização intracelular.

4.4. Inibição dos epítomos reconhecidos pelos mAbs A3A4, A4D12 e 1B8 por soros humanos

O reconhecimento dos antígenos p30, p22 e p97 pelos respectivos mAbs A3A4, A4D12 e 1B8 foi analisado em um ELISA de inibição para avaliar a habilidade destes mAbs em competir com um painel de soros humanos com perfis sorológicos para anticorpos IgG anti-*T. gondii* previamente determinados por ELISA indireto.

Conforme demonstrado na Tabela 1, soros positivos mostraram porcentagens de inibição do reconhecimento do antígeno p30 pelo mAb A3A4 variando de 32% a 57% (média = 42%; IC 95% = 36%-48%), enquanto os soros negativos mostraram taxas de inibição abaixo de 15% (média = 8%; IC 95% = 4%-11%). Com relação ao reconhecimento do antígeno p22 pelo mAb A4D12, uma maior variabilidade nas porcentagens de inibição (0% a 36%) foi observada para os soros positivos (média = 18%; IC 95% = 11% - 26%), enquanto os soros negativos exibiram porcentagens de inibição abaixo de 12% (média = 6%; IC 95% = 3% - 8%). De uma maneira similar, o reconhecimento do antígeno p97 pelo mAb 1B8 demonstrou porcentagens de inibição bastante variadas (0% a 31%) frente a soros positivos (média = 17%; IC 95% = 9% - 26%), enquanto os soros negativos exibiram taxas de inibição abaixo de 7% (média = 1%; IC 95% = 0% - 3%).

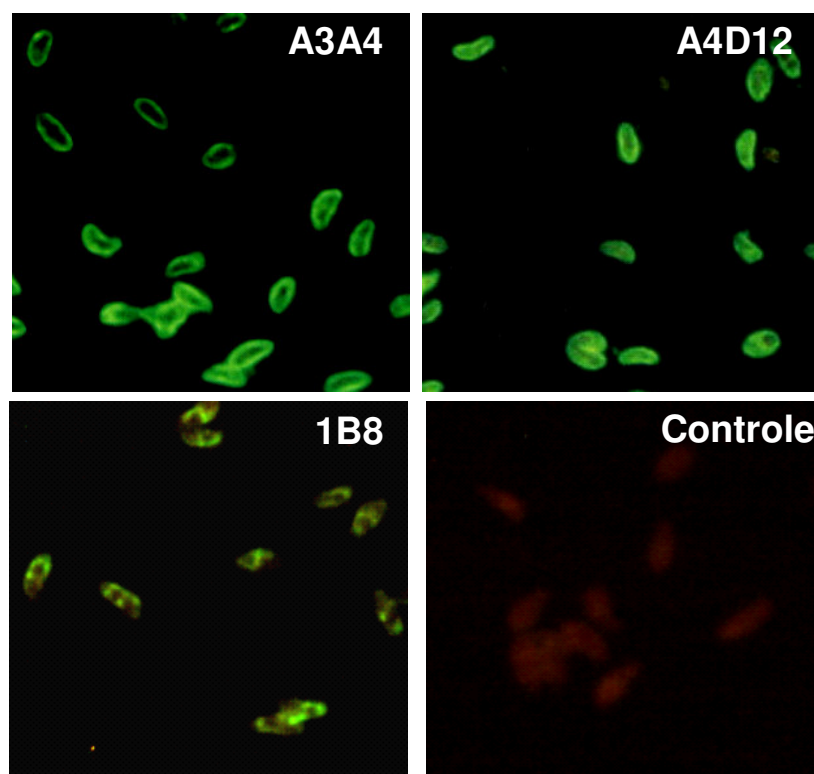


Figura 7. Imunolocalização dos antígenos p30, p22 e p97 em taquizoítas da cepa RH de *T. gondii*. Lâminas de imunofluorescência preparadas com taquizoítas intactos formolizados da cepa RH de *T. gondii* foram incubadas com os mAbs A3A4, A4D12 ou 1B8 e subsequentemente com o conjugado de cabra anti-IgG de camundongo marcado com FITC. As lâminas montadas com lamínulas e glicerina tamponada (pH 8,5) foram analisadas em microscópio de epifluorescência com aumento de 400X. As fotos foram feitas em filme *asa* 400 utilizando período de exposição de 2 minutos. O mAb utilizado em cada preparação ou o controle negativo realizado com a incubação dos taquizoítas com diluente está indicado no canto superior direito de cada imagem.

TABELA 1. Avaliação da habilidade de inibição dos epítomos de *Toxoplasma gondii* reconhecidos pelos anticorpos monoclonais A3A4 (anti-p30), A4D12 (anti-p22) e 1B8 (anti-p97) por soros humanos usando um ELISA de inibição.

Amostras de soro	IgG anti- <i>T. gondii</i> ^a (IE)	Perfil Sorológico	Inibição (%)		
			A3A4	A4D12	1B8
FR39	15,50	Positivo alto	32,34	0,00	0,00
RSM	12,62	Positivo alto	52,29	26,32	23,70
FR14	11,76	Positivo alto	40,51	7,67	2,20
FR17	11,00	Positivo alto	57,47	26,32	25,50
FR19	10,00	Positivo alto	48,95	36,39	22,70
FR24	8,32	Positivo médio	38,69	9,98	19,00
DFP	7,98	Positivo médio	44,07	20,90	29,40
FR26	6,18	Positivo médio	34,55	20,84	17,70
FR16	3,59	Positivo baixo	41,77	25,06	30,60
FR57	3,58	Positivo baixo	32,72	12,42	3,80
EAT	0,65	Negativo	3,41	4,66	0,00
FR170	0,64	Negativo	14,63	7,32	2,40
FR165	0,62	Negativo	0,00	0,00	0,00
FR166	0,60	Negativo	2,31	0,89	2,70
FR172	0,58	Negativo	8,37	8,20	0,00
FR173	0,57	Negativo	8,37	9,98	0,00
SCM	0,54	Negativo	6,89	4,66	7,40
FR177	0,53	Negativo	13,67	2,66	0,00
FR176	0,53	Negativo	8,85	6,21	0,00
LHY	0,51	Negativo	9,68	12,03	0,00

^a ELISA indireto para detecção de anticorpos IgG específicos a *T. gondii* foi realizado usando antígeno solúvel de *T. gondii* (STAg). Os níveis de anticorpos foram expressos em Índice ELISA (IE). Soros foram considerados positivos altos para IE > 10,0, positivos médios para 5,0 < IE < 10,0, positivos baixos para 1,2 < IE < 5,0, e negativos para IE < 1,2.

Os resultados obtidos por meio deste ensaio de inibição demonstraram que o mAb A3A4 mostrou uma capacidade de competição relativamente maior com soros humanos positivos para IgG anti-*T. gondii*, ao contrário do observado com os mAbs A4D12 e 1B8, que mostraram menor capacidade de competição. Isto sugere que os epítomos reconhecidos por estes mAbs, particularmente A3A4, pertencem a regiões imunodominantes do antígeno de *T. gondii*.

4.5 Distribuição das amostras de soros humanos de acordo com o perfil sorológico da infecção por *T. gondii*.

Antes da realização das reações de ELISA-mAbs , as amostras de soros humanos foram testadas e distribuídas em 4 grupos, de acordo com o perfil sorológico da infecção por *T. gondii*. A distribuição foi baseada nos resultados sorológicos obtidos por ELISA indireto para a detecção de anticorpos IgG específicos a *T. gondii* e por ELISA de captura para a detecção de anticorpos IgM e IgA específicos.

A Figura 8 apresenta os resultados sorológicos obtidos da distribuição das 175 amostras de soro utilizadas neste trabalho. A Figura 8A representa o Grupo I, constituído por 45 amostras de soro de pacientes com infecção recente por *T. gondii*, caracterizada por resultados positivos para anticorpos IgG, IgM e IgA específicos (G+M+A+). A Figura 8B representa o Grupo II, constituído por 40 amostras de soro de pacientes com infecção na fase de transição, caracterizada por resultados positivos para anticorpos IgG e IgM específicos, mas resultados negativos para anticorpos IgA (G+M+A-). A Figura 8C representa o Grupo III, constituído por 55 amostras de soro de pacientes com infecção crônica, caracterizada por resultados positivos para anticorpos IgG específicos, mas resultados negativos para anticorpos IgM e IgA (G+M-A-). A Figura 8D representa o Grupo IV, constituído por 35 amostras de soro de indivíduos não infectados por *T. gondii*, caracterizados por resultados negativos para anticorpos IgG, IgM e IgA específicos (G-M-A-).

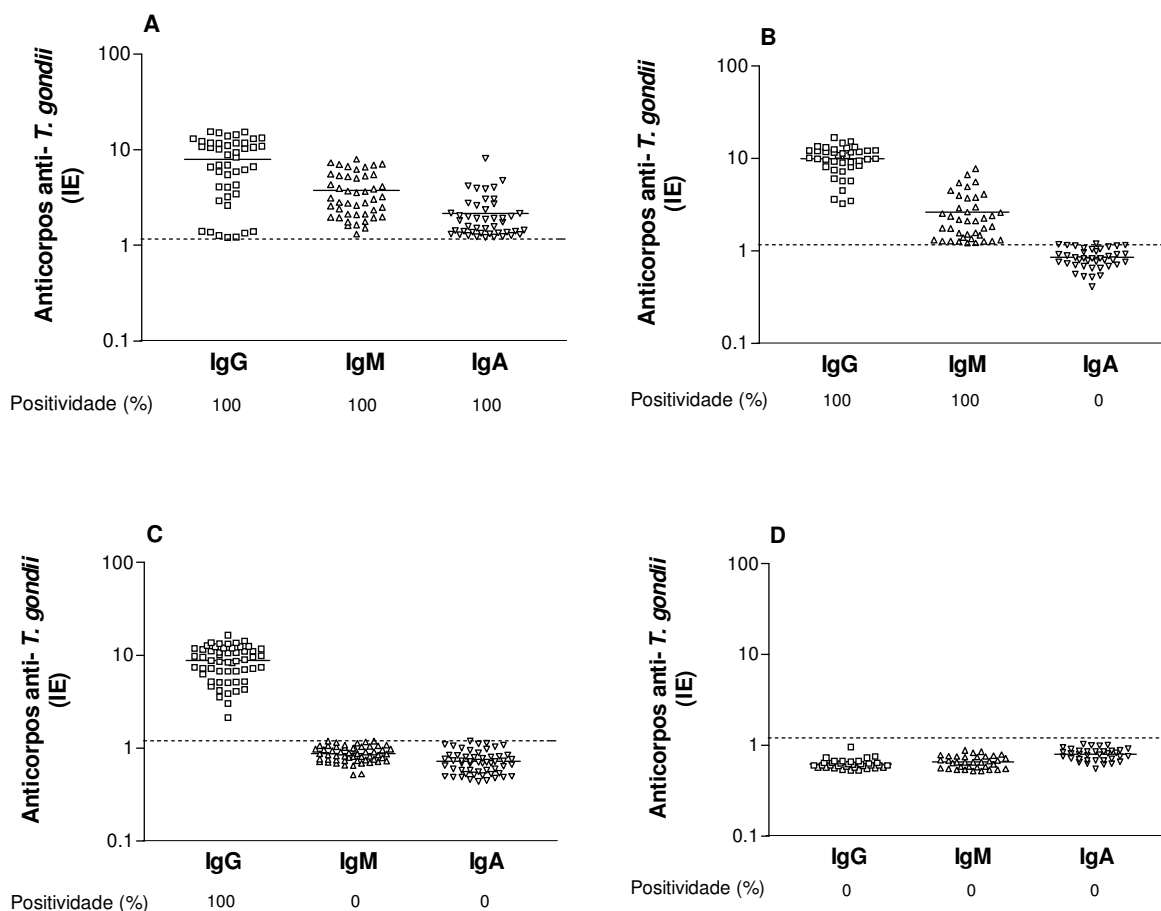


Figura 8. Distribuição das amostras de soro de acordo com o perfil sorológico da infecção por *T. gondii*. 175 amostras de soro foram caracterizadas sorologicamente usando ELISA indireto para a detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* e ELISA de captura para a detecção de anticorpos IgM e IgA específicos. **(A)** Grupo I, constituído por 45 amostras de soro de pacientes com infecção recente (G+M+A+); **(B)** Grupo II, constituído por 40 amostras de soro de pacientes com infecção na fase de transição (G+M+A-); **(C)** Grupo III, constituído por 55 amostras de soro de pacientes com infecção crônica (G+M-A-); **(D)** Grupo IV, constituído por 35 amostras de soro de indivíduos não infectados por *T. gondii* (G-M-A-). Os níveis de anticorpos estão expressos em Índice ELISA (IE), as linhas tracejadas indicam o valor de *cut off* (IE > 1,2) e as barras horizontais representam a média dos valores de IE. As taxas de positividade (%) também estão indicadas para cada ensaio.

