

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

**Programa de Pós-Graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas**

**AVALIAÇÃO DO ANTÍGENO SAG2A RECOMBINANTE DE
Toxoplasma gondii COMO UM POTENCIAL MARCADOR
DIAGNÓSTICO PARA TOXOPLASMOSE HUMANA AGUDA**

SAMANTHA RIBEIRO BÉLA

UBERLÂNDIA - MG

2007

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

AVALIAÇÃO DO ANTÍGENO SAG2A RECOMBINANTE DE
***Toxoplasma gondii* COMO UM POTENCIAL MARCADOR**
DIAGNÓSTICO PARA TOXOPLASMOSE HUMANA AGUDA

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.

SAMANTHA RIBEIRO BÉLA

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ ROBERTO MINEO

CO-ORIENTADORA: DRA. DEISE APARECIDA DE OLIVEIRA SILVA

UBERLÂNDIA - MG

2007

À minha querida mãe Tânia Maria de Souza Ribeiro,
pelo amor, dedicação a família, perseverança e garra.

Ao meu pai Mario Arthur Cauduro Ribeiro (*in memoriam*),
símbolo maior de inteligência.

À minha irmã Daniella de Souza Ribeiro, pelo apoio e confiança.

Ao meu amado esposo Carlos Frederico Conte Béla,
pelo companheirismo, incentivo e apoio em todos
os momentos da minha vida.

*“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram,
mas na intensidade com que acontecem.
Por isso existem momentos inesquecíveis,
coisas inexplicáveis e
pessoas incomparáveis”.*
(Fernando Pessoa)

AGRADECIMENTOS

À DEUS, pelos dons a mim concedidos, por nunca me deixar desanimar e sempre ter coragem para continuar seguindo a trilha da vida e pela oportunidade de conviver ao lado de pessoas maravilhosas.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. José Roberto Mineo e Profa. Dra. Deise A. O. Silva, pela oportunidade de ampliar meus conhecimentos, pela compreensão e ajuda em todos os momentos da execução deste trabalho, por abdicarem dos momentos de descanso pela ciência, pelas palavras encorajadoras e de afeto nos momentos mais difíceis e pelo exemplo de profissionalismo, ética e competência.

Aos amigos e colaboradores, Jair Pereira Cunha Júnior, Carlos P. Pirovane, Flávia Andrade Chaves Borges, Fernando Reis de Carvalho pela disponibilização de insumos e conhecimentos fundamentais para a realização deste trabalho, grande ajuda e incentivo.

Aos meus amáveis amigos e companheiros inseparáveis, Taísa Carrijo de Oliveira, Cristiane Vilhena Bernardes, Damaso Pacheco e Cristina Rostkowska, pelo incentivo, ajuda e amizade.

Aos professores Dra. Júlia Maria Costa Cruz, Dra. Beatriz Pizarro, Dra. Angélica Debs, Dra. Janethe D. O. Pena e Dr. Dalmo Correia Filho pelas valiosas contribuições apresentadas a este trabalho durante as bancas de qualificação e defesa.

Aos professores, Dr. Ernesto Taketomi, Dra. Margareth Gennari, Dra. Eloísa Ferro, Dra. Neide Silva e demais professores deste programa de Pós-Graduação, pelo incentivo, amizade e aprendizado.

Aos amigos e companheiros de laboratório: Ana Cláudia, Celene, Bellisa, Mariana, Marina, Pablo, Hugo, Ronaldo, Leandro, Rafael, Priscila, Jorge e Gabriele, pela amizade, convívio e conhecimentos compartilhados.

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

Aos secretários, Max, João Neto e Lucileide, pela atenção e boa vontade na solução dos nossos problemas.

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 ao CNPq, pela bolsa de auxílio financeiro oferecida.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico de <i>Toxoplasma gondii</i>	16
Figura 2. Estágios morfológicos de <i>T. gondii</i>	21
Figura 3. Distribuição das amostras de soros humanos de acordo com o perfil sorológico da infecção por <i>Toxoplasma gondii</i>	61
Figura 4. Níveis de anticorpos IgG anti- <i>T. gondii</i> para STAg, SAG2A e SAG2AΔ.....	63
Figura 5. Níveis de anticorpos IgG1 anti- <i>T. gondii</i> para STAg e SAG2A.....	65
Figura 6. Comparação da avidéz de IgG anti- <i>T. gondii</i>	68
Figura 7. Comparação da avidéz de anticorpos IgG1 anti- <i>T. gondii</i>	70
Figura 8. Antígenos analisados por SDS-PAGE e <i>Immunoblot</i>	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados de ELISA recombinante indireto e técnicas sorológicas convencionais de diagnóstico em soros de pacientes na fase aguda da infecção por <i>Toxoplasma gondii</i>	66
Tabela 2. Resultados de ELISA recombinante indireto e técnicas sorológicas convencionais de diagnóstico em soros de pacientes na fase crônica da infecção por <i>Toxoplasma gondii</i>	67
Tabela 3. Porcentagem de amostras de soros com diferentes faixas de avidéz (baixa, intermediária e alta) obtidas em ensaios de avidéz para os anticorpos IgG e IgG1 para os antígenos STAg e SAG2A de <i>Toxoplasma gondii</i>	71

RESUMO

Proteínas recombinantes têm sido utilizadas para o diagnóstico sorológico da infecção por *Toxoplasma gondii* para diferenciar entre as fases aguda e crônica da toxoplasmose. Neste estudo, foi avaliada a reatividade de anticorpos IgG e IgG1 através de imunoenaios em soros de pacientes com toxoplasmose aguda e crônica dirigidos contra dois antígenos recombinantes clonados e expressos em *E. coli*, SAG2A (molécula recombinante total) e SAG2AΔ (molécula recombinante deletada do epítipo reconhecido pelo anticorpo monoclonal A4D12). A performance de ambos os antígenos recombinantes foi comparada com o antígeno solúvel de *Toxoplasma* (STAg). Os resultados demonstraram uma maior reatividade de anticorpos IgG em amostras de soros provenientes de pacientes de fase aguda com ambos os antígenos STAg e SAG2A quando comparados com amostras de soros de fase crônica, sendo esta diferença ainda mais evidente quando avaliada a reatividade de anticorpos IgG1 para o antígeno SAG2a. Baixa reatividade foi encontrada para soros humanos de fases aguda e crônica quando foi utilizado o antígeno SAG2AΔ. Uma alta sensibilidade (95%) e alta especificidade (100%) foram demonstradas pelo ELISA-IgG-SAG2A. Analisando separadamente a sensibilidade do ELISA-IgG1-SAG2A para as fases aguda e crônica, foram encontrados valores altamente significantes para a fase aguda (90%) do que para a fase crônica (67%) da infecção. O ensaio ELISA-IgG avidez utilizando STAg foi melhor para caracterizar amostras de soros com alta avidez, enquanto que para este mesmo propósito o ensaio ELISA-IgG1 utilizando SAG2A mostrou melhor performance. Pode-se concluir que o ELISA-IgG1 utilizando SAG2A mostrou ser potencial ferramenta de diagnóstico para caracterizar a fase aguda da infecção por *T. gondii*, sendo esta a primeira vez que o antígeno SAG2A recombinante é proposto como um marcador molecular para detectar níveis e avidez de IgG1 e que o epítipo reconhecido pelo anticorpo monoclonal A4D12 mostrou ser crítico e essencial para sua aplicação em imunoenaios com finalidades diagnósticas.

Palavras-chave: Avidez de anticorpo; Antígeno recombinante; Antígeno SAG2A; Diagnóstico sorológico; Subclasse de IgG; *Toxoplasma gondii*.

ABSTRACT

Recombinant proteins have been used for the serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection to differentiate between the acute and chronic phases of toxoplasmosis. In this study, we evaluated the reactivity of IgG and IgG1 antibodies by immunoassays in acute and chronic phase sera from patients with toxoplasmosis against two recombinant antigens cloned and expressed in *E. coli*, SAG2A (full recombinant molecule) and SAG2A Δ (truncated recombinant molecule deleted from the epitope recognized by A4D12 mAb). The performance of both recombinant antigens was compared with the soluble *Toxoplasma* antigen (STAg). Results demonstrated a higher IgG reactivity in acute sera with both STAg and SAG2A than in chronic phase sera and this difference was more evident for IgG1 antibodies to SAG2A antigen. Low reactivity to SAG2A Δ antigen was found in human sera from acute or chronic phases. A high sensitivity (95%) and specificity (100%) was found for the indirect ELISA-IgG-SAG2A. ELISA-IgG1-SAG2A sensitivity was analyzed separately for acute or chronic phase, showing values significantly higher for acute (90%) than for chronic (67%) phases. ELISA-IgG avidity using STAg was better for characterizing sera with high avidity, while the ELISA-IgG1 using SAG2A was the best for this purpose. In conclusion, ELISA-IgG1-SAG2A may be a potential diagnostic tool to characterize the acute phase *T. gondii* infection. This is the first time that recombinant SAG2A antigen has been proposed as a molecular marker and the epitope recognized by the A4D12 mAb showed to be critical and valuable for application in diagnostic procedures.

Keywords: Antibody avidity; IgG subclasses; Recombinant antigen; SAG2A antigen; Serological diagnosis; *Toxoplasma gondii*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	13
1.2 Hospedeiros e ciclo biológico.....	13
1.3 Transmissão.....	16
1.4 Características morfológicas e ultraestruturais.....	19
1.5 Linhagens de <i>T. gondii</i>	22
1.6 Interação parasita-hospedeiro.....	24
1.7 Antígenos de <i>T. gondii</i>	25
1.8 Resposta imune.....	27
1.9 Quadro clínico e sintomatologia.....	31
1.10 Diagnóstico.....	33
1.10.1 Métodos diretos.....	34
1.10.2 Métodos indiretos.....	36
1.11 Epidemiologia, soroprevalência e prevenção.....	41
2. OBJETIVOS.....	46
2.1 Objetivo Geral.....	46
2.2 Objetivos específicos.....	46
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
3.1 Amostras de soros.....	47
3.2 Manutenção e obtenção de <i>T. gondii</i>	47
3.3 Preparação do antígeno solúvel de <i>T. gondii</i>	48
3.4 Clonagem, expressão e purificação dos antígenos recombinantes.....	49
3.5 Eletroforese (SDS-PAGE) e transferência para <i>Immunoblot</i>	52
3.6 <i>Immunoblot</i>	53
3.7 Ensaio imunoenzimático (ELISA).....	54
3.7.1 ELISA indireto (STAg, SAG2A e SAG2AΔ) para IgG anti- <i>T. gondii</i>	54
3.7.2 ELISA avidéz (STAg e SAG2A) para IgG anti- <i>T. gondii</i>	55
3.7.3 ELISA indireto (STAg e SAG2A) para IgG1 anti- <i>T. gondii</i>	56
3.7.4 ELISA avidéz (STAg e SAG2A) para IgG1 anti- <i>T. gondii</i>	57
3.7.5 ELISA de captura IgM e IgA anti- <i>T. gondii</i>	57

3.8 Análise estatística.....	58
4. RESULTADOS.....	59
4.1 Distribuição das amostras de soros humanos de acordo com o perfil sorológico da infecção por <i>T. gondii</i>	59
4.2 Detecção de anticorpos IgG e IgG1 anti- <i>T. gondii</i> por ELISA-STAg, ELISA-SAG2A e ELISA-SAG2aΔ.....	61
4.3 Avaliação da avidéz de anticorpos IgG e IgG1 por ELISA-STAg e ELISA-SAG2A.....	66
4.4 Análise do perfil dos antígenos STAg, SAG2A e SAG2AΔ por SDS-PAGE e <i>Immunoblot</i>	70
5. DISCUSSÃO.....	72
6. CONCLUSÕES.....	77
REFERÊNCIAS.....	78

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Toxoplasma gondii*

Taxonomicamente, este parasito 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). *T. gondii* é um parasito ubiquitário e intracelular obrigatório amplamente estudado pela sua importância médica, já que este pode causar abortos ou infecções congênitas em seus hospedeiros intermediários. (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

Identificado pela primeira vez em um pequeno roedor norte-africano, popularmente chamado de gondi (*Ctenodactylus gondi*), no Instituto Pasteur da Tunísia (NICOLLE; MANCEAUX, 1908) e, no mesmo ano, isolado em coelhos mantidos no Instituto Biológico de São Paulo, Brasil (SPLENDORE, 1908). 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).

1.2 Hospedeiros e ciclo biológico

T. gondii possui uma ampla variedade de hospedeiros intermediários, nos quais ocorrem as fases assexuadas de seu ciclo biológico, que inclui o homem e várias espécies de animais domésticos, silvestres e marinhos (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). Além disso, sua presença já foi demonstrada em peilotérmicos (peixes, anfíbios e répteis), embora não se conheça a viabilidade do parasito 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 representados por mamíferos carnívoros pertencentes à família Felidae, dentre os quais estão os gatos domésticos (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

O ciclo biológico (Figura 1) começou a ser elucidado de forma completa em 1969, após 60 anos da sua identificação e classificação, onde foram demonstradas as fases assexuadas e sexuadas do parasito (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

Este parasito apresenta ciclo biológico heteroxeno complexo, envolvendo três formas infecciosas: taquizoítas (livres), bradizoítas (presentes em cistos teciduais) e esporozoítas (presentes nos oocistos). Taquizoítas invadem ativamente qualquer célula de seus hospedeiros e correspondem a uma fase de multiplicação rápida por endodiogenia, disseminando-se, preferencialmente, para as células do sistema nervoso central, olho, músculos esqueléticos e músculo cardíaco (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

Bradizoítas são formas de multiplicação lenta, que também se reproduzem por endodiogenia, e são encontrados nos cistos teciduais que 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 temperatura, umidade e oxigenação, ocorre o processo de esporogonia, no qual os oocistos se tornam infecciosos (esporulados),

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).

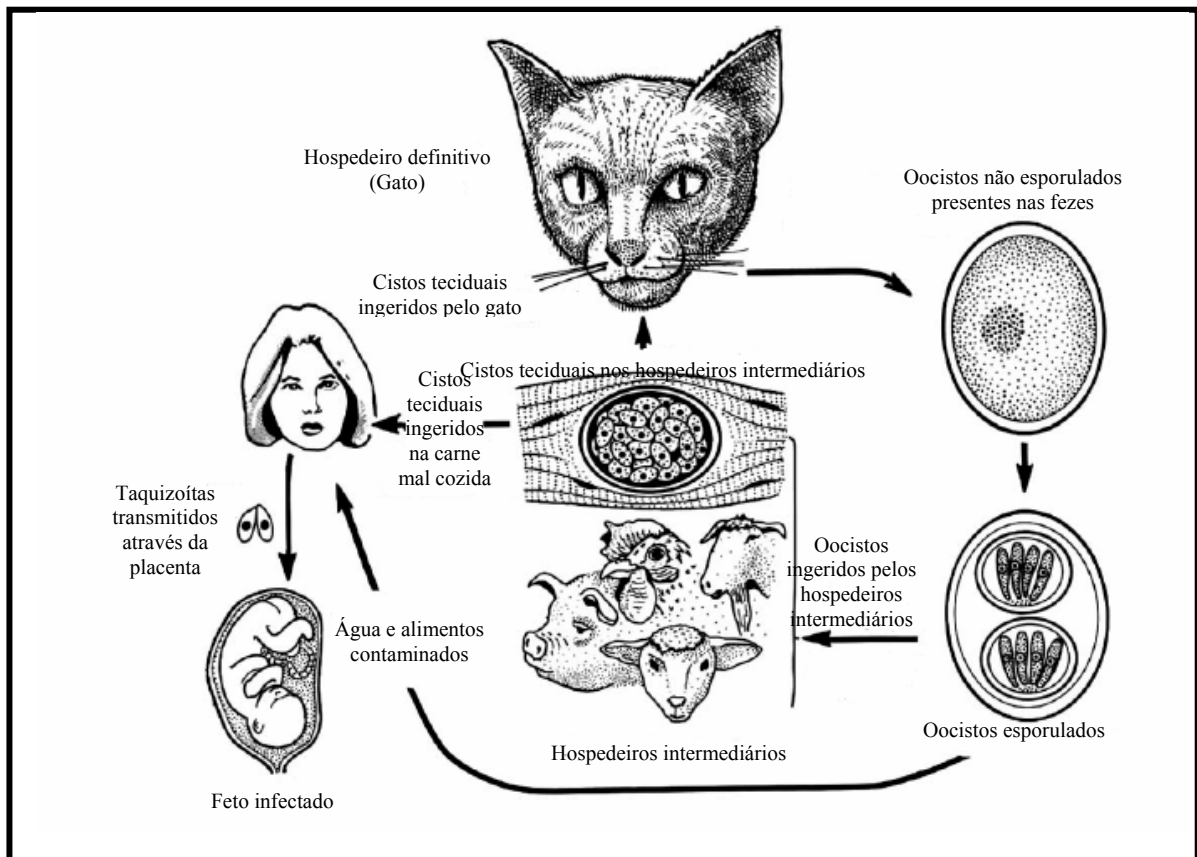


Figura 1. Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*. Ciclo de vida apresentando as principais formas de transmissão do parasito para os hospedeiros definitivos e intermediários.

