



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

STHEFANY PAGLIARI

**AVALIAÇÃO DO ANTÍGENO RECOMBINANTE ROP2 DO  
*Toxoplasma gondii* NO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA  
DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG E IgM EM SORO  
HUMANO**

---

Londrina  
2013

STHEFANY PAGLIARI

**AVALIAÇÃO DO ANTÍGENO RECOMBINANTE ROP2 DO  
*Toxoplasma gondii* NO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA  
DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG E IgM EM SORO  
HUMANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (área de concentração - Sanidade Animal) do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Italmir Teodorico Navarro  
Co-orientador: Profa. Dra. Edna Maria Vissoci Reiche

Londrina  
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

P138a Pagliari, Sthefany.  
Avaliação do antígeno recombinante ROP2 do *Toxoplasma gondii* no ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos IgG e IgM em soro humano / Sthefany Pagliary. – Londrina, 2013.  
57 f. : il.

Orientador: Itamar Teodorico Navarro.  
Co-orientador: Edna Maria Vissoci Reiche.  
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2013.  
Inclui bibliografia.

1. Toxoplasmose – Teses. 2. *Toxoplasma gondii* – Teses. 3. Imunoglobulina M. – Teses. 4. Teste imunoenzimático – Teses. I. Navarro, Itamar Teodorico. II. Reiche, Edna Maria Vissoci. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.

CDU 616.993

STHEFANY PAGLIARI

**AVALIAÇÃO DO ANTÍGENO RECOMBINANTE ROP2 DO  
*TOXOPLASMA GONDII* NO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA  
DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG E IgM EM SORO HUMANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (área de concentração - Sanidade Animal) do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Itamar Teodorico Navarro  
UEL – Londrina – PR

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Regina Mitsuka Breganó  
UEL – Londrina – PR

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Fabiana Maria Ruiz Lopes Mori  
UNIFIL – Londrina – PR

Londrina, 13 de Julho de 2013.

**AOS MEUS PAIS!**

## AGRADECIMENTOS

*À Deus pela vida abençoada que tenho e por guiar sempre meus caminhos.*

*Aos meus pais Ossiris A. Pagliari e Beatriz A. Pagliari pelo exemplo de amor, dedicação e determinação em todos os momentos que mais precisei durante esses longos anos em que estive tão longe.*

*Ao meu amado irmão por ter ficado em casa e cuidado da nossa família*

*Ao prof. Dr. Itamar Teodorico Navarro pela orientação dada ao longo do mestrado e principalmente por ter confiado na minha capacidade.*

*À co-orientadora prof. Dr.<sup>a</sup> Edna Maria Vissoci Reiche, pelos ensinamentos, apoio, amizade e animação durante todos os dias do experimento.*

*Às professoras, Dr.<sup>a</sup> Regina Mitsuka Breganó e Dr.<sup>a</sup> Fabiana Maria Ruiz Lopes Mori pela disposição, auxílio e conhecimentos indispensáveis nas correções deste trabalho.*

*Aos professores Dr. João Luis Garcia e Dr.<sup>a</sup> Roberta Lemos Freire pelo auxílio durante todo o mestrado.*

*À doutoranda Fernanda Evers, pela amizade, companheirismo e cumplicidade desde o começo de tudo.*

*Ao Victor Bittencourt Dutra Tabacow pelo incentivo, apoio e amor.*

*Ao ex-doutorando e agora prof. Dr Alexey Bogado pela enorme paciência e ensinamentos transmitidos.*

*À mestranda, Aline Kuhn Sbruzzi Pasquali pela ajuda dada nos intermináveis dias de ELISA.*

*À doutoranda Ana Paula Kallaur pela ajuda indispensável.*

*Aos amigos estagiários, mestrandos, doutorandos e técnicos do Laboratório de Protozoologia e Zoonoses e Saúde Pública, Ana Sue Sammi, Ana Caroline Miura, Thaís Cabral, Jonatas Campos de Almeida, Denise Nascimento, Patrícia Sucupira, Dauton Luiz Zulpo, Luiz Daniel de Barros, Sérgio Tosi Cardim obrigada pela amizade e horas de risadas proporcionadas.*