4.6 Padronização da técnica ELISA-mAb

Para otimizar a técnica ELISA-mAb, foram analisadas inicialmente diferentes soluções bloqueadoras e concentrações do STAg. Para tanto, foram testados leite desnatado a 5% em PBS-T (PBS-TM) e soroalbumina bovina a 1% em PBS-T (PBS-T-BSA) como soluções bloqueadoras e concentrações de 20 µg/mL e 40 µg/mL para STAg. Além disso, um isotipo IgG irrelevante de camundongo foi testado como controle negativo dos mAbs para a sensibilização das placas. A Figura 9 apresenta os resultados obtidos desta padronização. Quando o mAb A3A4 foi avaliado em paralelo com o isotipo IgG irrelevante na sensibilização das placas para a detecção de anticorpos IgG específicos a *T. gondii*, observou-se que todas as amostras de soros positivas para IgG apresentaram altos valores de DO usando A3A4 e valores de DO abaixo do *cut off* (DO = 0.170) quando foi usado o isotipo IgG irrelevante. Estes resultados comprovam que os antígenos de *T. gondii* são retidos por ligação específica ao mAb A3A4 (Figura 9A). Como os valores de DO ficaram muito próximos do valor de *cut off* no teste usando o isotipo IgG irrelevante e STAg na concentração de 40 µg/mL, a concentração do antígeno a ser utilizada em todos os ensaios subsequentes foi estabelecida em 20 µg/mL. A solução PBS-TM mostrou um maior bloqueio de sítios não específicos que PBS-T-BSA, sendo utilizada em todos os demais ensaios (dados não mostrados).

Quando a detecção de todas as classes de anticorpos (IgG, IgM e IgA) específicos a *T. gondii* foi comparada pelo ELISA reverso usando os três mAbs e o isotipo IgG irrelevante em amostras de soros humanos positivas, demonstrou-se que os valores de DO obtidos com o isotipo irrelevante ficaram abaixo do valor de *cut off* para todas as classes de imunoglobulinas analisadas (Figura 9B).

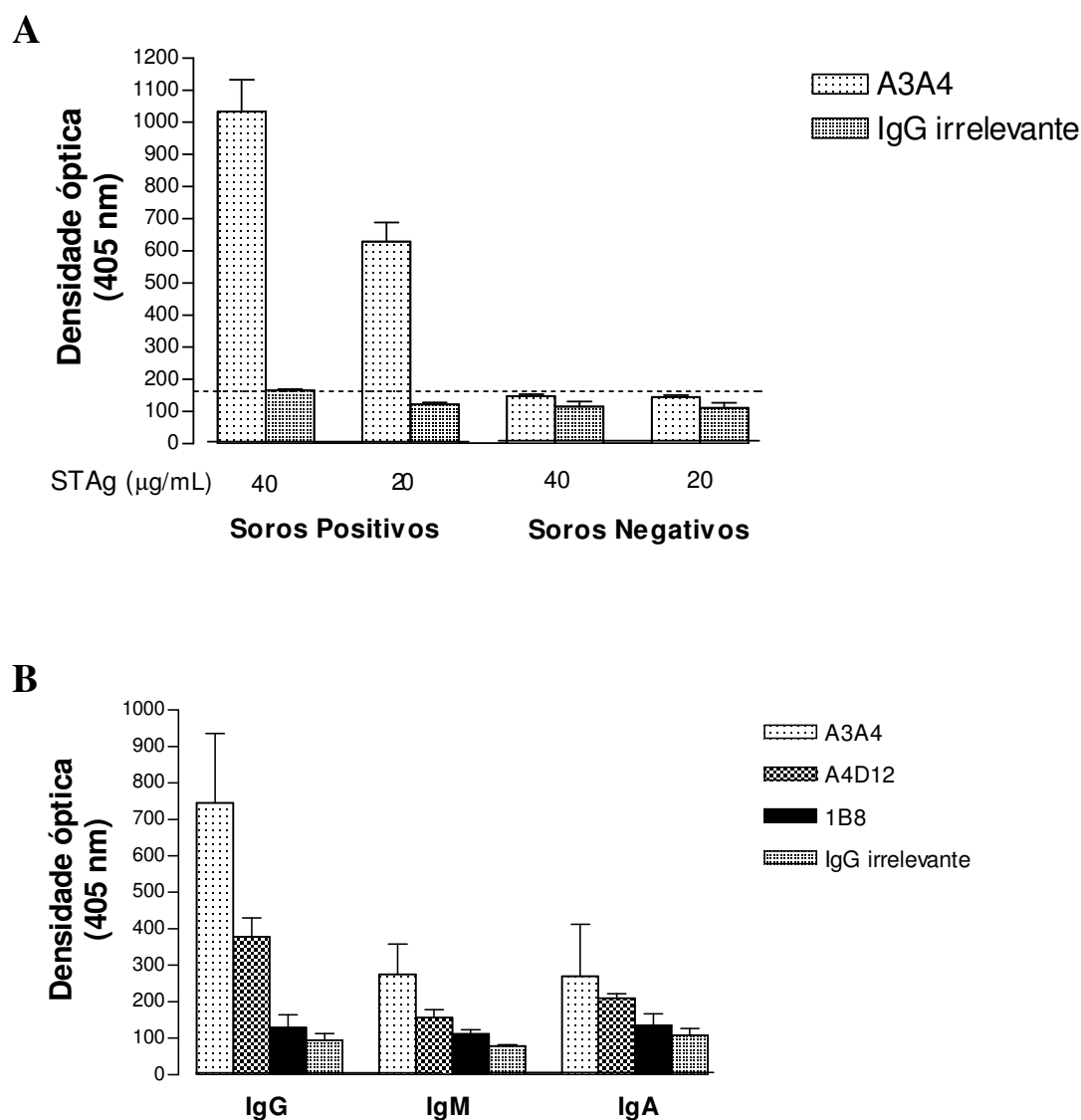


Figura 9. Padronização do ELISA reverso usando mAbs para detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*Toxoplasma gondii*. (A) ELISA reverso usando mAb A3A4 (10 µg/mL) ou IgG irrelevante (IgG1, *kappa* de camundongo; 10 µg/mL) e diferentes concentrações de antígeno solúvel de *T. gondii* (STAg; 20 ou 40 µg/mL) frente a soros humanos controles positivos (n=8) e negativos (n=3). A linha tracejada indica o valor de *cut off* (DO = 170). (B) ELISA reverso usando mAbs A3A4, A4D12, 1B8 ou IgG irrelevante (10 µg/mL) e STAg (20 µg/mL) frente a soros controles positivos (n =3) para a detecção de anticorpos IgG, IgM ou IgA anti-*T. gondii*.

4.7 Detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* por ELISA-mAbs em comparação com ELISA-STAg

Os níveis de anticorpos IgG anti-*T. gondii* obtidos por ELISA indireto usando STAg (ELISA-STAg) para cada um dos grupos de amostras de soro humano foram comparados com os níveis detectados por ELISA reverso usando mAbs (ELISA-mAbs).

Pela análise da Figura 10, observou-se que, nos três grupos de amostras de soro com resultados positivos para anticorpos IgG anti-*T. gondii* (Grupos I, II e III), houve uma concordância total nas taxas de positividade entre os resultados obtidos pelo ELISA-STAg e os ELISA-mAbs A3A4 e A4D12, com 100% de positividade para todos os ensaios (Figuras 10A, 10B e 10C). Porém, quando o mAb 1B8 foi utilizado nos ensaios de ELISA reverso, as porcentagens de positividade foram significativamente menores, variando de 60% a 70% nos três grupos de amostras de soro ($p < 0,0001$). No grupo IV, constituído por amostras soronegativas para anticorpos IgG anti-*T. gondii*, todos os ELISA-mAbs mostraram total concordância de resultados negativos (Figura 10D).

Analisando os níveis de anticorpos IgM anti-*T. gondii* determinados por ELISA-STAg and ELISA-mAbs (Figura 11), nenhuma diferença significativa foi encontrada nas porcentagens de soropositividade dos grupos constituídos por amostras de soro positivas para IgM (Grupos I e II) por meio dos ELISA-mAbs A3A4 e A4D12 (Figuras 11A e 11B). Porém, observou-se que o ELISA-mAb A3A4 apresentou uma tendência em detectar maior número de amostras positivas para IgM (38%) em comparação com o ELISA-mAb A4D12 (27,5%). Para a detecção de anticorpos IgM, o ELISA-mAb 1B8 exibiu taxas de positividade significativamente menores (4,4%; $p = 0,0042$) no grupo I (Figura 11A). Nos grupos com amostras positivas apenas para anticorpos IgG (Grupo III; Figura 11C) e com amostras negativas para todas as classes de imunoglobulinas (Grupo IV; Figura 11D), a porcentagem de soropositividade para anticorpos IgM foi abaixo de 11% em todos os ensaios. Deve-se notar que o ELISA-STAg para a detecção de anticorpos IgM específicos mostrou baixa habilidade em detectar anticorpos IgM nos grupos com infecção recente (31%; Figura 11A) e com infecção na fase de transição (10%; Figura 11B), previamente definidos como positivos para anticorpos IgM por meio do ELISA de captura.

Com relação aos níveis de anticorpos IgA anti-*T. gondii* (Figura 12), foi verificado que o ELISA-STAg apresentou taxas de positividade significativamente maiores (78%)

que as observadas pelo ELISA- mAb A3A4 (38%; $p = 0,0006$) ou 1B8 (29%; $p = 0,0001$) no grupo com infecção recente (Grupo I). Isto não foi observado no ELISA- mAb A4D12, que apresentou uma taxa de positividade de 60% (Figura 12A). Porém, nos grupos com infecção na fase de transição (Grupo II; Figura 12B) e com infecção crônica (Grupo III; Figura 12C), previamente definidos como soronegativos para anticorpos IgA específicos, os ELISA-mAbs A3A4 e 1B8 exibiram taxas de positividade significativamente menores (12% a 25%) que aquelas exibidas pelo ELISA-STAg (50% a 55%) ($p < 0,05$). No grupo com amostras soronegativas (Grupo IV; Figura 12D), nenhuma diferença significativa foi encontrada com relação às taxas de positividade (<15%) para anticorpos IgA em todos os ensaios.