Fonte: Dubey (2004).

1.3 Transmissão

As três formas de *T. gondii* (taquizoítas, bradizoítas em cistos teciduais e esporozoítas em oocistos esporulados) são infecciosas, tanto para os hospedeiros intermediários quanto para os hospedeiros definitivos, e seres humanos podem se tornar infectados pelas seguintes vias (Figura 1): ingestão de carne crua ou mal cozida (suíno, ovino e caprino) contendo cistos teciduais; ingestão de água e alimentos contaminados com oocistos; transmissão congênita (vertical); transplante de órgãos (coração, pulmão, fígado e rim) de um doador infectado para um receptor soronegativo; transfusão sanguínea de doadores infectados para receptores soronegativos; acidentes laboratoriais ou entre profissionais de saúde com objetos perfurantes e/ou cortantes contaminados.

A rota mais importante para a infecção por *T. gondii* parece ser a oral, relacionada a hábitos culturais e alimentares, ingestão de carnes cruas sem controle sanitário adequado, e de higiene, evidenciando então esta rota como a responsável pela maior taxa de transmissão, levando a diferenças significativas na soroprevalência mundial deste parasito (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 parasito entre seres humanos e outros animais domésticos e selvagens. A transmissão mecânica de oocistos por outros animais tem também sido relatada e pode constituir 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, pois resulta na toxoplasmose congênita, forma mais grave da infecção, que leva a diversas conseqüências negativas para o feto ou recém-nascido. Esta ocorre quando formas taquizoítas do parasito atravessam a placenta durante uma infecção materna primária adquirida durante a gestação, sendo denominada, atualmente, de transmissão transplacentária exógena (MOMBRO et al., 2003). 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. 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 ou está sob uso de drogas imunossupressoras ou ainda em 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). Em outros estudos são encontrados relatos de transmissão transplacentária de *T. gondii* após re-infecção materna durante a gestação em mulheres imunocompetentes (GAVINET et al., 1997) e também a transmissão transplacentária em uma mulher imunocompetente infectada antes da gestação (VOGEL et al., 1996).

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. Outro problema consiste na reativação de infecção crônica

presente no receptor após o transplante, em virtude das drogas imunossupressoras utilizadas no tratamento pós-transplante (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

1.4 Características morfológicas e ultraestruturais

As três formas infecciosas de *T. gondii* apresentam algumas diferenças morfológicas quando analisadas sob microscopia de luz e diversas diferenças ultraestruturais evidenciadas por microscopia eletrônica.

Taquizoítas: apresentam forma de meia-lua e representam os estágios de multiplicação rápida do parasito durante a fase aguda da infecção, no interior de vacúolos parasitóforos intracitoplasmáticos. Apresentam dimensões aproximadas de 4-8 μm x 2-4 μm e 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 e polares). 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 parasito, conferindo-lhe sua alta capacidade de motilidade (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998). Possuem também diversas organelas secretórias, como: roptrias (4-10, anterior ao núcleo), numerosas micronemas (região anterior do parasito) e grânulos densos (extremidade anterior) dispersos por todo o citoplasma. 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 parasitos apicomplexos 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).

O apicoplasto é uma organela aparentemente derivada do cloroplasto de função pouco conhecida e aparentemente essencial para a sobrevivência deste parasito, e da grande maioria dos demais integrantes do filo Apicomplexa. Esta organela apresenta genoma próprio, genes que codificam uma enzima RNA polimerase e componentes ribossomais, e sua função primária parece ser a síntese de ácidos graxos e isoprenóides (KIM; WEISS, 2004) (Fig. 2).

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). Apresenta dimensões aproximadas de 7,5 µm x 2,5 µm, e suas organelas (roptrias, micronemas e grânulos densos) concentradas preferencialmente na porção anterior do parasito (SPEER et al., 1999).

Cistos de *T. gondii* são principalmente encontrados em tecidos neurais e musculares, com tamanhos que variam de acordo com o número de bradizoítas no seu interior, sua forma e do tecido onde se encontram. Geralmente, apresentam em torno de 50-500 bradizoítas, parede fina e lisa, e seu interior não se encontra separado 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) (Fig. 2).

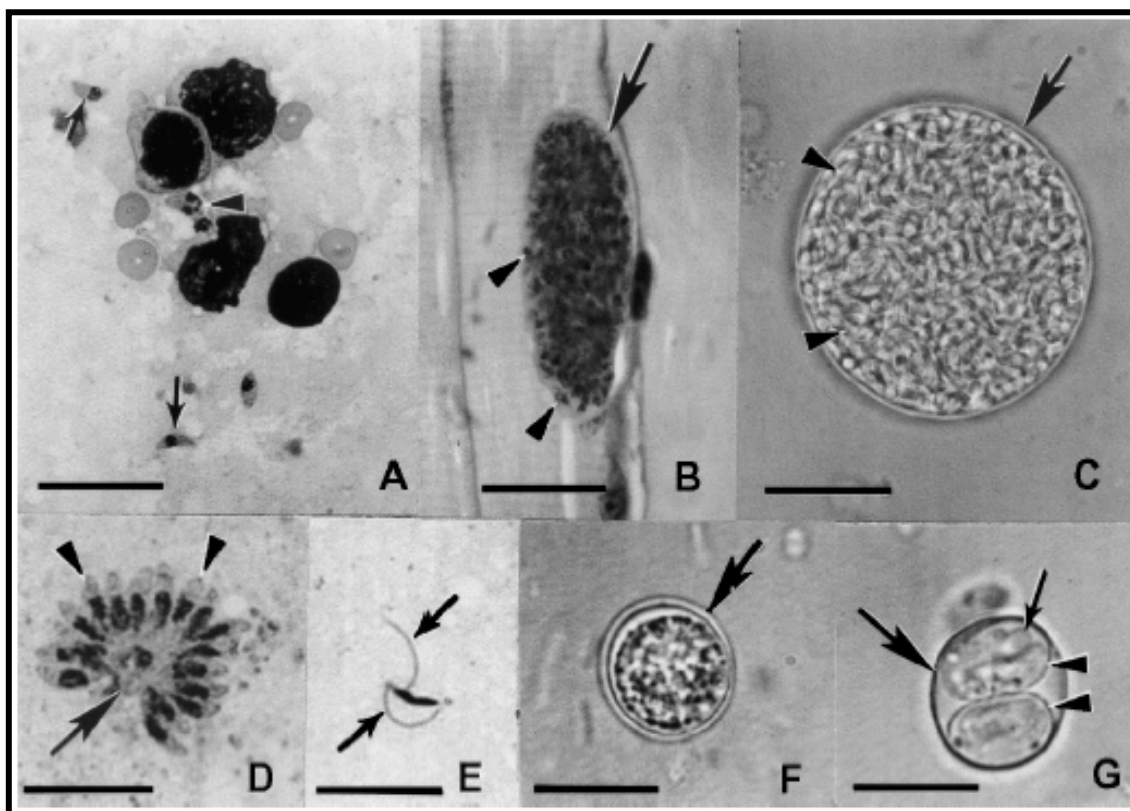


Figura 2. Estágios morfológicos de *T. gondii*. (A) Taquizoítas circulantes. As setas apontam taquizoítas individuais em forma de crescente, enquanto as cabeças de seta apontam taquizoítas em divisão; (B) Cistos teciduais em corte de músculo esquelético. A seta está apontando para a fina parede do cisto, 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).

Esporozoítas: representam 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 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 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, contendo quatro esporozoítas (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998) (Fig. 2).

Além das diferenças morfológicas, ultraestruturais e metabólicas supracitadas, podemos diferenciar as formas taquizoítas de bradizoítas pela presença e ausência de algumas proteínas estágio específicas. Dentre estas, podemos citar, para a forma taquizoíta as seguintes proteínas: antígeno de superfície 1 (SAG1), antígeno de superfície 2 (SAG2A e SAG2B), desidrogenase lactato 1 (LDH1), enolase 2 (ENO2), fosfatidilinositol (Ptdins(t)) e seqüências relacionadas de superfície (SRS1 e SRS3); para as formas bradizoítas: antígeno de superfície 2 (SAG2C e SAG2D), antígeno de superfície 4 (SAG4), recombinante específica de bradizoíta (BSR4), antígeno de matriz (MAG1), desidrogenase lactato 2 (LDH2), enolase 1 (ENO1), antígeno de bradizoíta (BAG1) fosfatidilinositol (Ptdins(b)) e p-ATPase (LYONS; MCLEOD; ROBERTS, 2002).

1.5 Linhagens de *T. gondii*

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). Apresenta uma estrutura populacional altamente clonal, compreendendo três genótipos designados como: tipo I, II e III, (HOWE; SIBLEY, 1995) que apresentam alta similaridade, mas que diferem geneticamente em uma taxa de aproximadamente 1% ou menos de seus genes. Linhagens recombinantes (atípicas ou exóticas) são ainda mais raras, representando menos de 5% dos isolados até agora caracterizados (SU et al., 2003). Entretanto, estas

linhagens diferem quanto à virulência em modelos animais e acometem diferentes espécies por todo o mundo.

As três linhagens clonais de *T. gondii* diferem na virulência e nos padrões epidemiológicos de ocorrência. Linhagens do tipo I (RH) são altamente virulentas para camundongos e humanos, enquanto as linhagens do tipo II (ME49 e seus derivados) são avirulentas. As linhagens do tipo III (CEP e VEG) são consideradas moderadamente virulentas (HOWE; SIBLEY, 1995). 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, sendo a formação de cistos específica à linhagem e influenciada pela sua forma de propagação (KIM; WEISS, 2004; SAEIJ; BOYLE; BOOTHROYD, 2005; SWITAJ et al., 2005).

Das linhagens isoladas de pacientes infectados cronicamente, linhagens do tipo II são encontradas em pacientes norte-americanos, enquanto que linhagens do tipo I parecem ser mais frequentes entre os pacientes brasileiros. 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 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.

A rápida disseminação destes três genótipos de *T. gondii* tem sido atribuída à capacidade deste parasito 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 parasito 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).

1.6 Interação parasito-hospedeiro

Os principais fatores que interferem na patogênese deste parasito em seus hospedeiros são o tamanho do inóculo, a virulência da linhagem, a predisposição genética, o sexo e o estado imunológico (ROBERTS; CRUICKSHANK; ALEXANDER, 1995; SUZUKI et al., 1996).

Uma vez o parasito tendo sido ingerido por via oral, ele invade ativamente as células epiteliais do intestino delgado, iniciando o ciclo de reprodução (LIESENFELD, 1999; BARRAGAN; SIBLEY, 2002) sendo o processo de invasão o principal evento da infecção pelos parasitos 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 micronemas, roptrias e grânulos densos (BUXTON; McALLISTER; DUBEY, 2002).

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

1) A adesão inicial do parasito à célula hospedeira envolve antígenos imunodominantes da superfície do parasito tais como as SAG1 (p30), SAG2 (p22) e as SRSs. Logo após a adesão inicial, os parasitos reorientam-se de modo que a extremidade anterior se posiciona para a extrusão do conóide, seguida por invaginação da membrana da célula hospedeira dando origem ao vacúolo parasitóforo, onde proteínas de micronemas são secretadas. A membrana plasmática da célula hospedeira é também usada para formar a membrana do vacúolo parasitóforo, o qual não se funde com lisossomos, impedindo a degradação intracelular do parasito (MORDUE et al., 1999).

2) Em sequência, proteínas das 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 parasito.

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

1.7 Antígenos de *T. gondii*

Diferentes linhagens de *T. gondii* expressam diferentes antígenos, os quais afetam a extensão (número de órgãos afetados) e a gravidade da infecção. Estudos de polimorfismos de DNA entre diferentes isolados de *T. gondii* resultaram na

identificação de diferentes grupos de antígenos do parasito: antígenos comuns, que determinam a patogenicidade, antígenos específicos aos diferentes estágios do ciclo de vida, 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 parasito, incluindo os taquizoítas, bradizoítas e esporozoítas. Tais antígenos estão localizados em diferentes regiões do parasito, principalmente na superfície celular e na região das roptrias. Dentre os antígenos de superfície (ancorados por glicosil-fosfatidil-inositol, GPI) (NAGEL; BOOTHROYD, 1989; TOMAVO; SCHWARTZ; DUBREMETZ, 1989) presentes em formas taquizoítas e bradizoítas pode-se citar os membros das famílias SAG1 (antígenos de superfície 1) e SAG2 (antígenos de superfície 2) (MANGER; HEHL; BOOTHROYD, 1998; BOOTHROYD et al., 1998; LEKUTIS; FERGUSON; BOOTHROYD, 2000). Estas moléculas são responsáveis pela invasão do parasito à célula hospedeira, modulação da resposta imune, virulência e proteção do mesmo para sua sobrevivência. Suas formas nativas e recombinantes (BEGHETO et al., 2003; NIGRO et al., 2003, BUFFOLANO et al., 2004; DI CRISTINA et al., 2004; Pietkiewicz et al., 2004, BEGHETTO et al., 2006, GOLKAR et al., 2007, HOLEC et al., 2007) têm sido amplamente estudadas para o desenvolvimento de vacinas e também como ferramenta importante no diagnóstico da toxoplasmose, já que são capazes de estimular a produção de altos níveis de anticorpos específicos pelo hospedeiro (HARNING et al., 1996; PARMLEY et al., 1992; MANGER; HEHL; BOOTHROYD, 1998).

Dentre os antígenos da família SAG1, merece destaque a proteína p30, que é o principal antígeno de superfície e o mais abundante da forma taquizoíta,

compreendendo 5% do total de suas proteínas (KASPER; CURRIE; BRADLEY, 1985; BULOW; BOOTHROYD, 1991; ANGUS et al., 2000; LETSCHER-BRU et al., 2003). Outros importantes antígenos de superfície de *T. gondii* é o antígeno p22 (SAG2), observado somente na superfície de taquizoítas (PRINCE et al., 1990; LEKUTIS; FERGUSON; BOOTHROYD, 2000; HEGAB; AL-MUTAWA, 2003) e o antígeno p97, localizado intracelularmente nas formas taquizoíta e bradizoíta, além de ser encontrado dentre as proteínas secretadas e/ou excretadas pelo parasito (MINEO; KHAN; KASPER, 1994).