*À todos os técnicos e professores do Setor de Imunologia Clínica do Laboratório de Análises Clínicas, do Hospital Universitário da UEL, em especial à Cíntia, Aguiar e Eliel.*

*À secretaria da Pós Graduação de Medicina Veterinária Helenice Kieski.*

*Ao Prof. Dr. José Roberto Mineo e aos colegas do laboratório de Imunoparasitologia da UFU pela recepção e essencial colaboração neste trabalho.*

***À TODOS MUITO OBRIGADA!***

PAGLIARI, Sthefany. **Avaliação do antígeno recombinante ROP2 do *Toxoplasma gondii* no ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos IgG e IgM em soro humano.** 2013. 57 f. Dissertação (Mestrado Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, 2013.

## RESUMO

O *Toxoplasma gondii* é um parasito intracelular obrigatório de distribuição mundial que possui a capacidade de invadir uma enorme variedade de hospedeiros tendo os Felídeos como hospedeiros definitivos. O homem pode adquirir a infecção por meio da ingestão de oocistos esporulados presentes no meio ambiente, ingestão de cistos teciduais e pela via transplacentária. A transmissão congênita ocorre quando a mãe se infecta pela primeira vez durante o período da gestação, na maioria das vezes apresenta-se assintomática e tem o diagnóstico da infecção confirmado por exames imunológicos para pesquisa de anticorpos específicos contra o *T. gondii*. A elevada sensibilidade dos métodos imunológicos disponíveis atualmente, como o ensaio imunoenzimático de captura de IgM ou quimioluminescência, trouxe a realidade da presença de anticorpos IgM anti-*T. gondii* residuais, que pode levá-la à interpretação incorreta no diagnóstico final. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o emprego da proteína recombinante de roptrias ROP2 de *T. gondii* (rROP2) em um ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto para a detecção de anticorpos específicos das classes IgM e IgG contra este antígeno em amostras de soro humano e comparar os resultados obtidos com o antígeno rROP2 aos obtidos com antígeno total solúvel do *T. gondii* (ELISA-STAg), na imunofluorescência indireta (IFI) e quimioluminescência (CMIA). Foram avaliadas amostras de soro divididas em quatro grupos, de acordo com o perfil de anticorpos obtidos nos métodos de IFI e CMIA para detecção de IgG e IgM anti-*T. gondii* e avidéz de IgG. No grupo I foram incluídas 72 amostras compatíveis com a fase aguda; no grupo II, 207 amostras compatíveis com fase crônica; grupo III, com 110 amostras de indivíduos não expostos ao *T. gondii* e grupo IV, com 21 amostras de pacientes com diagnóstico de outras doenças infecciosas ou autoimunes. Na detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii* pelo ELISA-rROP2 IgM, foi encontrada positividade de 94,3% (67/71) no grupo I e de 62,2% (99/159) em amostras do grupo II. Na detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* pelo ELISA-rROP2, as amostras do grupo I apresentaram positividade de 72,2% (52/72) e as amostras do grupo II apresentaram 77,2% (122/158) de positividade. No ELISA-rROP2 IgG, apenas as amostras do grupo IV, com outras doenças não relacionadas ao *T. gondii*, foram discriminadas. Quando os resultados obtidos foram comparados com a CMIA, a ELISA rROP2 IgM apresentou 92,5% de sensibilidade e 38,3% de especificidade. Quando os resultados obtidos foram comparados com a IFI, o ELISA rROP2 IgG apresentou 75,6% de sensibilidade e 33,3% de especificidade e quando comparado com a CMIA, o ELISA rROP2 IgG apresentou 75,2% de sensibilidade e 32,9% de especificidade. O método de CMIA foi capaz de detectar um maior número de amostras com reatividade aos anticorpos IgG anti-*T. gondii* do que a IFI, apresentando sensibilidade de 99,2%, especificidade de 82,7% e concordância kappa de 0,86. Os resultados obtidos indicam que a CMIA mostrou -se capaz de caracterizar, de forma clara, as diferentes fases da infecção pelo *T. gondii*, sendo mais sensível que a IFI. Os resultados demonstraram que o ELISA-rROP2 fornece positividade para ambas as fases de infecção (aguda e crônica). No entanto, na determinação dos níveis de anticorpos IgM pelo ELISA-rROP2, observou-se uma diferença significativa nos níveis de IgM entre os grupos de amostras de infecção aguda *versus* crônica ( $p < 0,0001$ ) e aguda *versus* negativo ( $p < 0,0001$ ), demonstrando, portanto, uma maior afinidade por anticorpos pertencentes à fase aguda da infecção.