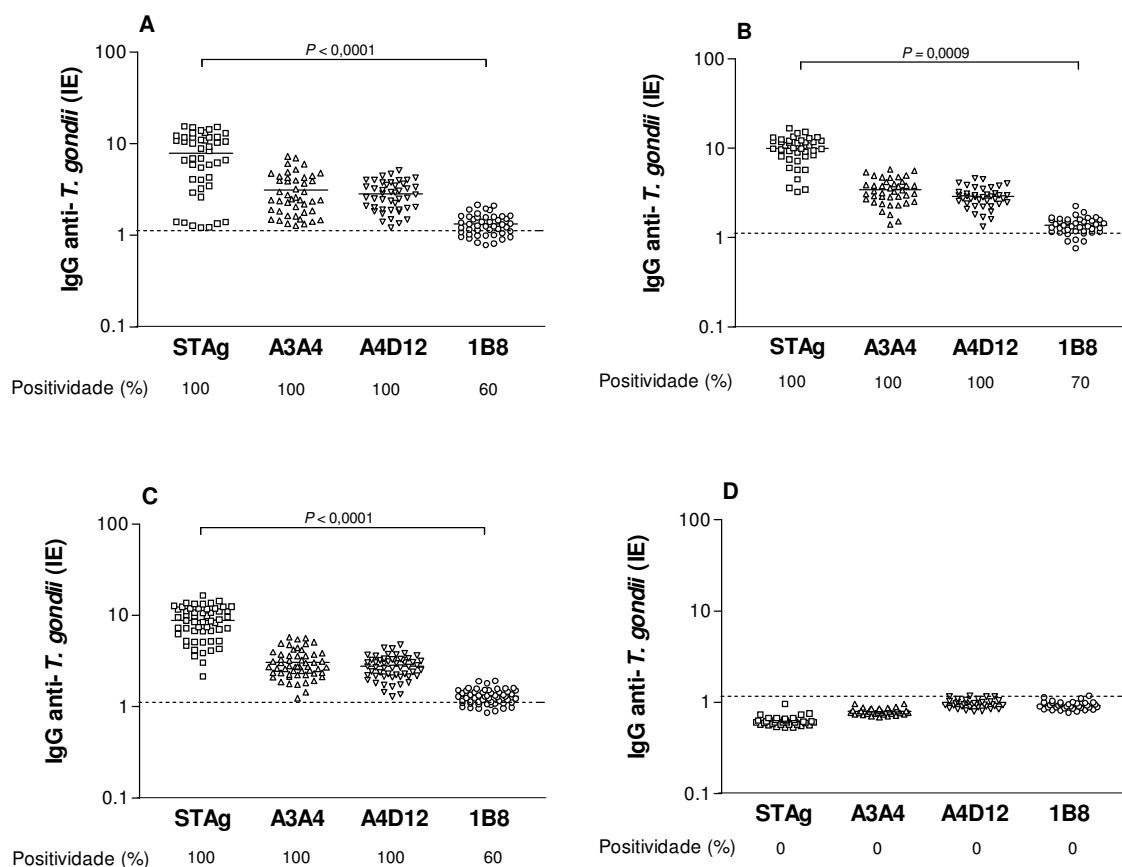


Figura 10. Detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* pelo ELISA indireto usando STAg (ELISA-STAg) e pelo ELISA reverso usando os mAbs A3A4, A4D12 e 1B8 (ELISA-mAbs). Os níveis de anticorpos IgG anti-*T. gondii* foram determinados por ELISA-STAg e ELISA-mAB nos quatro grupos de soros humanos previamente selecionados. **(A)** Grupo I, constituído por 45 amostras de soro de pacientes com infecção recente (G+M+A+); **(B)** Grupo II, constituído por 40 amostras de soro de pacientes com infecção na fase de transição (G+M+A-); **(C)** Grupo III, constituído por 55 amostras de soro de pacientes com infecção crônica (G+M-A-); **(D)** Grupo IV, constituído por 35 amostras de soro de indivíduos não infectados por *T. gondii* (G-M-A-). Os níveis de anticorpos estão expressos em Índice ELISA (IE), as linhas tracejadas indicam o valor de *cut off* (IE > 1,2) e as barras horizontais representam a média dos valores de IE. As taxas de positividade (%) também estão indicadas para cada ensaio.

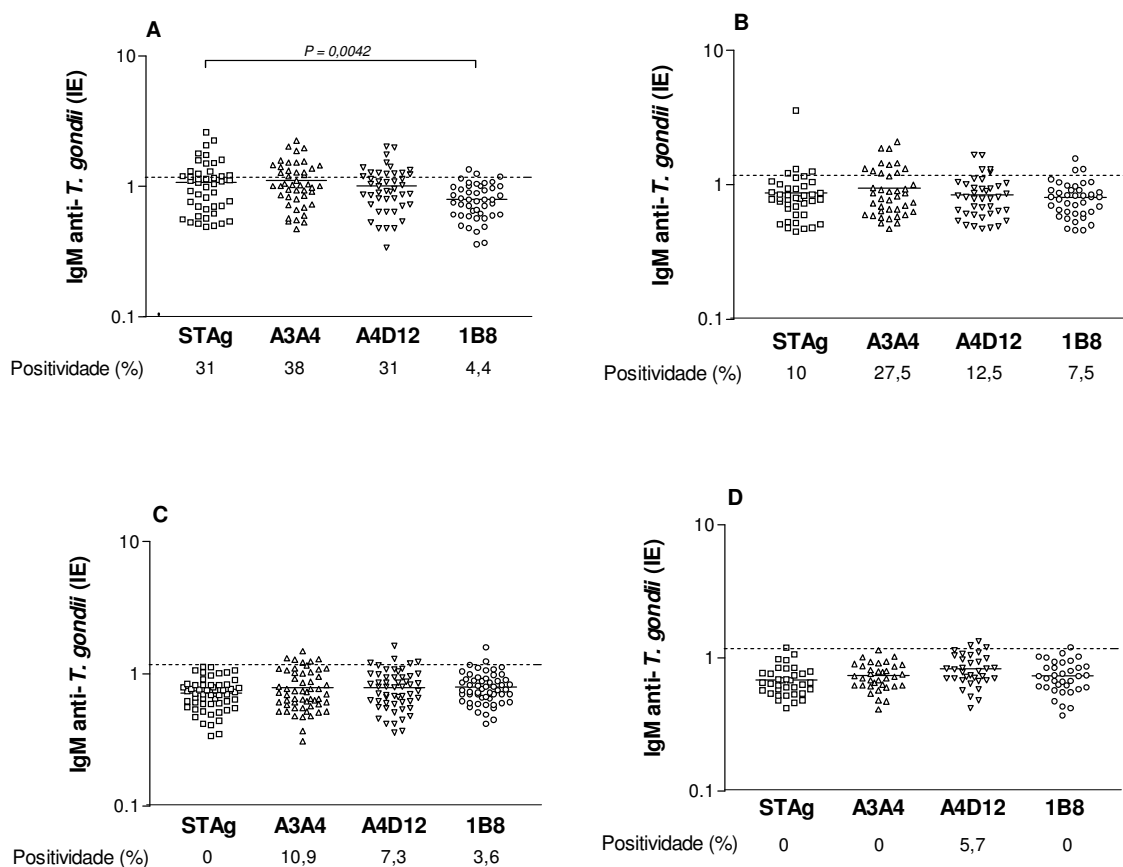


Figura 11. Detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii* pelo ELISA indireto usando STAg (ELISA-STAg) e pelo ELISA reverso usando os mAbs A3A4, A4D12 e 1B8 (ELISA-mAbs). Os níveis de anticorpos IgM anti-*T. gondii* foram determinados por ELISA-STAg e ELISA-mAbs nos quatro grupos de soros humanos previamente selecionados. **(A)** Grupo I, constituído por 45 amostras de soro de pacientes com infecção recente (G+M+A+); **(B)** Grupo II, constituído por 40 amostras de soro de pacientes com infecção na fase de transição (G+M+A-); **(C)** Grupo III, constituído por 55 amostras de soro de pacientes com infecção crônica (G+M-A-); **(D)** Grupo IV, constituído por 35 amostras de soro de indivíduos não infectados por *T. gondii* (G-M-A-). Os níveis de anticorpos estão expressos em Índice ELISA (IE), as linhas tracejadas indicam o valor de *cut off* (IE > 1,2) e as barras horizontais representam a média dos valores de IE. As taxas de positividade (%) também estão indicadas para cada ensaio.