Diversas proteínas secretórias associadas ao o processo de invasão da célula hospedeira têm sido identificadas e relacionadas 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 associados à forma bradizoíta também têm sido identificados, tais como o antígeno BAG e o antígeno MAG1, que é secretado pela matriz do cisto e é reconhecido por soros imunes do hospedeiro (PARMLEY; SGARLATO; REMINGTON, 1993; HOLEC et al., 2007; DI CRISTINA et al., 2007).

1.8 Resposta imune

A resposta imune a *T. gondii* já está bem estabelecida e, como parasito 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).

Anticorpos IgM são indicativos de infecção recente e não de re-infecção, podendo ser detectados logo nos primeiros 7 dias após a 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 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 IgA são produzidos durante o contato do parasito com a mucosa intestinal, quando linfócitos sensibilizados circulam pela lâmina própria do trato digestivo do hospedeiro. Esses anticorpos são produzidos apenas durante a fase aguda, circulantes no sangue por cerca de 8-9 meses após a infecção primária, não sendo observados durante a infecção crônica, constituindo, portanto, um bom marcador imunológico de infecção recente. 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 atravessam a barreira placentária, mas podem ser detectados 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 estará ausente no sangue do recém-nascido (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003).

Anticorpos IgG específicos aparecem dentro de 1 ou 2 semanas após a infecção, atingindo títulos máximos em aproximadamente 6 semanas, declinando gradualmente ou permanecendo com baixos títulos indefinidamente. Em infecções recentes,

anticorpos IgG estão presentes mas apresentam baixos índices de avidéz para os antígenos correspondentes. Com o transcorrer da infecção e a maturação da resposta imune, estes anticorpos vão apresentando avidéz crescente de modo que nas infecções de longa duração encontra-se um predomínio marcante de anticorpos com alta avidéz (CAMARGO et al., 1991). Assim, enquanto anticorpos IgG específicos de baixa avidéz nem sempre identificam uma infecção recente, anticorpos de alta avidéz têm sido considerados úteis marcadores para excluir infecções primárias (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003).

Além destas classes principais de anticorpos envolvidas na infecção por *T. gondii*, também são observados anticorpos IgE. Poucos estudos têm explorado a importância desta imunoglobulina na resposta humoral contra este parasito, principalmente no que se refere ao seu valor no diagnóstico e na determinação da fase da infecção (GROSS; KESKEL; DARDE, 1997; ASHBURN et al., 1998).

Devido às características peculiares da resposta imune à infecção por *T. gondii*, em especial a resposta sorológica, foram propostos três perfis sorológicos que permitem o diagnóstico das diferentes fases da infecção por este parasito.

(a) Perfil I (infecção 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] < 30%).

(b) Perfil II (transição): definido pela presença de anticorpos IgG detectados em altos títulos, com avidéz intermediária pelos seus antígenos ($30\% < \text{IA} < 60\%$), ausência de anticorpos IgA, bem como ausência ou baixos títulos de anticorpos IgM.

(c) Perfil III (infecção crônica): definido pela presença de anticorpos IgG de alta avidéz ($\text{IA} > 60\%$), 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 (CAMARGO; MOURA; LESER, 1989; CAMARGO et al., 1991).

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 (CDs) produzem e secretam altos níveis de interleucina-12 (IL-12), em resposta a alguns antígenos e proteínas liberados por taquizoítas tal como a proteína ciclofilina-18 (C-18) ligante do receptor 5 de quimiocinas CC (CCR5). A IL-12 estimula as células NK a produzir e secretar altos níveis de interferon- γ (IFN- γ), induzindo a diferenciação de células T CD4⁺ na subpopulação Th1 produtora de IL-2 e IFN- γ , que são citocinas críticas para a sobrevivência do hospedeiro. 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. Células infectadas são destruídas por células T CD8⁺, liberando taquizoítas que ficam acessíveis a vários mecanismos imunológicos (anticorpos, complemento, macrófagos ativados e células NK). A formação de cistos depende primariamente de mecanismos imunes mediados por IFN- γ (DENKERS; GAZZINELLI, 1998; HEGAB; AL-MUTAWA, 2003; ALIBERTI, 2005).

IFN- γ representa o principal mediador de resistência a *T. gondii* por meio da ativação de macrófagos, os quais inibem a replicação dos parasitos pela produção de intermediários reativos do oxigênio (ROI) e do nitrogênio (RNI), que promovem a inativação de enzimas fundamentais para o metabolismo do parasito (ALIBERTI, 2005). Outra citocina importante na regulação da resposta imune celular é a IL-10,

produzida por alguns tipos celulares em locais com alta carga parasitária, apresenta efeitos inibitórios sobre a atividade microbicida de macrófagos, 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 células acessórias.

Alguns mecanismos podem ser usados por *T. gondii* para evadir da resposta imune do hospedeiro e garantir uma infecção bem sucedida, como: a prevenção da união do vacúolo parasitóforo com lisossomos da célula hospedeira e a invasão ativa de macrófagos (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, interferência 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 Quadro clínico e sintomatologia

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

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 autolimitada 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. 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; DI CRISTINA et al., 2004; GOLKAR et al., 2007).

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 são lesões focais brancas visíveis, com uma intensa reação inflamatória associada geralmente, 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: *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 e crises convulsivas. 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. 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, miocardite e envolvimento de múltiplos órgãos (PORTER; SANDE, 1992; LUFT et al.,

1993; MONTOYA; LIESENFELD, 2004; DI CRISTINA et al., 2004; GOLKAR et al., 2007).

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 de acordo com a fase da gestação em que ocorre a transmissão do parasito para o feto. Deste modo, as conseqüências mais comuns são: aborto espontâneo e morte intrauterina, 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 congênicas 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; DI CRISTINA et al., 2004; GOLKAR et al., 2007).

1.10 Diagnóstico

São duas as situações em que o diagnóstico da infecção por *T. gondii* tem maior importância médica: a detecção da transmissão de parasitos via placenta de uma mãe infectada para o seu feto e a detecção de reativação da doença em estado crônico em pacientes imunossuprimidos (REMINGTON; THULLIEZ; MONTOYA, 2004; SENSINI, 2006; HOLEC et al., 2007).

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 parasito ou de algumas de suas moléculas específicas (métodos diretos) ou na detecção de anticorpos específicos a antígenos do parasito presentes no soro de indivíduos infectados (métodos indiretos ou sorológicos).

1.10.1 Métodos Diretos

Os métodos diretos baseiam-se na demonstração direta do parasito em amostras biológicas, tais como sangue, líquido, saliva, humor aquoso e fragmentos de órgãos colhidos por biópsia ou necropsia. As técnicas mais utilizadas seguem descritas abaixo:

Reação em cadeia da polimerase (PCR): na técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), um fragmento específico do genoma do parasito 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), podendo ser obtida a amostra necessária de uma ampla quantidade de fluídos e tecidos biológicos (REMINGTON; THULLIEZ; MONTOYA, 2004; SWITAJ et al., 2005).

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

Alguns genes têm sido utilizados para o diagnóstico da doença (principalmente para infecção congênita) e para a tipificação das linhagens e cepas existentes, como: o gene B1 (BURG et al., 1989), a sequência AF146527 (HOMAN et al., 2000), DNA

ribossomal 18S (FILISSETTI et al., 2003), os elementos genéticos móveis (MGEs – *Mobile Genetic Elements*) (TERRY et al., 2001), e os genes SAG1, SAG2, SAG3, SAG4 e GRA4 (MEISEL et al., 1996; RINDER et al., 1995; HOWE et al., 1997; PELLOUX et al., 1998).

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 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. Somente o isolamento do parasito a partir de fluidos corporais pode comprovar que se trata de infecção aguda (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

Imunohistoquímica: técnicas de imunohistoquímica são particularmente utilizadas para a demonstração de taquizoítas em cortes de tecidos ou esfregaços de fluidos corporais, 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 parasito 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 parasitos (DUBEY, 1999).

Isolamento em animais ou cultura celular: técnicas de isolamento necessitam de parasitos 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 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 parasito 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).

1.10.2 Métodos indiretos

Os métodos sorológicos são os mais comumente utilizados para o diagnóstico da infecção por *T. gondii* e são baseados na detecção de várias classes de anticorpos IgG, IgM e IgA (REMINGTON et al., 2001) e avidéz de IgG (MARCOLINO et al. 2000; BEGHETTO et al., 2003). A presença de anticorpos IgG detectados por estes testes indica somente o contato prévio ou a exposição ao parasito. 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 IgA e IgM específicos em uma única amostra de soro (CAMARGO et al., 1978). Além disso, subclasses de anticorpos IgG também vem sendo utilizadas para o estudo da patogênese

da toxoplasmose como também para o diagnóstico da doença e a identificação de antígenos subclasse específicos (HUSKINSON et al., 1989). As técnicas mais utilizadas seguem descritas abaixo:

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 parasitos vivos e de soro fresco normal, com a presença de frações do sistema complemento, para que ocorra a lise do parasito. Contudo, este teste é ainda utilizado em inquéritos soropidemiológicos em diversas espécies animais, inclusive silvestres, pois não necessita de anticorpos secundários ou conjugados imunoenzimáticos espécie-específicos (CAMARGO, 1964), sendo ainda hoje, considerado como um método sorológico padrão para o diagnóstico da toxoplasmose (SUKTHANA, 2006).

Testes de aglutinação (DAT, MAT, IHAT): técnicas de aglutinação têm sido amplamente desenvolvidas para sorologia de *T. gondii*, tais como o teste de aglutinação direta (*direct agglutination test* – DAT) (FULTON; TURK, 1959) teste de aglutinação direta modificada (*modified agglutination test* – MAT) (DESMONTS; REMINGTON, 1980) e teste de hemaglutinação indireta (*indirect hemagglutination test* – IHAT) (JACOBS; LANDE, 1957). Estes, utilizados em inquéritos soropidemiológicos em diferentes espécies de animais domésticos e silvestres e em humanos, pois não utilizam anticorpos secundários espécie-específicos.

Os métodos DAT e MAT apresentam altas sensibilidade e especificidade, enquanto que IHAT apresenta baixa sensibilidade quando comparado com os testes supracitados. Apesar disso, todos os testes de aglutinação apresentam simplicidade e

versatilidade, podendo ser utilizados para diagnóstico em várias espécies animais, incluindo humanos.

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 conjugados fluorescentes espécie-específicos. A presença de fluorescência somente na extremidade apical é considerada como reação não específica, devido a reações cruzadas com outros parasitos do grupo Apicomplexa. IFAT apresenta algumas desvantagens que são: necessidade de um microscópio de fluorescência, técnicos treinados e experientes, resultados relativamente subjetivos e maiores dificuldades de utilização em grandes inquéritos soropidemiológicos, apesar de apresentar alta especificidade (CAMARGO, 1964).

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 a estruturas na superfície do parasito, formando os antígenos de superfície (SAG), ou no interior das organelas secretórias, como os micronemas (MIC), as roptrias (ROP) e os grânulos densos (GRA).

SAG1 tem uma massa molecular estimada de 30 kDa (p30) e está homogeneamente 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 GRA10) também têm sido reconhecidos e caracterizados em *T. gondii* (KASPER; CRABB; PFEFFERKORN, 1983; CESBRON-DELAUW et al., 1994; JUNG; LEE; GRIGG, 2004).

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).

Ensaio imunoenzimático (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 e esta ligação é demonstrada pelo conjugado imunoenzimático 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 as colorações obtidas nos controles. As principais vantagens do ELISA são: obtenção de resultados objetivos, custo relativamente baixo e possibilidade de testar grande quantidade de amostras em pequeno espaço de tempo, tendo vasta 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 do teste utilizado. Assim, diferentes preparações de antígeno têm sido desenvolvidas: antígenos solúveis e totais; antígenos de taquizoítas fixados com formalina; antígenos excretados e/ou secretados pelo parasito (ESA, *excreted/secreted antigens*); proteínas nativas purificadas por meio de cromatografia de afinidade

utilizando anticorpos monoclonais; proteínas recombinantes de antígenos imunodominantes dos parasitos. Desta forma, quanto maior o grau de purificação dos antígenos, maior é a especificidade do teste e, por outro lado, quanto menos purificada a preparação antigênica, maior é a probabilidade de ocorrer reatividade cruzada com parasitos relacionados (SENSINI, 2006; SUKTHANA, 2006).

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

O principal ensaio imunoenzimático utilizado na detecção de anticorpos IgG é o método ELISA indireto, que apresenta boa sensibilidade e boa especificidade, sendo de vasta 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*. As técnicas imunoenzimáticas para detecção de IgM e IgA apresentam sensibilidade e especificidade muito variáveis, sendo os resultados obtidos por meio da utilização de kits comerciais pouco confiáveis e seguros. O teste 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 teste ELISA de captura, em que as placas são sensibilizadas com anticorpos que capturam a porção Fc de anticorpos IgM ou IgA presentes no soro

testado, e aqueles específicos a *T. gondii* são selecionados mediante a adição subsequente de antígenos do parasito, seguidos de anticorpos anti-*T. gondii* conjugados com enzimas (CAMARGO et al., 1978; MINEO et al., 1986; 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 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 (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; KRAVETZ; FEDERMAN, 2005).

Uma vacina efetiva contra o parasito ainda não foi desenvolvida, existindo apenas uma vacina preparada a partir de parasitos 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, parasitos vivos atenuados, parasitos mutantes ou plasmídeos com genes que codifiquem antígenos do parasito 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 parasito por meio da inibição de enzimas envolvidas na síntese de folato), onde estão incluídas as drogas, pirimetamina, trimetopim e sulfadiazina, que possuem efeito sinérgico. O uso combinado de pirimetamina e sulfadiazina tem sido aprovado como tratamento de escolha para a toxoplasmose desde 1950 (PETERSEN, 2007).

Os macrolídeos (apresentam efeito tóxico ao parasito através da ligação a açúcares), sendo os mais usados: espiramicina, clindamicina e azitromicina (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003). A clindamicina é utilizada combinada a pirimetamina em pacientes que são sensíveis a sulfadiazina (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

As hidroxinaftoquinonas (apresentam efeito tóxico ao parasito, pois inibem moléculas envolvidas na cadeia respiratória) sendo a principal droga a Atovaquone, que é uma hidroxynaphthoquinone. As fluoroquinolonas (impedem a proliferação do parasito, pois inibem enzimas envolvidas na replicação de seu DNA), como: gatifloxacina e travafloxacina, sendo o uso combinado de gatifloxacina e pirimetramina tem mostrado bons resultados em experimentos utilizando camundongos infectados (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003).

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).

Até o presente momento, a detecção de anticorpos específicos contra *T. gondii* se baseia no reconhecimento de antígenos totais, de parasitos obtidos do fluido peritoneal de camundongos infectados ou de cultura de tecidos (Pietkiewicz et al., 2004).

Inúmeros estudos têm reportado o uso de proteínas recombinantes para o diagnóstico sorológico da infecção por *T. gondii* (Beghetto et al., 2003; Nigro et al., 2003; Buffolano et al., 2004; Manlio et al., 2004; Pietkiewicz et al., 2004; Beghetto et al., 2006; Golkar et al., 2007; Holec et al., 2007) com a vantagem da redução dos custos de realização das técnicas diagnósticas como também o baixo custo na produção e purificação dos antígenos recombinantes (Pietkiewicz et al., 2004). Além disso, antígenos recombinantes protéicos têm sido detectados sorologicamente como marcadores moleculares para indivíduos positivos, assim como, diferenciadores entre as fases aguda e crônica da infecção. Embora nenhum destes ensaios baseados em antígenos recombinantes terem demonstrado um potencial para a substituição do

diagnóstico convencional, estudos adicionais são necessários para a caracterização de novos marcadores que possam ser utilizados para diversos propósitos clínicos (Beghetto et al., 2006).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o antígeno recombinante SAG2A de *T. gondii* em ensaios imunoenzimáticos como um potencial marcador diagnóstico das fases aguda ou crônica da toxoplasmose humana, por meio da determinação de títulos e avides de anticorpos IgG e IgG1 específicos.