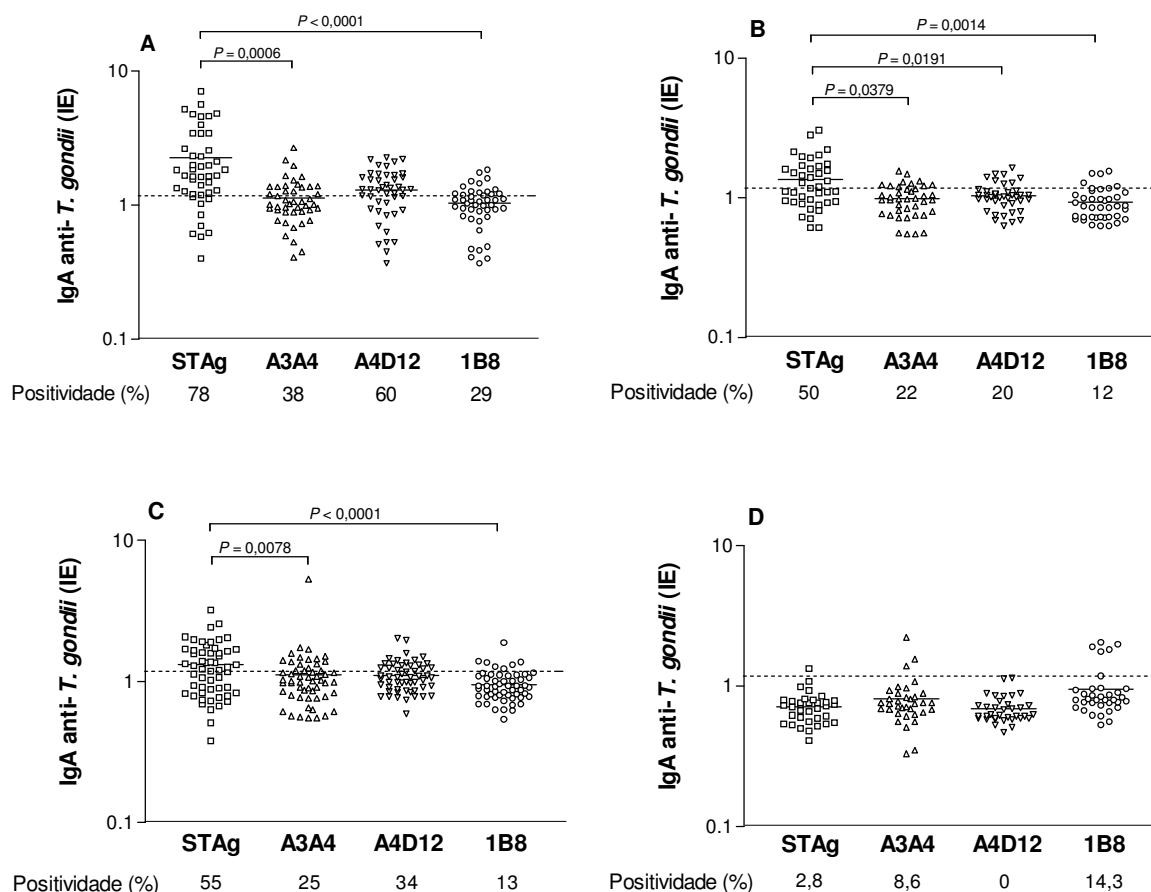


Figura 12. Detecção de anticorpos IgA específicos a *T. gondii* pelo ELISA indireto usando STAg (ELISA-STAg) e pelo ELISA reverso usando os mAbs A3A4, A4D12 e 1B8 (ELISA-mAbs). Os níveis de anticorpos IgA anti-*T. gondii* foram determinados por ELISA-STAg e ELISA-mAbs nos quatro grupos de soros humanos previamente selecionados. **(A)** Grupo I, constituído por 45 amostras de soro de pacientes com infecção recente (G+M+A+); **(B)** Grupo II, constituído por 40 amostras de soro de pacientes com infecção na fase de transição (G+M+A-); **(C)** Grupo III, constituído por 55 amostras de soro de pacientes com infecção crônica (G+M-A-); **(D)** Grupo IV, constituído por 35 amostras de soro de indivíduos não infectados por *T. gondii* (G-M-A-). Os níveis de anticorpos estão expressos em Índice ELISA (IE), as linhas tracejadas indicam o valor de *cut off* (IE > 1,2) e as barras horizontais representam a média dos valores de IE. As taxas de positividade (%) também estão indicadas para cada ensaio.

4.8 Correlação entre os resultados obtidos por ELISA-mAbs e ELISA-STAg

Correlações entre os resultados obtidos por ELISA-mAbs e ELISA-STAg para as diferentes classes de anticorpos (IgG, IgM e IgA) anti-*T. gondii* foram realizadas respectivamente com todas as amostras IgG soropositivas (Grupos I, II e III), amostras IgM soropositivas (Grupos I e II) e amostras IgA soropositivas (Grupo I).

Houve uma forte e significativa correlação positiva entre os níveis de IgG anti-STAg e os níveis de IgG anti-p30 (Figura 13A) ou anti-p22 (Figura 13B), com 100% de amostras duplo-positivas. Porém, uma correlação positiva moderada foi encontrada entre os níveis de IgG anti-STAg e anti-p97 (Figura 13C), com 37% das amostras de soro com resultados positivos somente para IgG anti-STAg ($p < 0,0001$).

Para anticorpos IgM anti-*T. gondii*, fortes correlações positivas foram observadas em todos os ensaios, particularmente para IgM anti-p22, que mostrou porcentagens similares de amostras positivas unicamente para IgM anti-STAg (5%) e positivas somente para IgM anti-p22 (6%) (Figura 14B). Porém, foram encontradas porcentagens significativamente maiores de amostras positivas somente para IgM anti-p30 (15%; $p = 0,0120$) (Figura 14A) e significativamente menores de amostras positivas apenas para IgM anti-p97 (1%; $p = 0,0037$) (Figura 14C).

Para anticorpos IgA anti-*T. gondii*, a maior correlação positiva foi observada para anticorpos IgA anti-p22 (Figura 15B), com 60% de amostras duplo-positivas, apesar de 18% das amostras terem apresentado resultado positivo somente para anticorpos IgA anti-STAg ($p = 0,0124$). Porém, IgA anti-p30 (Figura 15A) e IgA anti-p97 (Figura 15C) mostraram porcentagens significativamente menores de amostras duplo-positivas (36% e 29%, respectivamente), com um número considerável de amostras positivas apenas para IgA anti-STAg (42% e 49%, respectivamente) ($p < 0,0001$).

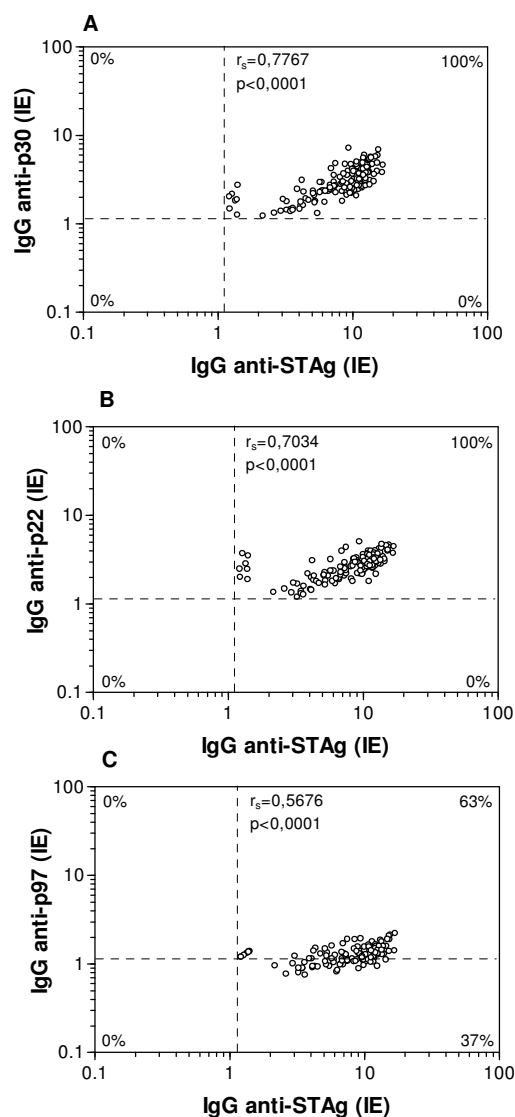


Figura 13. Correlação entre os níveis de anticorpos IgG anti-*T. gondii* detectados por ELISA reverso usando monoclonais (ELISA-mAbs) e ELISA indireto usando STAg (ELISA-STAg). Um total de 140 amostras soropositivas para anticorpos IgG anti-*T. gondii* (Grupos I, II e III) foi analisado por ELISA-STAg e os níveis de anticorpos obtidos foram comparados com aqueles obtidos por ELISA-mAbs: **(A)** A3A4 (anti-p30); **(B)** A4D12 (anti-p22); e **(C)** 1B8 (anti-p97). Os coeficientes de correlação (r_s) foram calculados pelo teste de correlação de Spearman. As linhas tracejadas indicam os valores de *cut off* (IE > 1,2) para cada ensaio. As porcentagens de amostras duplo-positivas, duplo-negativas e positivas para apenas um ensaio estão indicadas nos cantos de cada quadrante.

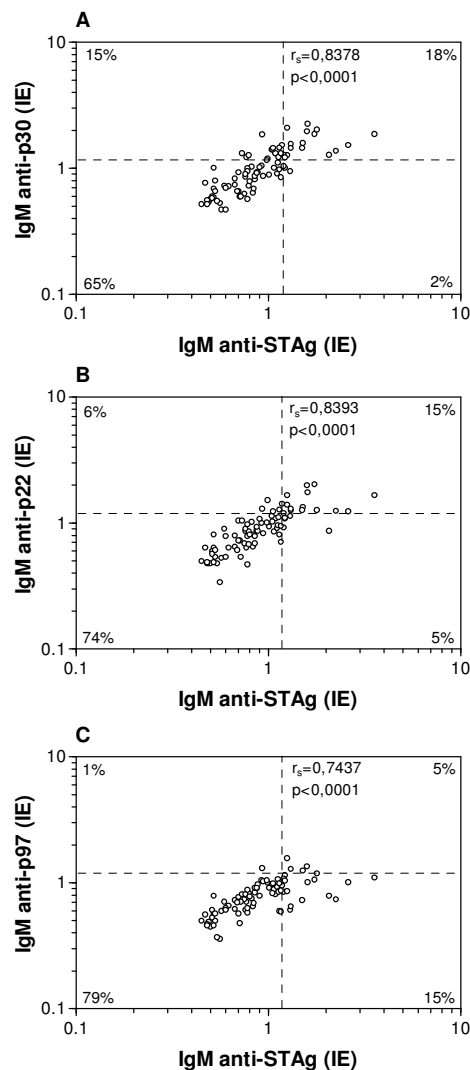


Figura 14. Correlação entre os níveis de anticorpos IgM anti-*T. gondii* detectados por ELISA reverso usando monoclonais (ELISA-mAbs) e ELISA indireto usando STAg (ELISA-STAg). Um total de 85 amostras soropositivas para anticorpos IgM anti-*T. gondii* (Grupos I e II) foi analisado por ELISA-STAg e os níveis de anticorpos obtidos foram comparados com aqueles obtidos por ELISA-mAbs: **(A)** A3A4 (anti-p30); **(B)** A4D12 (anti-p22); e **(C)** 1B8 (anti-p97). Os coeficientes de correlação (r_s) foram calculados pelo teste de correlação de Spearman. As linhas tracejadas indicam os valores de *cut off* (IE > 1,2) para cada ensaio. As porcentagens de amostras duplo-positivas, duplo-negativas e positivas para apenas um ensaio estão indicadas nos cantos de cada quadrante.

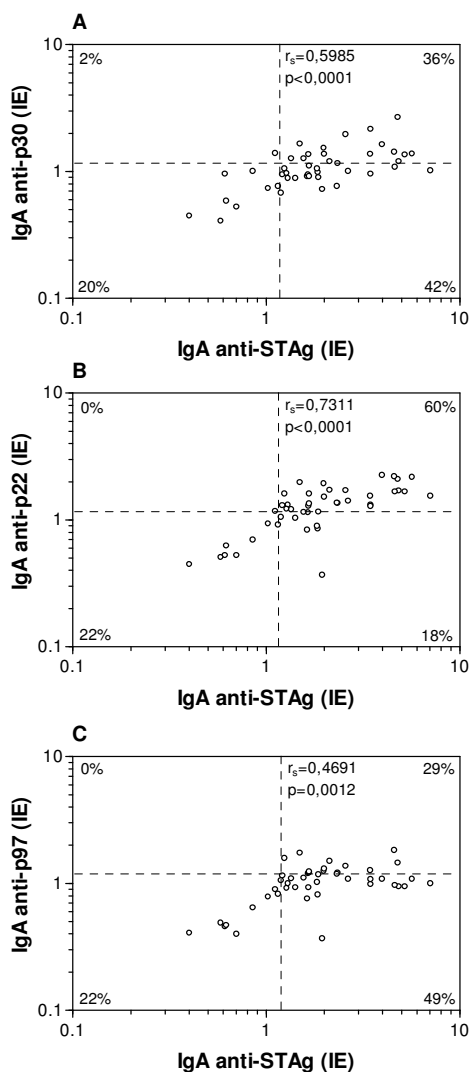


Figura 15. Correlação entre os níveis de anticorpos IgA anti-*T. gondii* detectados pelo ELISA reverso usando monoclonais (ELISA-mAbs) e ELISA indireto usando STAg (ELISA-STAg). Um total de 35 amostras soropositivas para anticorpos IgA anti-*T. gondii* (Grupo I) foi analisado por ELISA-STAg e os níveis de anticorpos obtidos foram comparados com aqueles obtidos por ELISA-mAbs: **(A)** A3A4 (anti-p30); **(B)** A4D12 (anti-p22); e **(C)** 1B8 (anti-p97). Os coeficientes de correlação (r_s) foram calculados pelo teste de correlação de Spearman. As linhas tracejadas indicam os valores de *cut off* (IE > 1,2) para cada ensaio. As porcentagens de amostras duplo-positivas, duplo-negativas e positivas para apenas um ensaio estão indicadas nos cantos de cada quadrante.