2.2 Objetivos específicos

- Padronizar testes imunoenzimáticos (ELISA) utilizando o antígeno recombinante SAG2A em comparação com o antígeno recombinante truncado (SAG2AΔ) e antígeno solúvel de *Toxoplasma* (STAg) para a detecção de anticorpos IgG e IgG1 específicos a *T. gondii* em amostras de soros humanos nas fases aguda e crônica da infecção.
- Padronizar técnicas de ELISA-avidez utilizando o antígeno recombinante SAG2A em comparação com o antígeno solúvel (STAg) para a determinação dos índices de avides de anticorpos IgG e IgG1 específicos a *T. gondii* em amostras de soros humanos nas fases aguda e crônica da infecção.
- Avaliar por *immunoblot* a reatividade de anticorpos IgG e IgG1 em amostras de soros humanos de fase aguda e crônica da infecção por *T. gondii* bem como do anticorpo monoclonal A4D12 (p22) ao antígeno recombinante SAG2A em comparação com o antígeno recombinante truncado (SAG2AΔ) e antígeno solúvel de *Toxoplasma* (STAg).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras de soros

Um total de 83 amostras de soros humanos foi obtido a partir do banco de soros do Laboratório de Imunoparasitologia da Universidade Federal de Uberlândia e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta instituição. Tais amostras foram distribuídas em três 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:

Grupo I: 30 amostras de soro de pacientes com infecção recente, definida pela presença de anticorpos IgG, IgM e IgA específicos a *T. gondii*. Destas, 11 eram de pacientes com infecção primária na gravidez, 9 eram de recém-nascidos com infecção congênita, e 10 eram de casos com infecção aguda adquirida.

Grupo II: 30 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.

Grupo III: 23 amostras de soro de indivíduos com sorologia negativa para *T. gondii* (ausência de anticorpos IgG, IgM e IgA específicos).

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 ressuspensionado 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 do antígeno solúvel de *T. gondii*

Antígeno solúvel de taquizoítas de *T. gondii* (STAg) foi preparado como descrito por Scott e colaboradores (1987), com algumas modificações. Suspensões parasitárias (1 x 10⁸ 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, 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). Aliquotas dos antígenos foram armazenadas a -20°C até serem utilizadas em testes ELISA.

3.4 Clonagem, expressão e purificação dos antígenos recombinantes

A clonagem, expressão e purificação dos antígenos recombinantes de SAG2A foram realizadas pelo Profs. Carlos P. Pirovane (Divisão de Microbiologia e Imunologia, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA) e Jair Pereira Cunha-Junior (Divisão de Imunologia, Universidade Federal de Tocantins, Palmas, TO).

A sequência de nucleotídeos do gene de *T. gondii* que codifica o antígeno SAG2A foi obtida pela análise do banco de dados BLASTp, mediante a sequência do peptídeo obtida pelo mapeamento do epítipo reconhecido pelo anticorpo monoclonal A4D12 por meio de *phage display* (CUNHA-JUNIOR, 2005).

Com o objetivo de expressar a proteína SAG2A inteira em bactéria, foram sintetizados os *primers* específicos SAG2AFNde1 (5'-CAAGTTCGCTCATATGTCCACCACCG-3'), coordenadas 61 e 87 do cDNA, que gera um sítio para a enzima de restrição *NdeI*, adjacente à região codificadora do sítio de clivagem proteolítica do peptídeo sinal e o *primer* SAG2ARHind3 (5'-GACTTTCGCAAAGCTTCTCCGAAAG-3'), coordenadas 643 e 668, localizado adjacente ao códon de terminação. Esses *primers* foram utilizados para amplificar um fragmento de SAG2A de 607 pb.

Para expressar uma versão truncada de SAG2A (SAG2AΔ), em bactéria, foi sintetizado o *primer* SAG2ARHind3del (5'-AGAACCATCAAAGCTTCGACCAGCG-3'), coordenadas 381 e 406. Esse *primer* e o *primer* SAG2AFNde1 foram utilizados para amplificar um fragmento de 349 pb, correspondendo à porção da molécula deletada de sua sequência a partir do epítipo mapeado e reconhecido pelo anticorpo monoclonal A4D12. Estes *primers* foram construídos a partir do banco de dados *GenBank* (número de acesso AAO72427)

Taquizoítas da cepa RH de *T. gondii* foram utilizados para isolar o DNA genômico, o qual por sua vez, serviu como molde para amplificação do antígeno por um protocolo padronizado da PCR. Em resumo, foram utilizados 50 ng de DNA genômico de taquizoítas da cepa RH, extraído pelo método anteriormente descrito (DOYLE; DOYLE, 1990), 80 pmol de cada *primer* compondo os pares, conforme descrito acima, 0,25 mmol/L de dNTPs, 2,0 unidades de Taq DNA Polimerase (Fermentas, Burlington, Canadá), Tris-HCl 20 mmol/L pH 8,2, KCl 10 mmol/L, (NH₄)₂ SO₄ 6 mmol/L, Triton X-100 0,1% (v/v) e soro albumina bovina (BSA) 10 µg/mL, para um volume final de 100 µL. As condições de reação adotadas foram: 2 minutos a 94°C, seguido de 40 ciclos (45 segundos a 94°C, 45 segundos a 48°C e 1 minuto e 30 segundos a 72°C) e 5 minutos a 72°C. A reação procedeu-se em termociclador modelo MJ Research PLTC-200 (GMI Inc, St. Paul, USA). Os fragmentos amplificados de aproximadamente 607 pb e 406 pb foram purificados com o kit *Accuprep PCR purification* (Bioneer Corporation, Daejeon, Coréia do Sul), conforme recomendações do fabricante. Os produtos da PCR foram digeridos com as enzimas de restrição *NdeI* e *HindIII* e inseridos nos sítios *NdeI/HindIII* do vetor pET28a, resultando nos plasmídeos pET28aSAG2A e pET28aSAG2AΔ, contendo as seqüências de SAG2A inteira e truncada, respectivamente, embebidas entre domínios de cauda de Histidina.

A reação de ligação dos fragmentos de DNA ao vetor foi conduzida de acordo com técnicas-padrão de clonagem molecular em plasmídeos (SAMBROOK et al., 1989). O fragmento de DNA a ser clonado e o vetor foram utilizados na razão molar entre 3:1 e 5:1, em um volume final de 15 µL, na presença da enzima T₄ DNA Ligase (Fermentas), com o tampão do fabricante. A reação foi incubada a 22°C por 12 horas.

As células competentes foram preparadas de acordo com Sambrook e colaboradores (1989). Células de *E. coli Rosetta (DE3)* foram crescidas em meio LB até

atingir um valor de absorbância (600 nm) de 0,5, incubadas no gelo por 10 minutos e concentradas cinco vezes por centrifugação (5.000 x *g* a 4°C por 10 minutos) em MgCl₂ 100 mmol/L. Após nova incubação no gelo por 10 minutos, essas células foram coletadas por centrifugação (5.000 x *g* a 4 °C por cinco minutos), ressuspensas em um volume de CaCl₂ 100 mmol/L equivalente à metade do volume original do meio de cultura e incubadas no gelo por 20 minutos. Em seguida, essas células foram coletadas por centrifugação (5.000 x *g* a 4°C por cinco minutos), concentradas 10 vezes pela ressuspensão em CaCl₂ 100 mmol/L e glicerol 15%, aliquotadas em volume de 200 µL e armazenadas a -80°C, até o uso.

Para transformação, foram adicionados 7 µL da reação de ligação a uma alíquota de células competentes da estirpe *Rosetta (DE3)*, e a suspensão foi mantida a 0°C por 30 minutos. Após um choque térmico de 2 minutos a 42°C, foi adicionado 1 mL de meio LB, seguido por incubação a 37°C, por uma hora. As células foram concentradas por centrifugação, ressuspensas em 100 µL de meio LB e espalhadas em placas contendo LB (sólido), cloranfenicol a 50 µg/mL e kanamicina a 50 µg/mL, para seleção de colônias transformantes. O DNA plasmidial, isolado de bactérias transformadas, foi digerido com as enzimas de restrição apropriadas e separado por eletroforese em gel de agarose 1% para identificação do clone de interesse. As colônias recombinantes foram armazenadas em glicerol a 15 % a -80°C.

A expressão das proteínas foi realizada mediante indução com IPTG (Isopropil-β-D-Tiogalactosídeo, Sigma Chemical Co.). Uma colônia isolada de cada clone propagado em *Rosetta (DE₃)*, foi inoculada em 2 mL de LB, contendo os antibióticos kanamicina a 50 µg/mL e cloranfenicol a 34 µg/mL. A cultura crescida por 12 horas sob agitação a 37°C foi utilizada como inóculo para 100 mL do meio Circlegrow, contendo os referidos antibióticos. Após atingir um valor de absorbância (600 nm) de 0,6 foi

adicionado 1,0 mmol/L do indutor IPTG. Quatro horas após a indução, as células foram coletadas por centrifugação. Como controle foi utilizado a estirpe *Rosetta* (DE_3) transformada com o vetor pET28a. O extrato protéico total da bactéria foi analisado em SDS-PAGE. As células bacterianas foram resuspensas em tampão de lise (tampão fosfato 50 mM, pH 8,0, contendo Triton X-100 a 0,1 %) correspondente a 20% do volume das culturas. As células foram rompidas por ultrassonicação (8 pulsos de 20 segundos, com 30 segundos em repouso no gelo, amplitude 70%) em processador ultrassônico (Molecular Devices Inc, Toronto, Canadá) e as frações solúveis e insolúveis separadas por centrifugação a 12.000 x *g* por 15 minutos a 4°C. As proteínas heterólogas SAG2AFull (SAG2a) e SAG2ADel (SAG2AΔ) foram detectadas na fração solúvel do extrato bacteriano, conforme análise em SDS-PAGE.

As proteínas heterólogas foram purificadas por cromatografia de afinidade em coluna com 2 mL da resina *Chellating-Sepharose fast flow* (Amersham Pharmacia Biotec, São Paulo, Brasil), contendo níquel. O fluxo adotado foi 1 mL/min. Os tampões utilizados foram: de ligação 1X (5 mmol/L de imidazol, 1 mol/L de NaCl e 20 mmol/L de Tris-HCl, pH 7,9); de lavagem/eluição (1 mol/L de NaCl e 20 mmol/L de Tris-HCl, pH 7,9 e imidazol nas seguintes concentrações: 10, 25, 50, 75, 100, 250 mmol/L). A coluna foi equilibrada com 20 volumes de tampão de ligação antes de aplicar a amostra. Em seguida, foi submetida a 10 volumes do tampão de ligação e 2 volumes do tampão de lavagem para cada concentração de imidazol. As frações de 1 mL cada foram coletadas a partir da concentração de imidazol de 50 mmol/L.

3.5 Eletroforese (SDS-PAGE) e transferência para *Immunoblot*

O antígeno solúvel (STAg) e os antígenos recombinantes (SAG2A e SAG2AΔ) foram adicionados (5μg de STAg e 2μg para os antígenos recombinantes) ao tampão de

amostra (Tris-HCl a 100mM pH 6,8; dodecil sulfato de sódio [SDS] a 4%; glicerol a 20%; azul de bromofenol a 0,2%), incubados por 5 minutos a 100°C e submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12% sob condições não redutoras (LAEMMLI, 1970), utilizando o sistema de eletroforese vertical em mini-gel (Hoefer Pharmacia Biotech Inc., São Francisco, USA). Um volume de 20µL foi aplicado de cada antígeno (para coloração) e 150 µL (para a transferência), juntamente com padrões de pesos moleculares (Sigma Chemical Co.). Após a separação eletroforética, as proteínas foram coradas com nitrato de prata (YUEN et al., 1982) ou transferidas para membrana de nitrocelulose (poros de 0,22 µm; Sigma Chemical Co.) de acordo com método anteriormente descrito (TOWBIN; STAEBELIN; GORDON, 1979), utilizando um sistema úmido de transferência (Mini Trans - Blot® Eletrophoretic Transfer Cel, BioRad, Hercules, EUA) por 18 horas a 4°C, a uma corrente constante de 90mA. O sucesso da transferência foi confirmado pela visualização das frações protéicas e padrões de pesos moleculares coradas com solução de Ponceau a 0,5%.

3.6 Immunoblot

As membranas de nitrocelulose foram cortadas em tiras de aproximadamente 3mm de largura e colocadas em canaletas apropriadas para a reação. As tiras foram bloqueadas com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T) e leite desnatado (PBS-TM) a 5% por 2 horas à temperatura ambiente. Após lavagem com PBS-TM a 1%, as tiras foram incubadas por 18 horas a 4°C com o anticorpo monoclonal A4D12 (sobrenadante de cultura não diluído) ou *pool* de soros (mistura de 5 soros, vol/vol, diluídos 1:64 em PBS-TM 1%) de pacientes nas fases aguda ou crônica da infecção e soros não reagentes. Após seis ciclos de lavagens de cinco minutos com PBS-T, as tiras foram incubadas com os respectivos anticorpos secundários de cabra anti-IgG de camundongo

marcados com peroxidase (diluído 1:1000 em PBS-TM 1%) ou anti-IgG humana marcados com peroxidase (diluído 1:1000 em PBS-TM 1%) ou anti-IgG1 humana biotinilados (diluído 1:250 em PBS-T e soroalbumina bovina [BSA] a 0,1%) (todos reagentes da Sigma Chemical Co.) por 2 horas à temperatura ambiente. Após novo ciclo de lavagens, as tiras tratadas com os anticorpos biotinilados anti-IgG1 humana, foram incubadas com streptavidina-peroxidase (diluído 1:1000 em PBS-T-BSA 0,1%, Sigma Chemical Co.) por 30 minutos à temperatura ambiente. Todas as membranas foram novamente lavadas com PBS-T e reveladas pela adição de 3,3'- diaminobenzidina (DAB) (Sigma Chemical Co.) a 1mg/mL em Tris-HCl 20 mM (pH 7,2) e 0,03% de H₂O₂. A reação foi interrompida com água destilada quando bandas de coloração marrom foram visualizadas.

3.7 Ensaios imunoenzimáticos (ELISA)

3.7.1 ELISA indireto (STAg, SAG2A e SAG2AΔ) para IgG anti-*T. gondii*

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

Placas de microtitulação de poliestireno de alta afinidade (Corning Laboratories Inc., New York, EUA) foram sensibilizadas com STAg (5 µg/mL), SAG2A (2 µg/mL) ou SAG2AΔ (2 µg/mL) diluídos em tampão carbonato-bicarbonato 0,06M (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-TM a 5% por 1 hora a 37°C. Após lavagem por três vezes com PBS-T, as placas foram incubadas com amostras de soro diluídas 1:64 em PBS-TM 5%, em duplicata, por 1 hora a 37°C. Após lavagem por seis vezes, as placas foram

incubadas com o anticorpo de cabra anti-IgG humana conjugado com peroxidase diluído 1:1000 em PBS-TM 5% 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 o-phenilenediamine (OPD; Sigma Chemical Co.) a 1 mg/mL em tampão citrato-fosfato 0,01M (pH 5,0) e interrompida com a adição de H₂SO₄ 2N.

A densidade óptica (DO) foi determinada a 492 nm em leitor de microplacas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, McLean, EUA). Soros controles positivos e negativos foram incluídos em cada placa. O limite de positividade (*cut off*) da reação foi determinado pela média da DO dos soros controles negativos acrescida de 3 desvios padrões. Os resultados foram expressos em índices de reatividade ELISA (IE), de acordo com a fórmula: $IE = DO \text{ amostra} / DO \text{ cut off}$, onde valores de $IE > 1,2$ foram considerados positivos, para a exclusão dos valores de reatividade próximos a $IE = 1,0$.