4.9 ELISA-mAbs em grupos sorologicamente atípicos

Durante os ensaios de triagem das amostras de soro utilizadas neste trabalho, foram encontradas algumas amostras cujos perfis sorológicos permitiram sua distribuição em dois grupos sorologicamente atípicos: um grupo de 4 amostras de soros com resultados negativos para anticorpos IgG anti-*T. gondii*, mas com resultados positivos para anticorpos IgM e IgA específicos (G-M+A+); e outro grupo de 4 amostras de soro com resultados negativos para anticorpos IgM anti-*T. gondii*, mas com resultados positivos para anticorpos IgG e IgA específicos (G+M-A+).

Os resultados obtidos por ELISA-STAg e ELISA-mAbs A3A4, A4D12 e 1B8 nestes dois grupos de amostras de soro estão apresentados na Tabela 2. Um achado interessante foi a detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* por ELISA-mAbs A3A4 e A4D12 nas amostras do primeiro grupo (G-M+A+) que foram soronegativas para IgG por ELISA-STAg. Com relação ao segundo grupo de amostras (G+M-A+), houve total concordância entre os resultados obtidos por ELISA-mAbs e ELISA-STAg para as três classes de imunoglobulinas analisadas.

TABELA 2. Níveis de anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*Toxoplasma gondii* determinados por ELISA indireto usando STAg (ELISA-STAg) ou por ELISA reverso usando anticorpos monoclonais (ELISA-mAbs) A3A4, A4D12 e 1B8 em dois grupos atípicos de soros humanos.

Amostras de soro	IgG anti- <i>T. gondii</i> ^a				IgM anti- <i>T. gondii</i> ^a				IgA anti- <i>T. gondii</i> ^a			
	STAg	A3A4	A4D12	1B8	STAg	A3A4	A4D12	1B8	STAg	A3A4	A4D12	1B8
G-M+A+^b												
FR2	1,06	1,55	2,11	1,06	1,77	1,38	1,09	0,74	3,73	2,76	4,64	1,63
FR3	0,96	1,06	1,31	0,96	1,63	1,56	1,05	0,79	2,90	1,24	1,63	0,72
FR7	1,04	1,70	1,99	1,04	2,40	1,73	1,31	4,68	2,32	1,26	1,07	1,36
FR10	0,94	1,58	1,91	0,94	0,96	0,83	1,17	0,72	2,13	1,06	1,57	1,01
G+M-A+^c												
FR100	10,42	4,12	3,12	1,45	0,79	0,82	0,86	0,79	2,12	1,53	1,37	1,22
FR104	11,76	4,68	3,54	1,35	0,56	0,55	0,73	0,84	1,53	1,26	1,30	1,04
FR109	8,72	2,91	2,60	1,44	0,41	0,64	0,87	0,76	1,52	1,42	1,83	1,74
FR158	7,28	4,88	4,00	1,63	0,42	0,44	0,64	0,36	0,42	0,38	0,40	0,40

^a Níveis de anticorpos estão expressos em Índice ELISA (IE). Valores de IE considerados positivos (IE > 1,2) estão indicados em negrito.

^b G-M+A+: amostras de soro negativas para anticorpos IgG anti-*T. gondii* e positivas para anticorpos IgM e IgA específicos, conforme determinado por ensaios sorológicos convencionais.

^c G+M-A+: amostras de soro negativas para anticorpos IgM anti-*T. gondii* e positivas para anticorpos IgG e IgA específicos, conforme determinado por ensaios sorológicos convencionais.

5. DISCUSSÃO

Em função da importância médica e epidemiológica que apresenta, a infecção por *T. gondii* ganhou papel de destaque nas ciências médicas e biológicas, principalmente a partir da década de 80, com o advento da AIDS. Deste modo, o diagnóstico rápido e preciso da infecção torna-se uma ferramenta de extrema utilidade no manejo da doença, evitando maiores prejuízos e consequências mais graves ao paciente.

Como a toxoplasmose apresenta um curso clínico assintomático na grande maioria dos indivíduos imunocompetentes infectados, a preocupação com a infecção é mais intensa em alguns grupos especiais de pacientes. Dentre estes, estão indivíduos imunocomprometidos (portadores do vírus HIV e pacientes em uso de drogas imunossupressoras), mulheres grávidas que adquirem uma infecção primária durante a gestação e crianças e recém-nascidos que adquirem a infecção de forma congênita (REMINGTON; THULLIEZ; MONTOYA, 2004).

Muitos têm sido os avanços alcançados nos últimos anos com relação ao diagnóstico da toxoplasmose. Porém, como se trata de uma infecção com características crônicas, um diagnóstico positivo não permite avaliar se o paciente apresenta uma infecção adquirida recentemente ou mais tardiamente. Portanto, mais importante que determinar se um indivíduo está infectado, é avaliar quando ele se tornou infectado, principalmente em casos de gestantes e recém-nascidos (MONTOYA; LIESENFELD; 2004).

O diagnóstico da toxoplasmose é baseado principalmente na detecção de anticorpos específicos ao parasita em amostras de soro de pacientes, por meio das mais variadas técnicas sorológicas, que variam desde o teste do corante de Sabin-Feldman (desenvolvido em 1948) até as mais recentes técnicas imunoenzimáticas (SUKTHANA, 2006).

Por meio da utilização destas técnicas sorológicas, a definição da fase da infecção vem sendo realizada com base em critérios definidos pela detecção de marcadores sorológicos específicos. Um importante passo para a definição destes critérios foi apresentado por Camargo e colaboradores (1978), em que foi proposto que o principal marcador de infecção recente por *T. gondii* é a detecção de anticorpos IgM específicos em paralelo com uma rápida ascensão de anticorpos IgG, enquanto o principal marcador de infecção crônica é a detecção de anticorpos IgG em baixos títulos, na ausência de

anticorpos IgM específicos. Estes critérios foram ampliados por meio do desenvolvimento de novas técnicas sorológicas, levando à inclusão da presença de anticorpos IgA como importante marcador da infecção recente, além da valiosa contribuição dos testes para avaliação da avidez de anticorpos IgG específicos (CAMARGO et al., 1991).

Porém, a detecção destes anticorpos específicos utilizados como marcadores das fases da infecção encontra algumas dificuldades, quando realizada por meio dos testes sorológicos convencionais disponíveis. Uma das maiores dificuldades enfrentadas é o grande número de resultados falso-positivos e falso-negativos encontrados, principalmente com relação à detecção de anticorpos IgM e IgA específicos a *T. gondii*. Isto ocorre, respectivamente, em virtude da persistência altamente variável destas imunoglobulinas no soro do paciente e da baixa sensibilidade das técnicas utilizadas (SENSINI, 2006).

Deste modo, as pesquisas atuais buscam o desenvolvimento de técnicas que permitam a detecção de outras classes de imunoglobulinas específicas, tais como IgE e subclasses de IgG, bem como a aquisição de conhecimentos a respeito da estrutura antigênica e genômica de *T. gondii*, de forma a permitir o estabelecimento de novos marcadores da infecção (FOUDRINIER et al., 2003; CONTINI et al., 2006). No que diz respeito às técnicas sorológicas clássicas, as investigações têm sido conduzidas no sentido de aumentar a especificidade e a sensibilidade dos procedimentos, levando a uma maior confiabilidade nos resultados obtidos. Desta forma, novas preparações antigênicas e novos desenhos experimentais de ensaios têm sido investigados.

Neste contexto, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a viabilidade da utilização de três anticorpos monoclonais em um ELISA reverso (ELISA-mAbs) para a detecção de anticorpos das classes IgG, IgM e IgA reativos aos antígenos p30, p22 e p97 de *T. gondii* em amostras de soro humano de pacientes em diferentes estágios de infecção. Os resultados alcançados por meio desta técnica foram comparados com aqueles obtidos por meio do ELISA indireto clássico usando STAg (ELISA-STAg).

Nossos dados demonstraram que o mAb A3A4 reconhece um componente de massa molecular de 30 kDa (p30) presente na superfície de taquizoítas de *T. gondii*. Conforme demonstrado por Cunha-Júnior (2005) em um estudo de mapeamento de epítomos por meio da técnica de biblioteca de fagos (*phage display*), este mAb reconhece um motivo de aminoácidos PSWW-VI, cuja análise em bases de dados

resultou em alinhamento com seqüências dos antígenos SAG1 e/ou dos antígenos da superfamília SRS (seqüências relacionadas à SAG1). Por meio de *immunoblotting* de antígenos de lisados de *T. gondii* tratados ou não com 2-mercaptoetanol, ficou comprovado também que o mAb A3A4 reconhece um epítipo conformacional, pois o tratamento com o agente redutor aboliu completamente a reatividade do mAb ao componente de 30 kDa. Isto pode ser explicado porque 2-mercaptoetanol destrói as pontes dissulfeto que mantêm os epítipos conformacionais da estrutura secundária dos antígenos do parasita.

Curiosamente, o mAb A3A4 reconhece também um componente de 60 kDa em condições não redutoras, mas não o reconhece mediante tratamento com 2-mercaptoetanol. Este fato também foi observado por He e colaboradores (2002) com um anticorpo monoclonal específico ao antígeno SAG1, o qual reconhecia epítipos conformacionais de SAG1 na forma monomérica (p30) e na forma dimérica (p60). Em função da similaridade de resultados, fica claro que o mAb A3A4 reconhece um epítipo conformacional presente na forma monomérica ou dimérica de antígenos de 30 kDa da superfamília SRS, possivelmente SAG1, o principal antígeno de superfície de *T. gondii* (MINEO et al. 1993; LEKUTIS et al., 2001).

O mAb A4D12 reconhece um componente com massa molecular de 22 kDa (p22) também presente na superfície de taquizoítas de *T. gondii*. Por meio de mapeamento de epítipos pela técnica da biblioteca de fagos, Cunha-Júnior (2005) demonstrou que este mAb reconhece um motivo de aminoácidos DGGSA, cuja análise em bases de dados resultou em alinhamento com seqüências do antígeno SAG2A, outro importante antígeno de superfície de *T. gondii*. Por meio de *immunoblotting* de antígenos de lisados de *T. gondii* tratados ou não com 2-mercaptoetanol, ficou comprovado que, diferentemente do mAb A3A4, o mAb A4D12 reconhece um epítipo linear, pois o tratamento antigênico com agente redutor não interferiu na reatividade deste mAb ao componente de 22 kDa. Resultados similares a estes foram encontrados em estudos com outros anticorpos monoclonais anti-p22 (COUVREUR et al., 1988; PARMLEY et al., 1994).

Por outro lado, o mAb 1B8 reconhece um componente intracelular de 97 kDa (p97) e, assim como A4D12, também reconhece um epítipo linear, pois o tratamento antigênico com agente redutor não interferiu na sua reatividade a este antígeno. Estes resultados estão em concordância com aqueles obtidos para este mesmo mAb em estudos prévios (MINEO; KHAN; KASPER, 1994).

Os resultados obtidos por meio de um ELISA de inibição, em que soros humanos com resultados positivos para anticorpos IgG anti-*T. gondii* foram utilizados para competir com os mAbs pela ligação a seus respectivos antígenos, demonstraram que o mAb A3A4 apresenta maior capacidade de competição. Neste ensaio, os soros positivos mostraram porcentagens relativamente elevadas de inibição, em contraposição às baixas porcentagens de inibição exibidas pelos soros negativos. Por outro lado, os mAbs A4D12 e 1B8 mostraram menores capacidades de competição, conforme evidenciado pelas baixas e variadas porcentagens de inibição obtidas com os soros positivos. Estes dados de inibição observados com o mAb A3A4 são similares aos observados por Graille e colaboradores (2005), que avaliaram as propriedades imunológicas de um anticorpo monoclonal anti-p30 seguindo um protocolo similar de inibição e verificaram altas porcentagens de inibição com os soros positivos. Como o mAb A3A4 parece reconhecer um epítipo na região imunodominante do antígeno SAG1 de *T. gondii*, os resultados obtidos neste teste de inibição sugerem que este mAb é representativo da resposta imune humoral anti-*Toxoplasma* em humanos.

Tendo em vista as propriedades imunológicas apresentadas por estes mAbs, a viabilidade de sua utilização em ensaios imunoenzimáticos foi testada para a detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* em amostras de soro humano. Neste ELISA, os mAbs foram utilizados separadamente como o primeiro anticorpo fixado às placas de microtitulação de poliestireno para a captura das respectivas moléculas presentes no antígeno solúvel de *T. gondii* (STAg) e posterior incubação com as amostras de soro humano previamente selecionadas. Em virtude deste desenho experimental, este ensaio foi denominado ELISA reverso ou ELISA-mAb, pois não utiliza preparações antigênicas para a sensibilização das placas e sim, ao contrário, preparações purificadas de anticorpos monoclonais. As amostras de soro foram previamente selecionadas com base nos resultados obtidos por meio do ELISA indireto para IgG (ELISA-STAg) e do ELISA de captura para IgM e IgA e distribuídas em grupos de acordo com os critérios estabelecidos por Camargo e colaboradores (1978).

Nos testes para a detecção de anticorpos IgG por meio dos ELISA-mAbs A3A4 e A4D12, foi verificada uma concordância total nas porcentagens de positividade (100%) em todos os grupos de amostras IgG-soropositivas, em comparação com os resultados obtidos por ELISA-STAg. Porém, as taxas de positividade obtidas pelo ELISA-mAb 1B8 foram significativamente menores (60% a 70%) nos três grupos de amostras IgG-soropositivas. Com relação às amostras soronegativas, houve uma total concordância de

resultados negativos entre ELISA-mAbs ELISA-STAg.Com relação à detecção de anticorpos IgM, nenhuma diferença significativa nas porcentagens de positividade dos grupos de amostras IgM-soropositivas foi encontrada entre ELISA-STAg e ELISA-mAbs A3A4 e A4D12. Porém, o ELISA-mAbA3A4 mostrou melhor desempenho na detecção de maior número de amostras IgM-soropositivas. Baixas porcentagens de positividade também foram observadas por meio da detecção baseada no ELISA-mAb 1B8. É interessante notar que o ELISA-STAg para a detecção de anticorpos IgM também demonstrou baixa capacidade de detecção nos dois grupos constituídos por amostras previamente identificadas como IgM-soropositivas, mostrando a baixa sensibilidade deste teste.

Com relação à detecção de anticorpos IgA, foi verificado que o ELISA-STAg demonstrou maior habilidade de detecção que os ELISA-mAbs A3A4 e 1B8, conforme evidenciado pelas porcentagens de positividade alcançadas no grupo de amostras IgA-soropositivas. Porém, nos grupos de amostras IgA-soronegativas, os ELISA-mAbs A3A4 e 1B8 apresentaram uma menor porcentagem de resultados falso-positivos em comparação ao ELISA-STAg. Porém, o ELISA-mAb A4D12 demonstrou maior habilidade de detecção de IgA nas amostras IgA-soropositivas, apresentando a maior correlação com os resultados alcançados pelo ELISA-STAg.

Tomando-se estes dados em conjunto, associados com aqueles obtidos por meio das análises de correlação entre os ensaios, verificou-se que os resultados da detecção de anticorpos IgG por ELISA-mAbs A3A4 e A4D12 estão altamente correlacionados com aqueles obtidos por ELISA-STAg. Já com relação à detecção de anticorpos IgM e IgA, os resultados obtidos por ELISA-mAb A4D12 mostraram as maiores correlações com aqueles determinados pelo ELISA-STAg. O ELISA-mAb 1B8 exibiu as menores correlações para todos os isotipos de anticorpos pesquisados.

Analisando-se os dados obtidos por ELISA-mAbs nos dois grupos de amostras com sorologia atípica para *T. gondii*, um dado interessante foi a detecção de anticorpos IgG específicos por ELISA-mAbsA3A4 e A4D12 nas 4 amostras de soro do grupo previamente definido como IgG-soronegativo (G-M+A+). Este curioso achado poderia sugerir que o ELISA reverso usando estes referidos mAbs poderia apresentar uma maior capacidade de detecção de anticorpos IgG numa fase ainda bem precoce da infecção, em comparação com o ELISA indireto convencional usando STAg. Porém, um maior número de amostras com este perfil sorológico e testes adicionais devem ser conduzidos com o objetivo de confirmar estes achados.

Ao nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho descrito na literatura que analisa a detecção de anticorpos das classes IgG, IgM e IgA específicos a *T. gondii* em amostras de soro humano em um ELISA reverso utilizando anticorpos monoclonais específicos a antígenos imunodominantes do parasita.

Os dois trabalhos encontrados na literatura utilizando anticorpos monoclonais em ensaio imunoenzimático semelhante basearam-se apenas na detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii*. Em um destes trabalhos, desenvolvido por Moleón e colaboradores (1993), um anticorpo monoclonal anti-p30 foi utilizado na detecção de anticorpos IgG específicos a *T. gondii* em amostras de soro de mulheres grávidas usando um desenho experimental similar ao proposto em nosso trabalho. Os autores encontraram altas correlações entre os resultados obtidos por meio do ELISA utilizando mAb anti-p30 com aqueles obtidos pelo ELISA convencional, demonstrando a viabilidade da utilização de anticorpos anti-p30 na detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em amostras de soro humano (MOLEÓN et al., 1993). Além disso, foi demonstrado que a reatividade dos soros no ELISA anti-p30 era menor que a encontrada no ELISA convencional, provavelmente porque a ligação do mAb ao antígeno p30 satura alguns dos sítios de ligação deste antígeno aos anticorpos presentes na amostra testada (MOLEÓN et al., 1993).

O outro trabalho descrito na literatura empregando uma técnica semelhante foi desenvolvido por Sohn e Nam (1999) com anticorpos monoclonais específicos a cada um dos principais antígenos de *T. gondii* (SAG1, SAG2, SAG3, GRA2, GRA6, ROP2, ROP6 e um antígeno citosólico de 32 kDa) para a detecção de anticorpos IgG específicos em amostras de soro de gatos. Os autores verificaram que este ensaio utilizando mAbs apresentou boa capacidade de diferenciação entre soros positivos e negativos, constituindo boas ferramentas a serem utilizadas no diagnóstico da toxoplasmose felina.

De acordo com os nossos resultados, o ELISA reverso usando mAbs pode constituir uma boa alternativa para a detecção de anticorpos específicos a *T. gondii*, especialmente em substituição às técnicas imunoenzimáticas que utilizam antígenos purificados ou recombinantes para a sensibilização das placas de microtitulação. Como esta técnica permite a captura de moléculas imunodominantes dos antígenos solúveis totais na própria placa, estas são obtidas com características homogêneas e naturais, evitando a utilização de preparações heterogêneas obtidas por diferentes procedimentos de purificação antigênica ou antígenos recombinantes com interferências bioquímicas

típicas dos vetores de expressão. Desta maneira, pode-se obter um resultado mais homogêneo e mais reproduzível. Além disso, pelas altas correlações apresentadas entre os resultados do ELISA-mAb e ELISA-STAg, o ensaio utilizando mAbs pode ser utilizado em inquéritos soroepidemiológicos, com resultados satisfatórios.

Finalmente, podemos concluir que os ELISA-mAbs A3A4 e A4D12 para a captura dos antígenos p30 e p22, respectivamente, representam métodos alternativos para a detecção de anticorpos IgG específicos a *T. gondii*, enquanto o ELISA-mAb A4D12 mostrou ser uma útil ferramenta para a detecção de anticorpos IgM e IgA específicos. Tais testes podem ser considerados como ferramentas adicionais para um diagnóstico mais seguro da toxoplasmose, particularmente nos casos de infecção primária e congênita.

6. CONCLUSÕES

- O mAb A3A4 reconhece um epítopo conformacional presente no antígeno de 30 kDa (p30) da superfície de taquizoítas de *T. gondii*, identificado como pertencente à SAG1 ou a outro antígeno da superfamília SRS.
- O mAb A4D12 reconhece um epítopo linear presente no antígeno de 22 kDa (p22) da superfície de taquizoítas de *T. gondii*, identificado como pertencente ao antígeno SAG2A.
- O mAb 1B8 reconhece um epítopo linear presente em um antígeno intracelular de 97 kDa de taquizoítas de *T. gondii*.
- O mAb A3A4, ao contrário dos mAbs A4D12 e 1B8, apresenta boa capacidade de competição com amostras de soros humanos positivos para anticorpos IgG anti-*T. gondii*.
- ELISA reverso usando os mAbs A3A4 (anti-p30) ou A4D12 (anti-p22) foram altamente correlacionados com aqueles obtidos pelo ELISA-STAg, representando métodos alternativos para a detecção de anticorpos IgG específicos a *T. gondii* em amostras de soro humano.
- ELISA reverso usando o mAb A4D12 (anti-p22) constitui em útil ferramenta para a detecção de anticorpos IgM e IgA específicos a *T. gondii* em amostras de soro humano.
- ELISA reverso usando o mAb 1B8 (anti-p97) não mostrou associações significativas com ELISA-STAg, não apresentando potencial diagnóstico para a detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA específicos a *T. gondii* em amostras de soro humano.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ANGUS, C. W.; KLIVINGTON-EVANS, D.; DUBEY, J. P.; KOVACS, J. A. Immunization with a DNA plasmid encoding the SAG1 (P30) protein of *Toxoplasma gondii* is immunogenic and protective in rodents. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 181, n. 1, p. 317-324, 2000.

ASHBURN, D.; JOSS, A. W.; PENNINGTON, T. H.; 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**, London, v. 51, n. 4, p. 312-315, 1998.

AUBERT, D.; MAINE, G. T.; VILLENA, I.; HUNT, J. C.; HOWARD, L.; SHEU, M.; BROJANAC, S.; CHOVAN, L. E.; NOWLAN, S. F.; PINON, J. M. Recombinant antigens to detect *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G and immunoglobulin M in human sera by enzyme immunoassay. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 38, n. 3, p. 1144-1150, 2000.

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

BARRAGAN, A.; SIBLEY, L. D. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 195, n. 12, p. 1625-1633, 2002.