3.7.2 ELISA avidéz (STAg e SAG2A) para IgG anti-*T. gondii*

ELISA avidéz para anticorpos IgG específicos a *T. gondii* foi realizado conforme descrito previamente (MARCOLINO et al., 2000), com algumas modificações.

Placas de microtitulação de poliestireno de alta afinidade (Corning Laboratories Inc., New York, EUA) foram sensibilizadas com STAg (5 µg/mL) ou SAG2A (2 µg/mL) diluídos 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-TM 5% por 1 hora a 37°C. Após lavagem por três vezes com PBS-T, as placas foram incubadas com amostras de soro diluídas 1:64 em PBS-TM 5%, em quadruplicata, por 1 hora a 37°C. Após uma lavagem com PBS-T, poços em duplicata foram submetidos a uma lavagem diferencial com solução de uréia a 6M em PBS por 10 minutos, enquanto a outra duplicata de poços foi lavada com PBS-T por 10 minutos.

Em seguida, todos os poços foram lavados por três vezes com PBS-T e incubados com o anticorpo de cabra anti-IgG humana conjugado com peroxidase diluído 1:1000 em PBS-TM 5% por 1 hora a 37°C. Após nova lavagem por seis vezes com PBS-T, a reação foi revelada como descrito para ELISA-IgG indireto.

Os resultados foram expressos em Índice de Aidez (IA) e calculado como a razão entre os valores de IE obtidos das amostras tratadas com uréia (U^+) e as amostras não tratadas (U^-), seguindo a fórmula: $IA (\%) = [IE (U^+) / IE (U^-)] \times 100$, onde os valores de $IA > 30\%$ foram considerados de baixa aidez, IA entre 30% e 60% de aidez intermediária e $IA > 60\%$ de alta aidez.

3.7.3 ELISA indireto (STAg e SAG2A) para IgG1 anti-*T. gondii*

Placas de microtitulação de poliestireno de alta afinidade (Corning Laboratories Inc., New York, EUA) foram sensibilizadas com STAg (5 µg/mL) ou SAG2A (2 µg/mL) diluídos 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 0,1% BSA (PBS-T-BSA) por 1 hora a 37°C. Após lavagem por três vezes com PBS-T, as placas foram incubadas com amostras de soro diluídas 1:64 em PBS-T-BSA, em duplicata, por 1 hora a 37°C. Após lavagem por seis vezes, as placas foram incubadas com o anticorpo biotilado de cabra anti-IgG1 humana diluído 1:250 em PBS-T-BSA por 1 hora a 37°C. Após seis lavagens com PBS-T as placas foram incubadas com streptavidina-peroxidase diluído a 1:1000 em PBS-T-BSA por 30 min à temperatura ambiente. Após lavagens por seis vezes com PBS-T, a reação foi revelada pela adição do substrato enzimático H_2O_2 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). Valores de DO foram determinados a 405

nm e resultados foram expressos em índices ELISA (IE) como descrito para ELISA-IgG indireto.

3.7.4 ELISA avidez (STAg e SAG2A) para IgG1 anti-*T. gondii*

Placas de microtitulação de poliestireno de alta afinidade (Corning Laboratories Inc., New York, EUA) foram sensibilizadas com STAg (5 µg/mL) ou SAG2A (2 µg/mL) diluídos 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-BSA por 1 hora a 37°C. Após lavagem por três vezes com PBS-T, as placas foram incubadas com amostras de soro diluídas 1:64 em PBS-T-BSA, em quadruplicata, por 1 hora a 37°C. Após uma lavagem com PBS-T, poços em duplicata foram lavados com solução de uréia a 6M em PBS por 10 minutos enquanto a outra duplicata de poços foi lavada com PBS-T por 10 minutos. Em seguida, todos os poços foram lavados por três vezes com PBS-T e incubados com o anticorpo de cabra biotinilado anti-IgG1 humana diluído 1:250 em PBS-T-BSA por 1 hora a 37°C. Após nova lavagem por seis vezes com PBS-T, as placas foram incubadas com streptavidina-peroxidase diluída 1:1000 em PBS-T-BSA por 30 minutos à temperatura ambiente. Após novas lavagens com PBS-T, a reação foi revelada como descrito para ELISA-IgG1 indireto. Os resultados foram expressos em Índice de Avidez (IA) e calculado como descrito para ELISA-IgG avidez.

3.7.5 ELISA de captura IgM e IgA anti-*T. gondii*

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

Microplacas de poliestireno (Immulon 2, Dynex Technologies, Chantilly, 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 o ELISA-IgG indireto.

3.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada por meio da utilização do programa computacional *GraphPad Prism* versão 5.0 (*GraphPad Software, Inc.*, San Diego, USA). Níveis de anticorpos foram comparados entre os grupos de pacientes usando o teste *t* de Student pareado ou não pareado, quando apropriado. Proporções de positividade entre os ELISAs utilizando os diferentes antígenos foram comparadas pelo teste χ^2 com correção de Yates. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS

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

As amostras de soros humanos foram primeiramente distribuídas em três grupos, de acordo com o perfil sorológico da infecção por *T. gondii* determinado pelos resultados 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 3 apresenta os resultados sorológicos obtidos da distribuição de 83 amostras de soro utilizadas neste trabalho. A Figura 3A representa o grupo I, constituído por 30 amostras de soro de pacientes com infecção aguda por *T. gondii*, caracterizada por resultados positivos para anticorpos IgG, IgM e IgA específicos (G+M+A+). A Figura 3B representa o grupo II, constituído por 30 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 3C representa o grupo III, constituído por 23 amostras de soro de indivíduos não infectados por *T. gondii*, caracterizados por resultados negativos para anticorpos IgG, IgM e IgA específicos (G-M-A-).

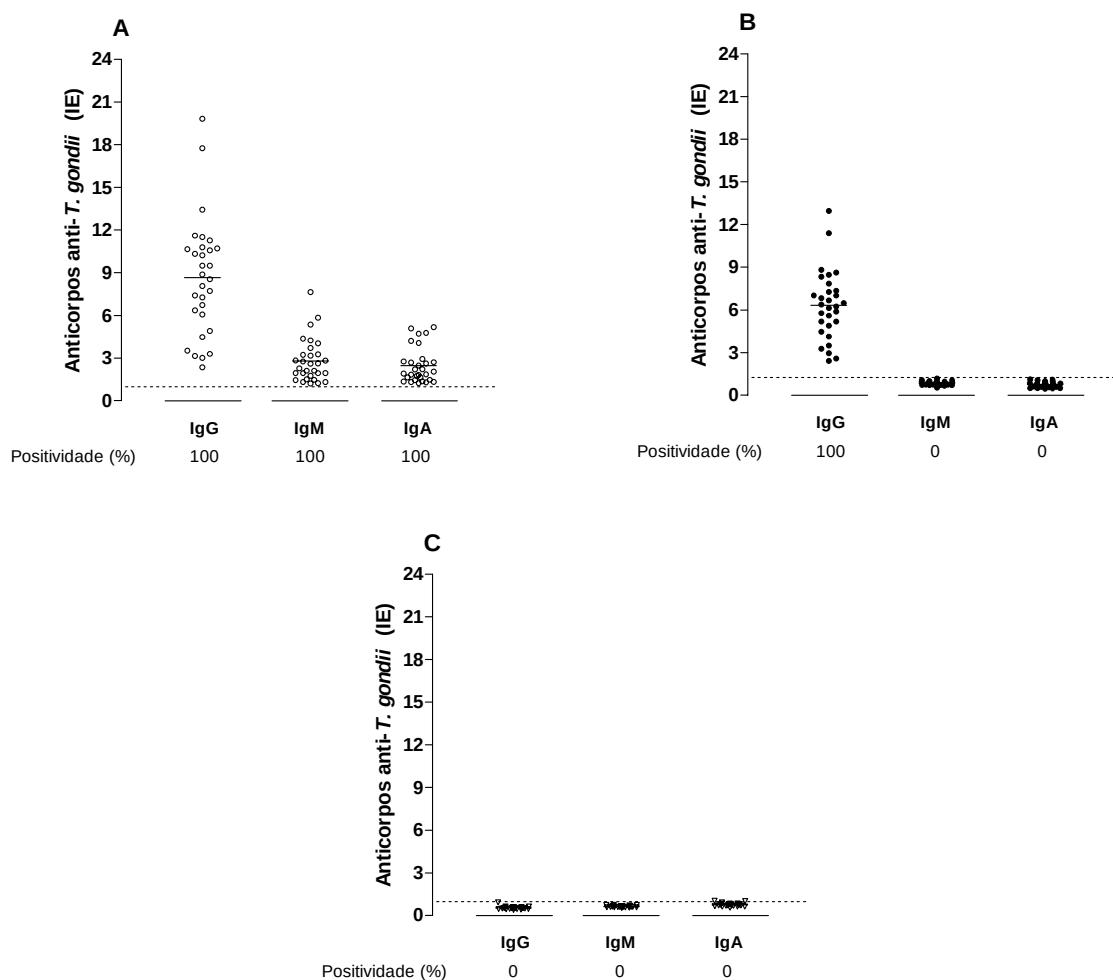


Figura 3. Distribuição das amostras de soros humanos de acordo com o perfil sorológico da infecção por *Toxoplasma gondii*. Um total de 83 amostras de soros foram caracterizadas sorologicamente usando ELISA indireto para a detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* e ELISA de captura para a detecção de anticorpos IgM e IgA específicos. (A) grupo I, constituído por 30 amostras de soros de pacientes com infecção aguda (G+M+A+); (B) grupo II, constituído por 30 amostras de soros de pacientes com infecção crônica (G+M-A-); (C) grupo III, constituído por 23 amostras de soros 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 para cada grupo. As taxas de positividade (%) também estão indicadas para cada ensaio.

4.2 Detecção de anticorpos IgG e IgG1 anti-*T. gondii* por ELISA-STAg, ELISA-SAG2A e ELISA-SAG2AΔ

Os níveis de anticorpos IgG anti-*T. gondii* obtidos pelo ELISA-STAg, ELISA-SAG2A e ELISA-SAG2AΔ foram analisados para cada um dos grupos de amostras de soro humano (Figura 4). Observou-se que, nos dois grupos de amostras de soro com resultados positivos para anticorpos IgG anti-*T. gondii* (I e II), houve uma alta concordância nas taxas de positividade entre os resultados obtidos pelo ELISA-STAg e ELISA-SAG2A em ambas fases, aguda (100% e 93,3%, respectivamente) e crônica (100% e 96,7%, respectivamente). Porém, para ELISA-SAG2AΔ, foi observada uma positividade de somente 10% para anticorpos IgG, tanto em soros de fase aguda como em soros de fase crônica da infecção. Em todos os ensaios, houve concordância total de resultados negativos para as amostras do grupo III (soros não reagentes)(Figura 4A).

Níveis de anticorpos IgG anti-*T. gondii* determinados por ELISA-STAg foram significativamente maiores na fase aguda do que na fase crônica ($P = 0,0141$), enquanto que a comparação entre ambos os grupos de soros revelou diferenças ainda mais evidentes quando estes anticorpos foram determinados por ELISA-SAG2A ($P = 0,0001$) (Figura 4A).

Quando os ensaios ELISA-STAg e ELISA-SAG2A foram comparados dentro do mesmo grupo (fase aguda ou crônica), foi observado um aumento significativo dos níveis de IgG em soros de fase aguda ($P = 0,0287$, Figura 4B) e um decréscimo significativo destes níveis em soros de fase crônica ($P = 0,0016$, Figura 4C) quando analisados por ELISA-SAG2A. Foi calculada a razão entre a média dos níveis de anticorpos IgG determinados por ELISA-STAg e ELISA-SAG2A, resultando em uma baixa razão STAg/SAG2A para soros de fase aguda (0,86) quando comparado com soros de fase crônica (1,57) da infecção.

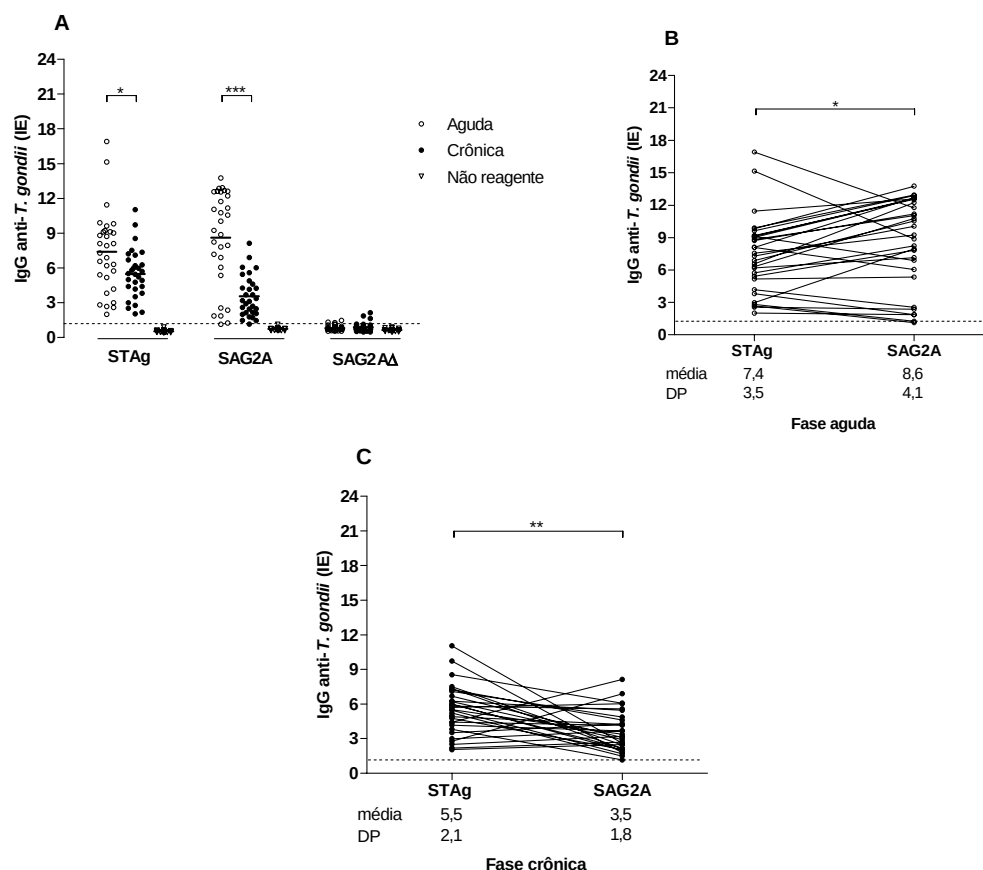


Figura 4. Níveis de anticorpos IgG anti-*T. gondii* determinados por ELISA indireto e expressos em Índice ELISA (IE) usando antígeno solúvel de *Toxoplasma* (STAg), antígeno 2 de superfície recombinante (SAG2A) e antígeno 2 de superfície truncado (SAG2AΔ) em amostras de soros humanos de fases aguda e crônica, e soros não reagentes (A). Análise pareada entre soros de fases aguda (B) e crônica (C) para antígenos STAg e SAG2A. Estas análises foram realizadas em 30 soros de fase aguda, 30 soros de fase crônica e 23 soros não reagentes para toxoplasmose. A barra horizontal em cada grupo indica a média e a linha tracejada indica os valores de *cutoff* (IE > 1,2) para cada ELISA. Significância estatística foi determinada pelo teste *t* de Student não pareado (A) ou pareado (B e C). * p < 0,05; ** p < 0,001; *** p < 0,0001.

Os níveis de anticorpos IgG1 anti-*T. gondii* obtidos por ELISA-STAg para cada um dos grupos de amostras de soro humano foram comparados com os níveis detectados por ELISA-SAG2A (Figura 5). Uma alta concordância foi observada entre ELISA-STAg e ELISA-SAG2A quanto a positividade de anticorpos IgG1 somente em amostras de soros de fase aguda (96,7% e 86,7%, respectivamente). Entretanto, em soros de fase crônica, foram observadas diferenças significantes na positividade de IgG1 apresentada entre os ELISAs (100% e 66.7%, respectivamente; $P = 0,0018$) (Figura 5A). Em ambos ensaios, os níveis de IgG1 para *T. gondii* foram significantemente maiores em soros de fase aguda do que em soros de fase crônica da infecção ($P = 0,0001$).

Considerando a análise comparativa entre ELISA-STAg e ELISA-SAG2A para IgG1 em soros de fase aguda (Figura 5B) e em soros de fase crônica (Figura 5C), foi encontrada uma diminuição significante dos níveis de IgG1 em ambas as fases ($P = 0,0025$ e $P = 0,0001$, respectivamente) quando determinados por ELISA-SAG2A, apresentando uma alta razão STAg/SAG2A entre os dois ensaios para soros de fase crônica (2,93) em comparação com soros de fase aguda (1,37).

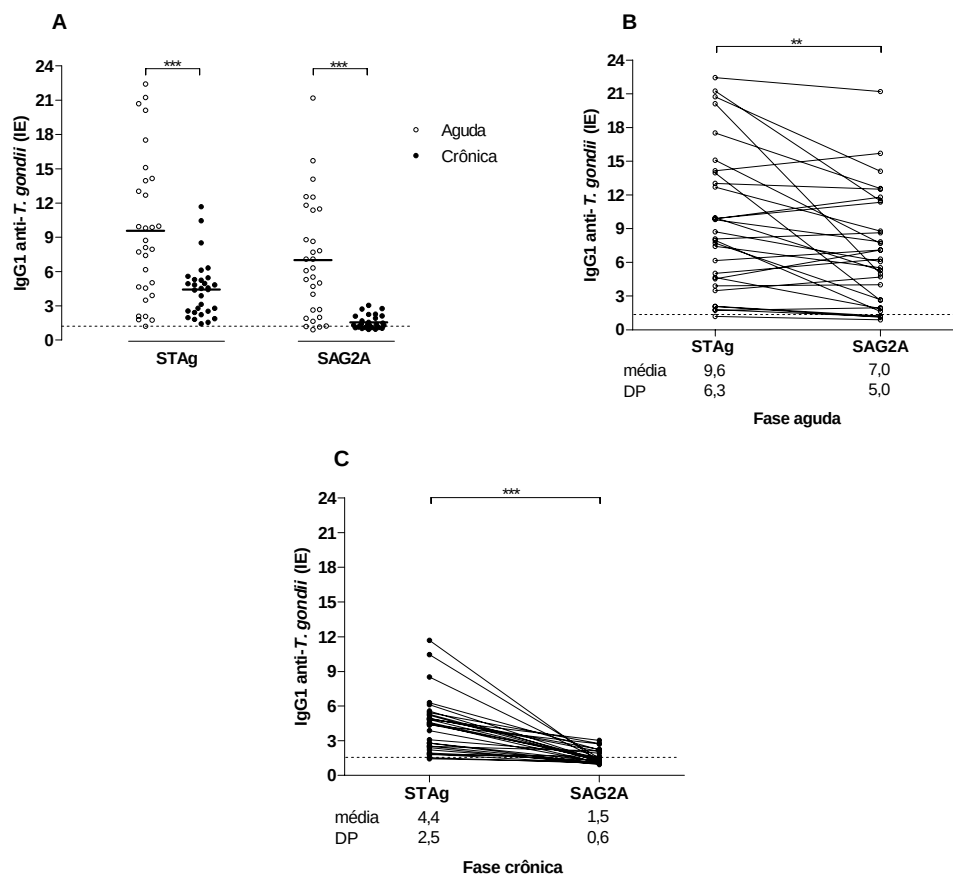


Figura 5. Níveis de anticorpos IgG1 anti-*T. gondii* determinados por ELISA indireto e expressos em Índice ELISA (IE) usando antígeno solúvel de *Toxoplasma* (STAg) e antígeno 2 de superfície recombinante (SAG2A) em amostras de soros humanos de fases aguda e crônica. (A). Análise pareada entre soros de fases aguda (B) e crônica (C) para antígenos STAg e SAG2A. Estas análises foram realizadas em 30 soros de fase aguda e 30 soros de fase crônica para toxoplasmose. A barra horizontal em cada grupo indica a média e a linha tracejada indica os valores de *cutoff* (IE > 1,2) para cada ELISA. Significância estatística foi determinada pelo teste *t* de *Student* não pareado (A) ou pareado (B e C). ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$.

Nas Tabelas 1 e 2 estão apresentados os resultados da avaliação dos soros de pacientes de fase aguda (infecção adquirida, infecção primária durante a gravidez e infecção congênita) e fase crônica, respectivamente, por ELISA-IgG indireto usando o antígeno SAG2A recombinante e por técnicas sorológicas convencionais de diagnóstico (ELISA indireto IgG e ELISA captura IgM e IgA).

Tabela 1. Resultados de ELISA recombinante indireto e técnicas sorológicas convencionais de diagnóstico em soros de pacientes na fase aguda da infecção por *Toxoplasma gondii*.

Amostras de soro	ELISA Indireto IgG-SAG2A (IE) [#]	ELISA Indireto IgG-STAg (IE) [#]	ELISA Captura IgM-STAg (IE) [#]	ELISA Captura IgA-STAg (IE) [#]
Infecção aguda adquirida				
1	8,24	5,73	1,94	1,34
2	7,15	6,19	3,22	2,04
3	2,36	2,57	2,10	1,44
4	1,41	2,68	2,62	1,23
5	12,60	9,01	2,11	1,32
6	8,86	15,14	2,81	1,31
7	12,61	9,12	2,75	4,76
8	2,55	4,18	5,34	1,74
9	12,57	11,45	1,31	4,05
10	11,74	16,90	3,69	1,83
Infecção primária na gravidez				
Mães				
1*	12,55	9,20	4,23	1,47
2	12,22	6,56	4,03	5,16
3	12,87	9,61	4,36	2,68
4*	11,17	8,71	1,95	1,90
5*	12,92	9,89	1,93	2,21
6*	10,54	6,87	2,84	2,47
7	1,25	2,80	1,31	1,62
8	6,89	9,08	1,23	1,62
9*	11,05	8,81	2,59	2,74
10	6,05	8,10	1,2	1,80
11	10,04	7,29	1,46	1,29
Infecção congênita aguda				
Recém nascidos				
1*	5,35	5,17	3,26	2,61
2	1,86	3,81	5,83	2,70
3	13,75	9,81	1,50	4,21
4*	9,24	7,91	2,26	2,19
5*	1,86	2,01	1,43	1,35
6*	7,94	2,99	3,15	4,72
7	12,68	8,10	1,93	1,84
8	7,81	5,41	1,74	2,92
9*	10,76	6,31	7,63	5,08

[#] Valores positivos foram definidos como Índice ELISA (IE) > 1,2; *Amostras de soros pareados de mães e recém nascidos.

Tabela 2. Resultados de ELISA recombinante indireto e técnicas sorológicas convencionais de diagnóstico em soros de pacientes na fase crônica da infecção por *Toxoplasma gondii*.

Amostras de soro	ELISA Indireto IgG-SAG2A (IE) [#]	ELISA Indireto IgG-STAg (IE) [#]	ELISA Captura IgM-STAg (IE) [#]	ELISA Captura IgA-STAg (IE) [#]
Infecção crônica				
1	1,45	2,19	0,53	0,58
2	2,70	9,71	0,72	0,45
3	1,77	2,98	0,66	0,49
4	3,68	5,80	0,69	0,58
5	5,57	7,10	0,91	0,69
6	4,87	4,77	0,88	0,67
7	2,05	2,04	0,73	0,73
8	2,48	11,04	0,87	0,60
9	2,60	5,44	0,81	0,65
10	1,69	5,52	0,94	0,72
11	3,36	7,22	0,79	0,80
12	4,60	7,35	0,72	0,84
13	2,14	3,80	0,80	0,82
14	1,16	4,41	0,74	1,00
15	8,13	6,19	0,75	0,73
16	2,90	2,77	0,70	0,69
17	6,89	4,41	1,16	1,04
18	4,15	2,51	0,81	0,90
19	3,18	8,53	1,04	0,95
20	6,06	5,22	0,74	0,77
21	1,48	3,51	0,91	0,46
22	4,26	4,91	0,82	0,49
23	4,25	5,98	0,82	0,54
24	1,98	4,16	0,83	0,68
25	3,67	6,69	1,04	1,10
26	3,10	7,51	0,98	0,49
27	2,45	6,25	0,76	0,81
28	5,44	5,69	0,96	0,64
29	6,01	5,97	0,90	1,09
30	2,16	5,00	0,74	0,89

[#] Valores positivos foram definidos como Índice ELISA (IE) > 1,2.

4.3 Avaliação da avidéz de anticorpos IgG e IgG1 por ELISA-STAg e ELISA-SAG2A

Em ambos os ensaios, ELISA-STAg e ELISA-SAG2A, a média do índice de avidéz de IgG foi significativamente maior para as amostras de soros da fase crônica do que para as amostras da fase aguda ($P = 0,0001$ para ELISA-STAg e $P = 0,0166$ para ELISA-SAG2A) (Figura 6A). Quando análises comparativas entre os índices de avidéz de IgG para STAg e SAG2A em soros da mesma fase (aguda ou crônica) foram realizadas, diferenças significativas foram encontradas somente para os soros de fase crônica (média de IA = 76,1% para STAg e 66,0% para SAG2A; $P = 0,0082$) (Figura

6C), enquanto para os soros de fase aguda, os índices de avidéz mostraram-se similares (média de IA = 55,5% para STAg e 53,9% para SAG2A) (Figura 6B).

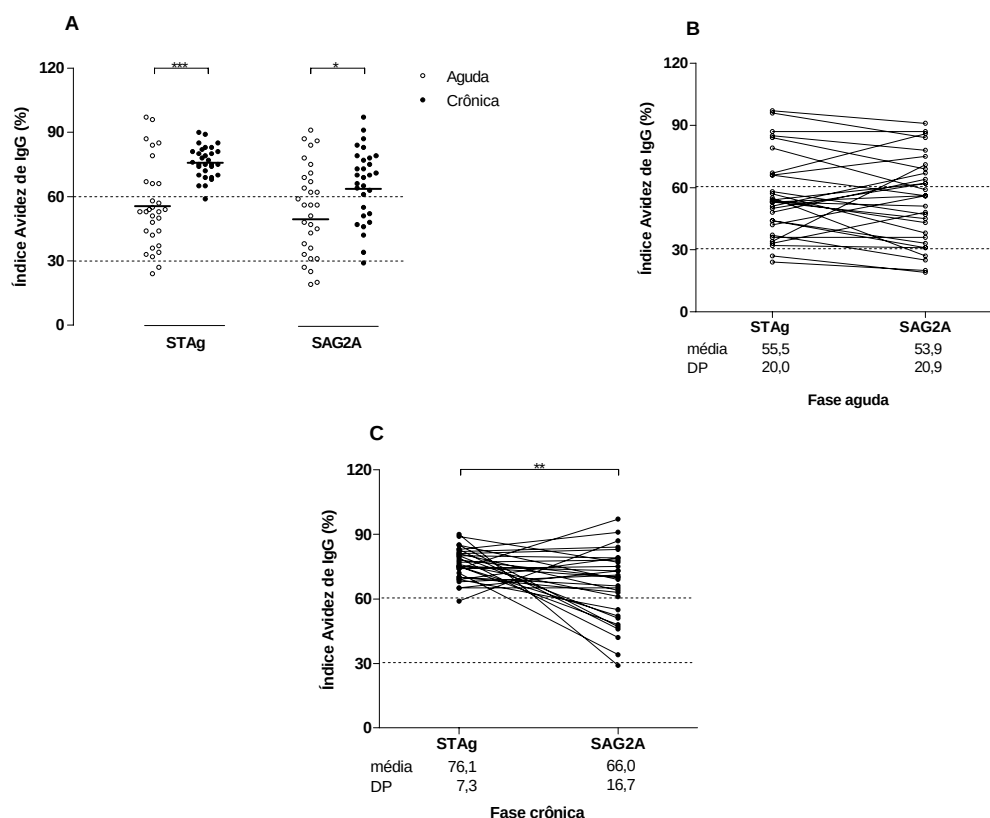


Figura 6. Comparação da avidéz de IgG anti-*T. gondii* determinada por ELISA indireto e expressa em Índice Avidéz (%) usando antígeno solúvel de *Toxoplasma* (STAg) e o antígeno 2 de superfície recombinante (SAG2A) em soros humanos de fase aguda e crônica da infecção (A). Análise pareada entre os soros de fase aguda (B) e crônica (C) para os antígenos STAg e SAG2A. Estas análises foram realizadas em 30 soros de fase aguda e 30 soros de fase crônica para toxoplasmose. A barra horizontal em cada grupo indica a média e a linha tracejada indica os valores limites para os índices de avidéz (IA): baixa (< 30%), intermediária (30 - 60%) e alta (> 60%). Significância estatística foi determinada pelo teste *t* de *Student* não pareado (A) ou pareado (B e C). * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$.

Como mostra a Figura 7 na análise da avidéz de IgG1 entre soros de fases aguda e crônica para os antígenos STAg e SAG2A, observou-se que a média dos índices de avidéz de IgG1 foi significativamente maior em soros de fase crônica do que em soros de fase aguda ($P = 0,0001$) (Figura 7A). Quando ambos os ensaios foram comparados para a mesma fase da doença (aguda ou crônica), diferenças significantes foram encontradas somente para os índices de avidéz de soros de fase crônica (Figura 7C), com maiores valores para SAG2A (média de IA = 78,4%) do que para STAg (média de IA = 59,3%) ($P = 0,0001$). Diferentemente, soros de fase aguda apresentaram índices de avidéz para IgG1 similares (média de IA = 40,5% para STAg e 39,7% para SAG2A) (Figura 7B).

A Tabela 3 sumariza as porcentagem encontradas para as amostras de soro em cada faixa de avidéz (baixa, intermediária e alta) nas fases aguda e crônica, para os antígenos STAg e SAG2A, assim como, para os anticorpos IgG e IgG1 anti-*T. gondii*. Os ensaios de avidéz de IgG em soros de fase crônica demonstraram que ELISA-STAg foi capaz de detectar uma significativamente maior porcentagem de soros na faixa de alta avidéz quando comparado com ELISA-SAG2A (96,7% *versus* 70,0%; $P < 0,0153$), que por sua vez, foi capaz de detectar maiores proporções de soros na faixa de avidéz intermediária (26,7 *versus* 3,3%; $P < 0,0301$) além das faixas de alta avidéz. Por outro lado, ensaios de avidéz de IgG1 demonstraram que ELISA-SAG2A foi capaz de detectar uma maior proporção de soros na faixa de alta avidéz em comparação ao ELISA-STAg (86,7% *versus* 43,3%; $P < 0,0012$). Em soros de fase aguda, nenhum dos ELISAs foi capaz de detectar altas proporções de soros na faixa de baixa avidéz. Contudo, ensaios de avidéz de IgG1 usando os antígenos STAg ou SAG2A parecem demonstrar uma tendência para obtenção de maior proporção de soros com baixa avidéz.