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

BOWIE, W. R.; KING, A. S.; WERKER, D. H.; ISAAC-RENTON, J. L.; BELL, A.; ENG, S. B.; MARION, S. A. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. The BC *Toxoplasma* Investigation Team. **Lancet**, London, v. 350, n. 9072, p. 173-177, 1997.

BULOW, R.; BOOTHROYD, J. C. Protection of mice from fatal *Toxoplasma gondii* infection by immunization with P30 antigens in liposomes. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 147, n. 10, p. 3496-3500, 1991.

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

BURNETT, A. J.; SHORTT, S. G.; ISAAC-RENTON, J.; KING, A.; WERKER, D.; BOWIE, W. R. Multiple cases of acquired toxoplasmosis retinitis presenting in an outbreak. **Ophthalmology**, Rochester, v. 105, n. 6, p. 1032-1037, 1998.

BUXTON, D.; INNES, E. A. A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis. **Parasitology**, London, v. 110, p. 11-16, 1995.

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

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

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

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

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

CESBRON-DELAUW, M. F.; TOMAVO, 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*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 269, n. 23, p. 16217-16222, 1994.

CONTINI, C.; GIULIODORI, M.; CULTRERA, R.; SERACENI, S. Detection of clinical-stage specific molecular *Toxoplasma gondii* gene patterns in patients with toxoplasmic lymphadenitis. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 55, n. 6, p. 771-774, 2006.

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

COUVREUR, G.; SADAK, A.; FORTIER, B.; DUBREMETZ, J. F. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, London, v. 97, p. 1-10, 1988.

COZON, G. J. N.; FERRANDIZ, J.; NEBBI, 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 and Infectious Diseases**, Wiesbaden, v. 17, n. 1, p. 32-36, 1998.

CUNHA-JÚNIOR, J. P. **Caracterização molecular dos mimetopos H2 (SAG2A) e B12 (SRS6) de moléculas de superfície de *Toxoplasma gondii***. 2005. 84p. Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

DENKERS, E. Y.; BUTCHER, B. A. Sabotage and exploitation in macrophages parasitized by intracellular protozoans. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 21, n. 1, p. 35-41, 2005.

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

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

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis. **Veterinary Clinics of North American – Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 17, n. 6, p. 1389-1404, 1987.

DUBEY, J. P. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 84, n. 3-4, p. 349-367, 1999.

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

DUBEY, J. P.; BHAIYAT, M. I.; de ALLIE, C.; MACPHERSON, C. N.; SHARMA, R. N.; SREEKUMAR, C.; VIANNA, M. C.; SHEN, S. K.; KWOK, O. C.; MISKA, K. B.; KILL, D. E.; LEHMANN, T. Isolation, tissue distribution, and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from chickens in Grenada, West Indies. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 91, n. 3, p. 557-560, 2005b.

DUBEY, J. P.; GOMEZ-MARÍN, J. E.; BEDOYA, A.; LORA, F.; VIANNA, M. C.; HILL, D.; KWOK, O. C.; SHEN, S. K.; MARCET, P. L.; LEHMANN, T. Genetic and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Colombia, South America. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 134, n. 1-2, p. 67-72, 2005a.

DUBEY, J. P.; GRAHAM, D. H.; BLACKSTON, C. R.; LEHMANN, T.; GENNARI, S. M.; RAGOZO, A. M.; NISHI, S. M.; SHEN, S. K.; KWOK, O. C.; HILL, D. E.; THULLIEZ, P. Biological and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from Sao Paulo, Brazil: unexpected findings. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 32, n. 1, p. 99-105, 2002.

DUBEY, J. P.; GRAHAM, D. H.; da SILVA, D. S.; LEHMANN, T.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M. *Toxoplasma gondii* isolates of free-ranging chickens from Rio de Janeiro, Brazil: mouse mortality, genotype, and oocyst shedding by cats. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 89, n. 4, p. 851-853, 2003a.

DUBEY, J. P.; KARHEMERE, S.; DAHL, E.; SREEKUMAR, C.; DIABATÉ, A.; DABIRÉ, K. R.; VIANNA, M. C. B.; KWOK, O. C. H.; LEHMANN, T. First biologic and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Africa (Democratic Republic of Congo, Mali, Burkina Faso, and Kenya). **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 91, n. 1, p. 69-72, 2005c.

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

DUBEY, J. P.; NAVARRO, I. T.; GRAHAM, D. H.; DAHL, E.; FREIRE, R. L.; PRUDÊNCIO, L. B.; SREEKUMAR, C.; VIANNA, M.; LEHMANN, T. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens from Parana, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 117, n. 3, p. 229-234, 2003b.

DUBEY, J. P.; NAVARRO, I. T.; SREEKUMAR, C.; DAHL, E.; FREIRE, R. L.; KAWABATA, H. H.; VIANNA, M. C.; KWOK, O. C.; SHEN, S. K.; THULLIEZ, P.; LEHMANN, T. *Toxoplasma gondii* infections in cats from Parana, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 90, n. 4, p. 721-726, 2004.

DUBEY, J. P.; VENTURINI, M. C.; VENTURINI, L.; PISCOPO, M.; GRAHAM, D. H.; DAHL, E.; SREEKUMAR, C.; VIANNA, M. C.; LEHMANN, T. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from free-ranging chickens from Argentina. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 89, n. 5, p. 1063-1064, 2003c.

DUNN, D.; WALLON, M.; PEYRON, F.; PETERSEN, E.; PECKHAM, C.; GILBERT, R. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. **Lancet**, London, v. 353, n. 167, p. 1829-1833, 1999.

FILISSETTI, D.; GORCII, M.; PERNOT-MARINO, E.; VILLARD, O.; CANDOLFI, E. Diagnosis of congenital toxoplasmosis: comparison of targets for detection of *Toxoplasma gondii* by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 41, n. 10, p. 4826-4828, 2003.

FORTIER, B.; ROLLAND, D.; AJANA, F.; DUBREMETZ, J. F.; VERNES, A. Detection of specific antibodies to *Toxoplasma gondii* by a competitive enzyme immunoassay using a monoclonal antibody against the P30 antigen. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Wiesbaden, v. 10, n. 1, p. 38-40, 1991.

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

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

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

GALLEGO, C.; SAAVEDRA-MATIZ, C.; GÓMEZ-MARIN, J. E. Direct genotyping of animal and human isolates of *Toxoplasma gondii* from Colombia (South America). **Acta Tropica**, Basel, v. 97, n. 2, p. 161-167, 2006.

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

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

GIRALDO, M.; PORTELA, R. W. D.; SNEGE, M.; LESER, P. G.; CAMARGO, M. E.; MINEO, J. R.; GAZZINELLI, R. T. Immunoglobulin M (IgM)-glycoinositolphospholipid enzyme-linked immunosorbent assay: an immunoenzymatic assay for discrimination between patients with acute toxoplasmosis and those with persistent parasite-specific IgM antibodies. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 40, n. 4, p. 1400-1405, 2000.

GRAILLE, M.; STURA, E. A.; BOSSUS, M.; MULLER, B. H.; LETOURNEUR, O.; BATTAIL-POIROT, N.; SIBAÏ, G.; GAUTHIER, M.; ROLLAND, D.; LE DU, M. H.; DUCANCEL, F. Crystal structure of the complex between the monomeric form of *Toxoplasma gondii* surface antigen 1 (SAG1) and a monoclonal antibody that mimics the human immune response. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 354, n. 2, p. 447-458, 2005.

GRIGG, M. E.; BONNEFOY, S.; HEHL, A. B.; SUZUKI, Y.; BOOTHROYD, J. C. Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. **Science**, Washington DC, v. 294, n. 5540, p. 161-165, 2001.

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**, Washington DC, v. 30, n. 6, p. 1436-1441, 1992.

HE, X.; GRIGG, M. E.; BOOTHROYD, J. C.; GARCIA, K. C. Structure of the immunodominant surface antigen from the *Toxoplasma gondii* SRS superfamily. **Nature Structural Biology**, New York, v. 9, n. 8, p. 606-611, 2002.

HEDMAN, K.; LAPPALAINEN, M.; SEPPALA, I.; MAKELA, O. Recent primary *Toxoplasma* infection indicated by a low avidity of specific IgG. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 159, n. 4, p. 736-739, 1989.

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

HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 8, n. 10, p. 634-640, 2002.

HITT, J. A.; FILICE, G. A. Detection of *Toxoplasma gondii* parasitemia by gene amplification, cell culture, and mouse inoculation. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 30, n. 12, p. 3181-3184, 1992.

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

HOLLAND, G. N. Reconsidering the pathogenesis of ocular toxoplasmosis. **American Journal of Ophthalmology**, Chicago, v. 128, n. 4, p. 502-505, 1999.

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

HOWE, K. D.; HONORE, S.; DEROUIN, F.; SIBLEY, L. D. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 35, n. 6, p. 1411-1414, 1997.

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

ISMAEL, A. B.; SEKKAI, D.; COLLE, C.; BOUT, D.; MEVÉLÉC, M. N. The MIC3 gene of *Toxoplasma gondii* is a novel potent vaccine candidate against toxoplasmosis. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 71, n. 11, p. 6222-6228, 2003.

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

JUNG, C.; LEE, C. Y.; GRIGG, M. E. The SRS superfamily of *Toxoplasma* surface proteins. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 34, n. 3, p. 285-296, 2004.

KASPER, L. H.; CRABB, J. H.; PFEFFERKORN, E. R. Purification of a major membrane protein of *Toxoplasma gondii* by immunoabsorption with a monoclonal antibody. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 130, n. 5, p. 2407-2412, 1983.

KASPER, L. H.; CURRIE, K. M.; BRADLEY, M. S. An unexpected response to vaccination with a purified major membrane tachyzoite antigen (P30) of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 134, n. 5, p. 3426-3431, 1985.

KAUL, R.; CHEN, P.; BINDER, S. R. Detection of immunoglobulin M antibodies specific for *Toxoplasma gondii* with increased selectivity for recently acquired infections. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 42, n. 12, p. 5705-5709, 2004.

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

KHAN, A.; SU, C.; GERMAN, M.; STORCH, G. A.; CLIFFORD, D. B.; SIBLEY, L. D. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from immunocompromised patients reveals high prevalence of type I strains. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 43, n. 12, p. 5881-5887, 2005.

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

KOHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, London, v. 256, n. 5517, p. 495-497, 1975.

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

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

LAPPALAINEN, M.; KOSKELA, P.; KOSKINIEMI, M.; AMMALA, P.; HIILESMAA, V.; TERAMO, K.; RAIVIO, K. O.; REMINGTON, J. S.; HEDMAN, K. Toxoplasmosis acquired during pregnancy: improved serodiagnosis based on avidity of IgG. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 167, n. 3, p. 691-697, 1993.

LEKUTIS, C.; FERGUSON, D. J. P.; GRIGG, M. E.; CAMPS, M.; BOOTHROYD, J. C. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 96, n. 12, p. 1285-1292, 2001.

LETSCHER-BRU, V.; PFAFF, A. W.; ABOU-BACAR, A.; FILISETTI, D.; ANTONI, E.; VILLARD, O.; KLEIN, J. P.; CANDOLFI, E. Vaccination with *Toxoplasma gondii* SAG-1 protein is protective against congenital toxoplasmosis in BALB/c mice but not in CBA/J mice. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 71, n. 11, p. 6615-6619, 2003.