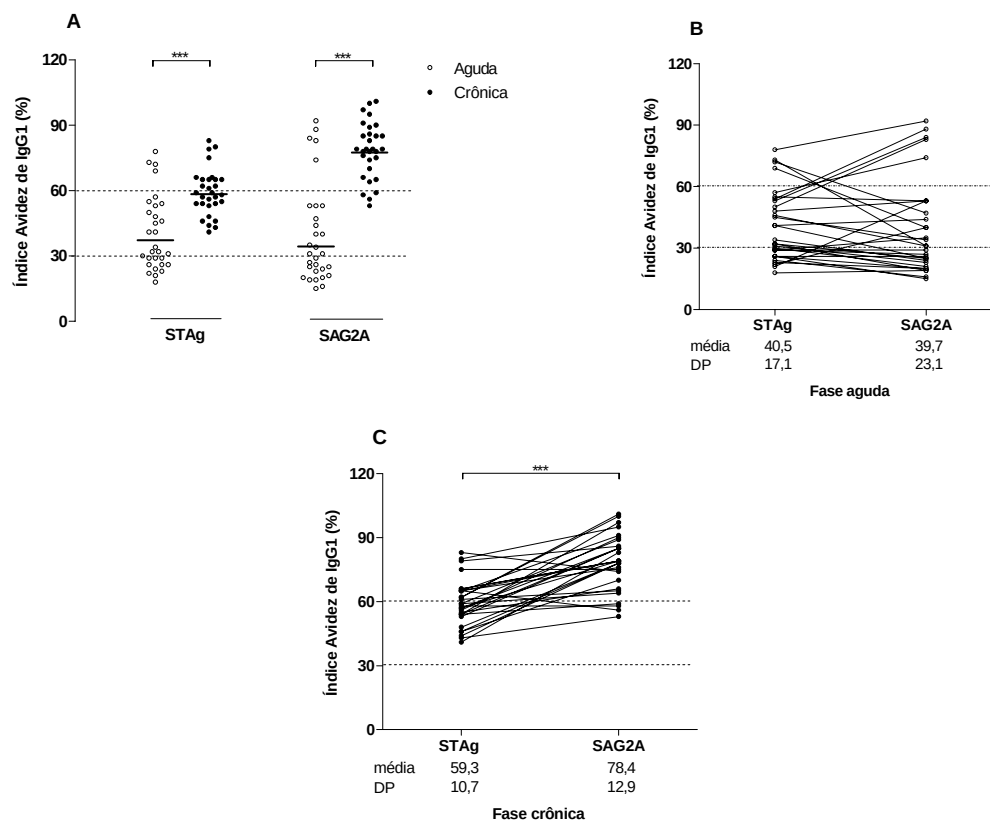


Figura 7. Comparação da avidéz de anticorpos IgG1 anti-*T. gondii* determinada por ELISA indireto e expressa em Índice Avidéz (%) usando antígeno solúvel de *Toxoplasma* (STAg) e o antígeno 2 de superfície recombinante (SAG2A) em soros humanos de fase aguda e crônica da infecção (A). Análise pareada entre os soros de fase aguda (B) e crônica (C) para os antígenos STAg e SAG2A. Estas análises foram realizadas em 30 soros de fase aguda e 30 soros de fase crônica para toxoplasmose. A barra horizontal em cada grupo indica a média e a linha tracejada indica os valores limites para os índices de avidéz (IA): baixa (< 30%), intermediária (30 - 60%) e alta (> 60%). Significância estatística foi determinada pelo teste *t* de *Student* não pareado (A) ou pareado (B e C). *** $p < 0,0001$.

Tabela 3

Porcentagem de amostras de soros com diferentes faixas de avidéz (baixa, intermediária e alta) obtidas em ensaios de avidéz para os anticorpos IgG e IgG1 para os antígenos STAg e SAG2A de *Toxoplasma gondii*.

Faixas de avidéz	Amostras de soro (%)			
	ELISA-IgG		ELISA-IgG1	
	STAg	SAG2A	STAg	SAG2A
Soros de fase aguda				
Baixa (<30%)	6,7	13,3	36,7	46,7
Intermediária (30-60%)	63,3	46,7	50,0	36,7
Alta (>60%)	30,0	40,0	13,3	16,6
Soros de fase crônica				
Baixa (<30%)	0	3,3	0	0
Intermediária (30-60%)	3,3*	26,7	56,7*	13,3
Alta (>60%)	96,7*	70,0	43,3*	86,7

* Diferenças estatisticamente significativas entre os antígenos STAg e SAG2A ($p < 0,05$).

4.4 Análise do perfil dos antígenos STAg, SAG2A e SAG2AΔ por SDS-PAGE e Immunoblot

Análise do perfil eletroforético dos antígenos STAg e SAG2A demonstrou uma banda de 22 kDa para ambos os antígenos, assim como, uma banda mais baixa para o antígeno SAG2AΔ (Figura 8A). Quando estes antígenos foram submetidos ao ensaio de *immunoblot* contra o anticorpo monoclonal A4D12 (Figura 8B) ou com amostras de soros humanos (Figura 8C e 8D) para as fases aguda e crônica da infecção, foram observadas diferenças marcantes nas reatividades destes antígenos. Como demonstrado na Figura 8B, a reatividade para STAg e SAG2A está presente contra o monoclonal

A4D12, enquanto nenhuma reatividade foi observada para o antígeno SAG2AΔ para o mesmo monoclonal.

Quando foi analisada a reatividade dos soros humanos para os anticorpos IgG (Figura 8C) e IgG1 (Figura 8D) contra os antígenos STAg e SAG2A, observou-se que soros de fase aguda (linha 1) apresentaram maior reatividade para o marcador de 22 kDa que os soros de fase crônica (linha 2). Além disso, nenhuma reatividade foi encontrada com soros negativos (linha 3), assim como quando o antígeno SAG2AΔ foi avaliado contra os mesmo grupos de soros.

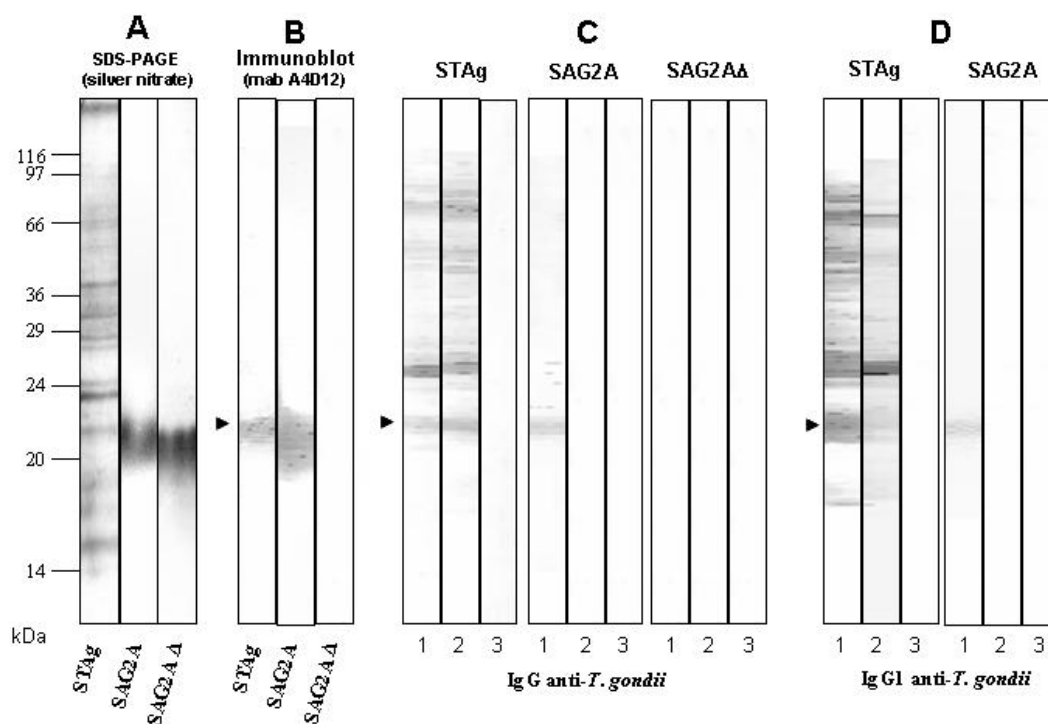


Figura 8. Antígeno solúvel de *Toxoplasma* (STAg), antígeno 2 de superfície recombinante (SAG2A) e antígeno 2 de superfície truncado (SAG2AΔ) resolvidos em SDS-PAGE 12% e corado com nitrato de prata (A) ou revelado por *immunoblot* usando o anticorpo monoclonal A4D12 (B). *Immunoblot* representativo de um *pool* de 5 soros humanos de fase aguda (linha 1), fase crônica (linha 2) e soros negativos para toxoplasmose (linha 3) para os anticorpos IgG (C) e IgG1 (D) específicos a *T. gondii*.

5. DISCUSSÃO

Ensaio sorológicos para determinar a presença de anticorpos específicos são rotineiramente utilizados para diagnosticar infecções recentes ou tardias causadas por *T. gondii* (SENSINI, 2006; CANDOLFI et al., 2007). Visto que o histórico das informações sobre o tempo de infecção pode não ser informativo, todos os resultados dos ensaios imunodiagnósticos serão considerados para representar partes de um quebra-cabeça, onde cada peça tem sua especial significância. Algumas peças, muitas vezes, parecem fora do lugar, sendo que a interpretação do diagnóstico pode ser feita somente quando o quebra-cabeça é considerado como um todo. O diagnóstico da infecção primária durante a gravidez e o diagnóstico de infecção congênita são as situações de maior desafio. Vários fatores que decorrem da evolução heterogênea observada nas respostas sorológicas podem se tornar um problema para a interpretação dos ensaios laboratoriais. Testes simultâneos para os anticorpos IgG e IgM específicos para *T. gondii* realizados em amostras seriadas de soros, coletadas com um intervalo de três semanas, são constituintes de uma etapa inicial para uma caracterização da fase de infecção pelo parasito. A decisão pela realização de testes sucessivos adicionais em busca de resultados mais conclusivos será dependente destes resultados iniciais. Além disso, a presença, permanência e caracterização de determinados marcadores sorológicos podem variar dependendo do tempo de infecção, da instituição de tratamento quimioterápico materno durante a gravidez ou neonatal, uma vez que estes eventos podem bloquear ou retardar o desenvolvimento da resposta imune adaptativa (SENSINE, 2006; PETERSEN, 2007).

A utilização de diferentes antígenos recombinantes produzidos a partir da expressão destes em sistemas procarióticos, particularmente em *E. coli*, já está descrita na literatura. Estes estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de avaliar o uso

potencial destes antígenos como marcadores diagnósticos na infecção por *T. gondii*, de maneira a permitir a detecção de anticorpos humanos específicos direcionados contra determinados antígenos alvos, determinando assim a fase da doença (BEGHETTO et al., 2003; NIGRO et al., 2003; PIETKIEWICZ et al., 2004; BEGHETTO et al., 2006). No presente estudo, foi avaliada a reatividade de anticorpos IgG e IgG1 por ensaios de ELISA e *immunoblot* em amostras de soros, caracterizadas como pertencentes a pacientes em fases aguda e crônica de toxoplasmose, contra dois antígenos recombinantes clonados e expressados em *E. coli*, os quais foram denominados SAG2A, uma molécula recombinante total, e SAG2AΔ, correspondendo a molécula recombinante SAG2A com a deleção do epítipo reconhecido pelo monoclonal A4D12. Além disso, foi comparado o desempenho de ambos antígenos recombinantes com o antígeno solúvel do parasita, STAg. Nossos resultados demonstraram que anticorpos pertencentes ao isotipo IgG de soros de pacientes com fase aguda da toxoplasmose reagem mais fortemente com ambos antígenos STAg e SAG2A do que soros de pacientes com fase crônica. Esta diferença foi ainda mais evidente quando o ensaio imunoenzimático ELISA foi utilizado para a detecção de anticorpos do tipo IgG1, particularmente para o antígeno recombinante SAG2A.

A presença de marcadores potenciais de fase aguda da toxoplasmose também tem sido descritos em estudos recentes com os antígenos recombinantes MAG1 e GRA2 (HOLEC et al., 2007; GOLKAR et al., 2007). Contudo, nenhum estudo foi realizado até o presente para demonstrar a presença de subclasses de IgG, assim como a determinação de avidéz para estes isotipos, utilizando antígenos recombinantes.

No presente estudo, foi encontrada alta sensibilidade (95%) e especificidade (100%) para a detecção de anticorpos IgG pelo ensaio ELISA indireto utilizando o antígeno recombinante SAG2A para todas as amostras de soros em relação ao mesmo

teste utilizando antígeno solúvel, STAg. Considerando o ensaio ELISA indireto para IgG1 utilizando o antígeno recombinante SAG2A, foi encontrada uma sensibilidade relativamente menor (78%), mas alta especificidade (100%), quando comparado com o ensaio ELISA-STAg. Quando esta sensibilidade foi analisada separadamente para as fases agudas e para as fases crônicas, foi encontrado um valor significativamente maior para a sensibilidade do ensaio em soros de fase aguda (90%) do que em soros de fase crônica (67%). Estes resultados sugerem que o antígeno recombinante SAG2A pode ser um marcador potencial para a fase aguda de toxoplasmose, especialmente para a detecção de anticorpos IgG1 específicos para SAG2A. Dos estudos prévios analisados na literatura, observa-se que resultados semelhantes em termos de sensibilidade foram obtidos somente quando se utilizam ensaios contendo mais de um antígeno recombinante simultaneamente como GRA1, GRA2, GRA6, GRA7, p35 e SAG1 (PIETKIEWICZ et al., 2004; HISZCZYNSKA-SAWICKA et al., 2005; GOLKAR et al., 2007). Em somente um estudo resultados semelhantes aos obtidos no presente trabalho foram obtidos utilizando um antígeno recombinante de matriz parasitária, o MAG1 (HOLEC et al., 2007). Em recente estudo, antígenos recombinantes quiméricos, resultantes da união de epítomos imunodominantes de diversos componentes de *T. gondii* - MIC2, MIC3, M2AP, GRA3, GRA7 e SAG1 - apresentaram resultados satisfatórios para a detecção de anticorpos IgG e IgM, sendo comparáveis aos ensaios que utilizam extratos contendo componentes nativos totais deste parasito (BEGHETTO, et al., 2006). Embora estes autores discutam as vantagens de se obter antígenos quiméricos, por serem mais facilmente padronizáveis, quando comparados aos antígenos convencionais que estão atualmente disponíveis, existe também a possibilidade de não se obter lotes de antígenos quiméricos homogêneos. Além disto, quando se utiliza uma preparação contendo a expressão de um único componente

parasitário recombinante, há uma maior probabilidade de se manter um melhor controle de qualidade da proteína expressa, desde que esta tenha sido comprovadamente caracterizada como imunodominante.

Considerando-se que baixos títulos de IgM são detectados hoje em dia em muitos casos por períodos que ultrapassam a fase aguda da infecção, a confirmação da presença de anticorpos IgM em amostras de soros humanos está se tornando um critério inadequado para o diagnóstico da fase aguda de toxoplasmose (LIESENFELD et al., 2001) e por esta razão, a determinação da avidéz de anticorpos IgG tem se tornado uma importante ferramenta alternativa de diagnóstico (HEDMAN et al., 1989; LIESENFELD et al., 2001). Todavia, os estudos até aqui desenvolvidos demonstram que anticorpos IgG que são sintetizados contra os diversos antígenos de *T. gondii* diferem quanto a sua característica de maturação (VILLAVEDRA et al., 1999; MARCOLINO et al., 2000). Além disso, a ampliação do uso de testes que mensuram a avidéz para anticorpos IgG específicos para *T. gondii* não tem levado em conta determinados problemas inerentes a este teste. Por exemplo, já está descrito na literatura que a maturação da resposta imune, que resulta na síntese de IgG após a infecção primária para *Toxoplasma*, apresenta diferenças importantes na capacidade de ligação (índice de avidéz) entre os indivíduos infectados. Assim, existem estudos que demonstram que duas mães recém soroconvertidas já apresentavam maior maturação do índice de avidéz para anticorpos IgG no primeiro exame realizado, mas muitos pacientes somente desenvolvem tal maturação com 180 dias após a infecção (JENUM et al., 1997; JENUM et al., 1998). Os resultados de avidéz para os anticorpos IgG em outros estudos demonstraram que a persistência de índices de baixa avidéz para os anticorpos IgG, também caracteriza um problema para o diagnóstico, pelo menos em mulheres grávidas que receberam tratamento durante a gravidez, onde durante um longo

tempo baixos índices de avidéz são comumente encontrados (ROBERT et al., 2001). Além disso, cerca de 50% dos pacientes com infecção aguda podem apresentar baixos índices e índices no limites de avidéz para anticorpos IgG durante seis meses após a infecção (LAPPALAINEN et al., 1993). Quando a variação dos índices de avidéz dos anticorpos IgG durante o tratamento em gestantes ou em pacientes na fase aguda na infecção foi comparada com gestantes ou pacientes não tratados, observou-se uma significância maior na rapidez do processo de maturação da avidéz para anticorpos IgG durante os primeiros quatro meses após a infecção em gestantes não tratadas ou não grávidas em comparação com as gestantes tratadas (PETERSEN et al., 2005). O atraso na maturação da avidéz em gestantes tratadas, comparada com gestantes não tratadas e mulheres não grávidas, tem sido reportado em outro estudo (HEDMAN et al., 1989). Assim, é evidente que os ensaios de avidéz para IgG necessitam maiores estudos para o seu pleno desenvolvimento, inclusive com a possibilidade destes ensaios serem também realizados com antígenos recombinantes imunodominantes (PETERSEN et al., 2005; PETERSEN, 2007; CANDOLFI et al., 2007).

No presente estudo, pudemos observar que ensaios de avidéz para os anticorpos IgG e IgG1 com ambos antígenos – STAg nativo e SAG2A recombinante - foram capazes de diferenciar amostras de soros de fase aguda de amostras de soros de fase crônica de toxoplasmose, enquanto que a proporção de soros com baixa avidéz encontrada na fase aguda foi ainda maior quando anticorpos IgG1 foram analisados para ambos os ensaios ELISA-STAg e ELISA-SAG2A. Em contraste, considerando os soros de fase crônica, a avidéz dos anticorpos IgG utilizando o antígeno STAg foi melhor para caracterizar soros com alta avidéz, enquanto que, para este propósito, os ensaios de avidéz para os anticorpos IgG1 utilizando o antígeno recombinante SAG2A apresentaram a melhor performance.

6. CONCLUSÕES

- O antígeno SAG2A recombinante, assim como o antígeno solúvel (STAg) é capaz de diferenciar indivíduos infectados e não infectados por *T. gondii*, podendo ser empregado como diagnóstico qualitativo desta infecção quando utilizado o teste ELISA na pesquisa de anticorpos IgG.
- O antígeno SAG2A recombinante mostrou ser capaz de diferenciar amostras de soros de pacientes com toxoplasmose aguda de pacientes com toxoplasmose crônica.
- A determinação dos títulos e da avidéz de anticorpos IgG1 frente ao antígeno recombinante SAG2A demonstrou ser uma potencial ferramenta para a caracterização da fase aguda da infecção por toxoplasmose.
- O epítipo reconhecido pelo anticorpo monoclonal A4D12 que foi deletado da molécula SAG2A mostrou ser essencial e crítico para o reconhecimento da molécula total de SAG2A.

REFERÊNCIAS

- ALIBERTI, J. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. **Nature Reviews**, 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**, 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**, v. 51, n. 4, p. 312-315, 1998.
- BARRAGAN, A.; SIBLEY, L. D. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. **The Journal of Experimental Medicine**, 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**, v. 41, n. 12, p. 5414-5418, 2003.
- BEGHETTO, E.; SPADONI, A.; BRUNO, L.; BUFFOLANO, W.; GARGANO, N. Chimeric antigens of *Toxoplasma gondii*: toward standardization of toxoplasmosis serodiagnosis using recombinant products. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 2133-2140, 2006.
- BOOTHROYD, J. C.; HEHL, A.; KNOLL, L. J.; MANGER, I. D. The surface of *Toxoplasma gondii*: more or less. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 1, p. 3-9, 1998.
- BUFFOLANO, W.; LAPPALAINEN, M.; HEDMAN, L.; CICCIMARRA, F.; PEZZO, M. D.; RESCALDANI, R.; GARGANO, N.; HEDMAN, K. Delayed maturation of IgG avidity in congenital toxoplasmosis. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease**, v. 23, n. 11, p. 825-830, 2004.
- BULOW, R.; BOOTHROYD, J. C. Protection of mice from fatal *Toxoplasma gondii* infection by immunization with P30 antigens in liposomes. **Journal of Immunology**, 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**, 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**, v. 105, n. 6, p. 1032-1037, 1998.

BUXTON, D.; McALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P. The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends in Parasitology**, 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**, 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**, 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**, 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**, v. 33, n. 3, p. 213-218, 1991.

CANDOLFI, E.; PASTOR, R.; HUBER, R.; FILISETTI, D.; VILLARD, O. IgG avidity assay firms up the diagnosis of acute toxoplasmosis on the first serum sample in immunocompetent pregnant women. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 58, n. 1, p. 83-88, 2007.

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**, v. 269, n. 23, p. 16217-16222, 1994.

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**, v. 321, n. 7254, p. 142-147, 2000.

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

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

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

DI CRISTINA, M.; DEL PORTO, P.; BUFFOLANO, W.; SPADONI, A.; GUGLIETTA, S.; PICCOLLELA, E.; FELICI, F.; GARGANO, N. The *Toxoplasma gondii* bradyzoite antigens BAG1 and MAG1 induce early humoral and cell-mediated immune responses upon human infection. **Microbes and Infection**, v. 6, n. 2, p. 164-171, 2004.

DOYLE, J.J.; DOYLE J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.

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

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

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

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**, 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**, v. 89, n. 4, p. 851-853, 2003a.

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**, v. 117, n. 3, p. 229-234, 2003b.

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**, v. 89, n. 5, p. 1063-1064, 2003c.

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

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**, v. 90, n. 4, p. 721-726, 2004.

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**, v. 134, n. 1-2, p. 67-72, 2005a.

DUNN, D.; WALLON, M.; PEYRON, F.; PETERSEN, E.; PECKHAM, C.; GILBERT, R. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. **Lancet**, 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**, v. 41, n. 10, p. 4826-4828, 2003.

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**, 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**, v. 791, p. 402-407, 1996.

FULTON, J. D.; TURK, J. L. Direct agglutination test for *Toxoplasma gondii*. **Lancet**, 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**, 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**, v. 35, n. 5, p. 1276-1277, 1997.

GOLKAR, M.; RAFATI, S.; ABDEL-LATIF, M. S.; BRENIER-PINCHART, M. P.; FRICKER-HIDALGO, H.; SIMA, B. K.; BABAIE, J.; PELLOUX, H.; CESBRON-DELAUW, M. F.; MERCIER, C. The dense granule protein GRA 2, a new marker for the serodiagnosis of acute *Toxoplasma* infection: comparison of sera collected in both France and Iran from pregnant women. **Diagnostic Microbiology and Infection Disease**, v. 58, n. 4, p. 419-426, 2007.

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

GROSS, U.; KEKSEL, O.; DARDÉ, M. L. Value of detecting immunoglobulin E antibodies for the serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 4, n. 3, p. 247-251, 1997.

HARNING, D.; SPENTER, J.; METSIS, A.; VUUST, J.; PETERSEN, E. Recombinant *Toxoplasma gondii* surface antigen 1 (P30) expressed in *Escherichia coli* is recognized by human *Toxoplasma*-specific immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 3, n. 3, p. 355-357, 1996.

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**, 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.

HISZCZYNSKA-SAWICKA, E.; KUR, J.; PIETKIEWICZ, H.; HOLEC, L.; GASIOR, A.; MYJAK, P. Efficient production of the *Toxoplasma gondii* GRA6, p35 and SAG2 recombinant antigens and their applications in the serodiagnosis of toxoplasmosis. **Acta Parasitologica**, v. 50, p. 249-254, 2005.

HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology and Infection**, 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**, 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**, v. 331, n. 11, p. 695-699, 1994.

HOLEC, L.; HISZCZYNSKA-SAWICKA, E.; GASIOR, A.; BRILLOWSKA-DABROSKA, A.; KUR, J. Use of MAG1 recombinant antigen for diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in humans. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 3, p. 220-225, 2007.

HOLLAND, G. N. Reconsidering the pathogenesis of ocular toxoplasmosis. **American Journal of Ophthalmology**, 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**, v. 30, n. 1, p. 69-75, 2000.

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

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**, v. 35, n. 6, p. 1411-1414, 1997.

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

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**, v. 71, n. 11, p. 6222-6228, 2003.

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

JENUM, P.A.; STRAY-PEDERSEN, B.; GUNDERSEN, A. G. Improved diagnosis of primary *T. gondii* infection in early pregnancy by determination of anti-*Toxoplasma* immunoglobulin G avidity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 8, p. 1972-1977, 1997.

JENUM, P.A.; STRAY-PEDERSEN, B.; MELBY, K. K. Incidence of *Toxoplasma gondii* infection in 35,940 pregnant women in Norway and pregnancy outcome for infected women. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 10, p. 2900-2906, 1998.

JUNG, C.; LEE, C. Y.; GRIGG, M. E. The SRS superfamily of *Toxoplasma* surface proteins. **International Journal for Parasitology**, 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**, 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**, v. 134, n. 5, p. 3426-3431, 1985.

KEELEY, A.; SOLDATI, D. The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa. **Trends in Cell Biology**, 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**, v. 43, n. 12, p. 5881-5887, 2005.

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

KRAVETZ, J. D.; FEDERMAN, D. G. Toxoplasmosis in pregnancy. **The American Journal of Medicine**, 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**, 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**, v. 167, n. 3, p. 691-697, 1993.

LEKUTIS, C.; FERGUSON, D. J. P.; BOOTHROYD, J.C. *Toxoplasma gondii*: identification of a developmentally regulated family of genes related to SAG2. **Experimental Parasitology**, v. 96, n. 2, p. 89-96, 2000.

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**, v. 71, n. 11, p. 6615-6619, 2003.

LIESENFELD, O. Immune responses to *Toxoplasma gondii* in the gut. **Immunobiology**, 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**, 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**, 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**, v. 329, n. 14, p. 995-1000, 1993.

LYONS, R. E.; MCLEOD, R.; ROBERTS, C. W. *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 5, p. 198-201, 2002.

MANGER, I. D.; HEHL, A. B.; BOOTHROYD, J. C. The surface of *Toxoplasma* tachyzoites is dominated by a family of glycosylphosphatidylinositol-anchored antigens related to SAG1. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 5, p. 2237-44, 1998.

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

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**, 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**, 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**, 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**, 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**, v. 79, n. 3, p. 351-361, 1994.

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**, v. 176, n. 3, p. 555-559, 1997.

MOMBRO, M.; PERATHONER, C.; LEONE, A.; BUTTAFUOCO, 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**, v. 162, n. 10, p. 703-706, 2003.

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

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

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**, v. 190, n. 12, p. 1783-1792, 1999.

NAGEL, S. D.; BOOTHROYD, J. C. The major surface antigen, P30 of *Toxoplasma gondii* is anchored by a glycolipid. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 10, p. 5569-74, 1989.

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 organisms voisins) du gondi. **C. R. Hebd Séances Academy Sciences**, v. 147, p. 763-766, 1908.

NIGRO, M.; GUTIERRES, A.; HOFFER, A. M.; CLEMENTE, M.; KAUFER, F.; CARRAL, J.; MARTIN, V.; GRARNERA, E. A.; ANGEL, S.O. Evaluation of *Toxoplasma gondii* recombinant proteins for the diagnosis of recently acquired toxoplasmosis by an immunoglobulin G analysis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 47, n. 4, p. 609-613, 2003.

PARMLEY, S. F.; SGARLATO, G. D.; MARK, J.; PRINCE, J. B.; REMINGTON, J. S. Expression, characterization, and serologic reactivity of recombinant surface antigen P22 of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 5, p. 1127-1133, 1992.

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**, 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**, 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**, v. 81, n. 1, p. 58-67, 2006.

PETERSEN, E.; BOROBIO, M. V.; GUY, E. European multicentre study of the Liaison automated diagnostic system for determination of specific IgG, IgM and IgG-avidity index in toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1570-1574, 2005.

PETERSEN, E. Toxoplasmosis. **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**, v. 12, n. 2, p. 214-223, 2007.

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**, 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**, v. 327, n. 23, p. 1643-1648, 1992.

PRINCE, J. B.; AUER, K. L.; KUSKINSON, J.; PARMLEY, S. F.; ARAUJO, F. G.; REMINGTON, J. S. Cloning, expression, and cDNA sequence of surface antigen P22 from *Toxoplasma gondii*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 43, n. 1, p. 97-106, 1990.

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, p. 205-346, 2001.

REMINGTON, J. S.; THULLIEZ, P.; MONTOYA, J. G. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, 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**, 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**, v. 63, n. 7, p. 2549-2555, 1995.

ROBERTS, A.; LUYASU, V.; ZUFFREY, J.; HEDMAN, K.; PETERSEN, E.; The European Network on Congenital Toxoplasmosis. Potential of the specific markers in the early diagnosis of *Toxoplasma* infection: a multicentre study using combination of isotype IgG, IgM, IgA and IgE with values of avidity assay. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease**, v. 20, n. 7, p. 467-474, 2001.

SABIN, A.; FELDMAN, H. A. Dyes as microchemical indicators of anil immunity phenomenon affecting a protozoan parasitic (*Toxoplasma*). **Science**, 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**, v. 21, n. 10, p. 476-481, 2005.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.

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**, 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**, 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**, 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**, v. 2, n. 1, p. 25-29, 1996.

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

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**, v. 29, n. 10, p. 1509-1519, 1999.

SPLENDRE, 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**, v. 3, p. 109-112, 1908.

STONE, W. B.; MANWELL, R. D. Toxoplasmosis in cold-blooded hosts. **The Journal of Protozoology**, 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**, v. 299, n. 5605, p. 414-416, 2003.

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

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**, v. 173, n. 1, p. 265-268, 1996.

SWISHER, C. N.; BOYER, K.; McLEOD, R. Congenital toxoplasmosis. **Seminars in Pediatric Neurology**, 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**, 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**, 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**, v. 31, n. 2, p. 155-161, 2001.

TOMAVO, S.; SCHWARZ, R. T.; DUBREMETZ, J. F. Evidence for glycosylphosphatidylinositol anchoring of *Toxoplasma gondii* major surface antigens. **Molecular and Cellular Biology**, v. 9, n. 10, p. 4576-80, 1989.

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**, 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**, 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**, 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**, 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**, v. 318, n. 7197, p. 1511-1514, 1999.

VILLAVEDRA, M.; BATTISTONI, J.; NIETO, A. IgG recognizing 21–24 kDa and 30–33 kDa tachyzoite antigens show maximum avidity maturation during natural and accidental human toxoplasmosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 41, n. 5, p. 297–303, 1999.

YUEN, K. C.; JOHNSON, T. K.; DENELL, R. E.; CONSIGLI, R. A. A silver-staining technique for detecting minute quantities of proteins on nitrocellulose paper: retention of antigenicity of stained proteins. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 2, p. 398-402, 1982.