LI, S.; GALVAN, G.; ARAÚJO, F. G.; SUZUKI, Y.; REMINGTON, J. S.; PARMLEY, S. Serodiagnosis of recently acquired *Toxoplasma gondii* infection using an enzyme-linked immunosorbent assay with a combination of recombinant antigens. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington DC, v. 7, n. 5, p. 781-787, 2000.

LIESENFELD, O. Immune responses to *Toxoplasma gondii* in the gut. **Immunobiology**, Stuttgart, v. 201, n. 2, p. 229-239, 1999.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P.; BUTLER, J. M.; BLAGBURN, B. L. Mechanical transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by dogs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 73, n. 1-2, p. 27-33, 1997.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LUFT, B. J.; HAFNER, R.; KORZUN, A. H.; LEPORT, C.; ANTONISKIS, D.; BOSLER, E. M.; BOURLAND, D. D.; UTTAMCHANDANI, R.; FUHRER, J.; JACOBSON, J. Toxoplasmic encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Members of the ACTG 077p/ANRS 009 Study Team. **The New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v. 329, n. 14, p. 995-1000, 1993.

MEISEL, R.; STACHELHAUS, S.; MEVÉLÉC, M. N.; REICHMAN, G.; DUBREMETZ, J. F.; FISCHER, H. G. Identification of two alleles in the GRA4 locus of *Toxoplasma gondii* determining a differential epitope which allows discrimination of type I versus type II and III strains. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 81, n. 2, p. 259-263, 1996.

MEVÉLÉC, M. N.; BOUT, D.; DESOLME, B.; MARCHAND, H.; MAGNE, R.; BRUNEEL, O.; BUZONI-GATEL, D. Evaluation of protective effect of DNA vaccination with genes encoding antigens GRA4 and SAG1 associated with GM-CSF plasmid, against acute, chronic and congenital toxoplasmosis in mice. **Vaccine**, Amsterdam, v. 23, n. 36, p. 4489-4499, 2005.

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

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

MINEO, J. R.; KHAN, I. A.; KAPER, L. H. *Toxoplasma gondii*: a monoclonal antibody that inhibits intracellular replication. **Experimental Parasitology**, New York, v. 79, n. 3, p. 351-361, 1994.

MINEO, J. R.; McLEOD, R.; MACK, D.; SMITH, J.; KHAN, I. A.; ELY, K. H.; KASPER, L. H. Antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (SAG1, P30) inhibit infection of host cells and are produced in murine intestine after peroral infection. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 150, n. 9, p. 3951-3964, 1993.

MINKOFF, H.; REMINGTON, J. S.; HOLMAN, S.; RAMIREZ, R.; GOODWIN, S.; LANDESMAN, S. Vertical transmission of *Toxoplasma* by human immunodeficiency virus-infected women. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, Saint Louis, v. 176, n. 3, p. 555-559, 1997.

MOLEÓN, E.; GONZÁLEZ, T.; MACHÍN, R.; MOLINA, I. R.; GARCÍA, C. A. Inmunoensayo de “captura” para la detección de IgG humana anti proteína P30 de *Toxoplasma gondii*. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, Ciudad do México, v. 35, n. 3, p. 309-314, 1993.

MOMBRO, M.; PERATHONER, C.; LEONE, A.; BUTTAUFUOCO, V.; ZOTTI, C.; LIEVRE, M. A.; FABRIS, C. Congenital toxoplasmosis: assessment of risk to newborns in confirmed and uncertain maternal infection. **European Journal of Pediatrics**, Berlin, v. 162, n. 10, p. 703-706, 2003.

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

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

MONTOYA, J. G.; REMINGTON, J. S. Toxoplasmic chorioretinitis in the setting of acute acquired toxoplasmosis. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 23, n. 2, p. 277-282, 1996.

MORDUE, D. G.; DESAI, N.; DUSTIN, M.; SIBLEY, L. D. Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. **Journal of Experimental Medicine**, Verlag, v. 190, n. 12, p. 1783-1792, 1999.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 10 ed. São Paulo: Atheneu, 2000, 428 p.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. **C. R. Hebd Séances Academy Sciences**, v. 147, p. 763-766, 1908.

PARMLEY, S. F.; GROSS, U.; SUCHARCZUK, A.; WINDEK, T.; SGARLATO, G. D.; REMINGTON, J. S. Two alleles of the gene encoding surface antigen P22 in 25 strains of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 80, n. 2, p. 293-301, 1994.

PARMLEY, S. F.; SGARLATO, G. D.; REMINGTON, J. S. Genomic and corrected cDNA sequence of the P28 gene from *Toxoplasma gondii*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 57, n. 1, p. 161-165, 1993.

PELLOUX, H.; GUY, E.; ANGELICI, M. C.; ASPOCK, H.; BESSIERES, M. H.; BLATZ, R.; DEL PEZZO, M.; GIRAULT, V.; GRATZL, R.; HOLBERG-PETERSEN, M.; JOHNSON, J.; KRUGER, D.; LAPPALAINEN, M.; NAESSENS, A.; OLSSON, M. A second European collaborative study on polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii*, involving 15 teams. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 165, n. 2, p. 231-237, 1998.

PENA, H. F.; SOARES, R. M.; AMAKU, M.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. *Toxoplasma gondii* infection in cats from Sao Paulo state, Brazil: seroprevalence, oocyst shedding, isolation in mice, and biologic and molecular characterization. **Research in Veterinary Science**, London, v. 81, n. 1, p. 58-67, 2006.

PIETKIEWICZ, H.; HISZCZYNSKA-SAWICKA, E.; KUR, J.; PETERSEN, E.; NIELSEN, H. V.; STANKIEWICZ, M.; ANDRZEJEWSKA, I.; MYJAK, P. Usefulness of *Toxoplasma gondii*-specific recombinant antigens in serodiagnosis of human toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 42, n. 4, p. 1779-1781, 2004.

PORTER, S. B.; SANDE, M. Toxoplasmosis of the central nervous system in the Acquired Immunodeficiency Syndrome. **The New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v. 327, n. 23, p. 1643-1648, 1992.

REISCHL, U.; BRETAGNE, S.; KRUGER, D.; ERNAUT, P.; COSTA, J. M. Comparison of two DNA targets for the diagnosis of toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 3, p. 7, 2003.

REMINGTON, J. S.; McLEOD, R.; THULLIEZ, P.; DESMONTS, G. Toxoplasmosis. In: Remington, J. S.; Klein, J. (Eds.), **Infectious diseases of the fetus and newborn infant**. 5 ed., Philadelphia: W B Saunders, pp. 205-346, 2001.

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

RINDER, H.; THOMSCHKE, A.; DARDE, M. L.; LOSCHER, T. Specific DNA polymorphisms discriminate between virulence and non-virulence to mice in nine *Toxoplasma gondii* strains. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 69, n. 1, p. 123-126, 1995.

ROBERTS, C.; CRUICKSHANK, S.; ALEXANDER, J. Sex-determined resistance to *Toxoplasma gondii* is associated with temporal differences in cytokine production. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 63, n. 7, p. 2549-2555, 1995.

ROMAND, S.; WALLON, M.; FRANCK, J.; THULLIEZ, P.; PEYRON, F.; DUMON, H. Prenatal diagnosis using polymerase chain reaction on amniotic fluid for congenital toxoplasmosis. **Obstetrics and Gynecology**, New York, v. 97, n. 2, p. 296-300, 2001.

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

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

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

SCOTT, P.; PEARCE, E.; NATOVITZ, P.; SHER, A. Vaccination against cutaneous leishmaniasis in a murine model. II. Immunologic properties of protective and nonprotective subfractions of soluble promastigote extract. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 139, n. 1, p. 221-227, 1987.

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

SENSINI, A.; PASCOLI, S.; MARCHETTI, D.; CASTRONARI, R.; MARANGI, M.; SBARAGLIA, G.; CIMMINO, C.; FÁVERO, A.; CASTELLETTO, M.; MOTTOLA, A. IgG avidity in the serodiagnosis of acute *Toxoplasma gondii* infection: a multicenter study. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 2, n. 1, p. 25-29, 1996.

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

SILVA, D. A.; GERVÁSIO, A. M.; SOPELETE, M. C.; ARRUDA-CHAVES, E.; ARRUDA, L. K.; CHAPMAN, M. D.; SUNG, S. S.; TAKETOMI, E. A. A sensitive reverse ELISA for the measurement of specific IgE to Der p 2, a major *Dermatophagoides pteronyssinus* allergen. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, McLean, v. 86, n. 5, p. 545-550, 2001.

SOHN, W. M.; NAM, H. W. Western blot analysis of stray cat sera against *Toxoplasma gondii* and the diagnostic availability of monoclonal antibodies in sandwich-ELISA. **The Korean Journal of Parasitology**, Seoul, v. 37, n. 4, p. 249-256, 1999.

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

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

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

SU, C.; EVANS, D.; COLE, R. H.; KISSINGER, J. C.; AJIOKA, J. W.; SIBLEY, L. D. Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. **Science**, Washington DC, v. 299, n. 5605, p. 414-416, 2003.

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

SUZUKI, Y.; RAMIREZ, R.; PRESS, C.; LI, S.; PARMLEY, S.; THULLIEZ, P.; REMINGTON, J. S. Detection of immunoglobulin M antibodies to P35 antigen of *Toxoplasma gondii* for serodiagnosis of recently acquired infection in pregnant women. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 38, n. 11, p. 3967-3970, 2000b.

SUZUKI, Y.; SHER, A.; YAP, G.; PARK, D.; NEYER, L. E.; LIESENFELD, O.; FORT, M.; KANG, H.; GUFWOLL, E. IL-10 is required for prevention of necrosis in the small intestine and mortality in both genetically resistant BALB/c and susceptible C57BL/6 mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 164, n. 10, p. 5375-5382, 2000a.

SUZUKI, Y.; WONG, S. Y.; GRUMET, F. C.; FESSEL, J.; MONTOYA, J. G.; ZOLOPA, A. R.; PORTMORE, A.; SCHUMACHER-PERDREAU, F.; SCHRAPPE, M.; KOPPEN, S.; RUF, B.; BROWN, B. W.; REMINGTON, J. S. Evidence for genetic regulation of susceptibility to toxoplasmic encephalitis in AIDS patients. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 173, n. 1, p. 265-268, 1996.

SWISHER, C. N.; BOYER, K.; McLEOD, R. Congenital toxoplasmosis. **Seminars in Pediatric Neurology**, Philadelphia, v. 1, n. 1, p. 4-25, 1994.

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

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

TERRY, R. S.; SMITH, J. E.; DUNCANSON, P.; HIDE, G. MGE-PCR: a novel approach to the analysis of *Toxoplasma gondii* strain differentiation using mobile genetic elements. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 31, n. 2, p. 155-161, 2001.

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

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

VOGEL, N.; KIRISITS, M.; MICHAEL, E.; BACH, H.; HOSTETTER, M.; BOYER, K.; SIMPSON, R.; HOLFELS, E.; HOPKINS, J.; MACK, D.; METS, M. B.; SWISHER, C. N.; PATEL, D.; ROIZEN, N.; STEIN, L.; STEIN, M.; WITHERS, S.; MUI, E.; EGWUAGU, C.; REMINGTON, J. G.; DORFMAN, R.; McLEOD, R. Congenital toxoplasmosis transmitted from an immunologically competent mother infected before conception. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 23, n. 5, p. 1055-1060, 1996.

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

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

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