**Palavras-chave:** *T. gondii*. Diagnóstico sorológico. Roptrias. Antígeno recombinante. ROP2.

PAGLIARI, Sthefany. **Evaluation of ROP2 recombinant antigen *Toxoplasma gondii* by enzyme immunoassay for detection of IgG and IgM antibodies in human serum.** 2013. 57 p. Dissertação (Mestrado Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, 2013.

## ABSTRACT

*Toxoplasma gondii* is an obligate intracellular parasite whose distribution is worldwide. It has the capacity to invade an enormous variety of hosts, and the felids are its definitive hosts. Humans can get infected through ingestion of environmental sporulated oocysts, ingestion of tissue cysts, and via the transplacental route. Congenital transmission occurs when the mother gets infected for the first time during pregnancy. Mostly, the pregnant remains asymptomatic and the infection diagnose can be confirmed by immunological tests which detect specific *T. gondii* antibodies. However, the high sensitivity of available immunological tests, such as IgM-capture enzyme linked immunoassay (ELISA) or chemiluminescence (CMIA), leded reality of the presence of residual IgM anti- *T. gondii* antibodies, which induce wrong interpretation at final diagnose. Given this situation, this study had as aim to assess the use of *T. gondii* ROP2 rhoptry recombinant proteins (rROP2) at an indirect ELISA for the detection of specific IgM and IgG antibodies against this antigen on human sera samples and to compare the results obtained with the ELISA- rROP2 with those obtained with soluble antigen of *T. gondii* (ELISA-STAg), IFI, and CMIA. Sera samples were divided into four groups according to the profile of antibodies obtained in the methods of IFI and CMIA for detection of IgG and IgM anti- *T. Gondii* and IgG avidity. Group I comprised 72 samples with the acute phase, group II consisted of 207 samples with chronic phase, group III comprised with 110 samples from individuals not exposed to *T. gondii*, and group IV, 21 samples from patients with other diseases infectious or autoimmune diseases. Regarding IgM antibody anti-*T. gondii* by ELISA-rROP2, the positivity was 94.3% (67/71) in the group I and 62.2% (99/159) in the group II. . For the detection of IgG anti-*T. gondii* by ELISA-rROP2, the seropositivity was 72.2% (52/72) in the group I, and 77.2% (122/158) in the group II. In ELISA-rROP2 for IgG detection, only samples of group IV, with *non T.gondii*-associated diseases, were discriminated. When the results obtained for the detection of IgM using ELISA-rROP2 were compared with the CMIA, the sensitivity was 92.5% and the specificity was 38.3%. When the results for detection of IgG were compared with IFI, the ELISArROP2 showed 75.6% of sensitivity and 33.3% of specificity; and when compared to CMIA, ELISA-rROP2 showed 75.2% of sensitivity and 32.9% if specificity for IgG anti-*T. gondii*. The CMIA method was able to detect a larger number of positive IgG anti-*T. gondii* samples than IFI, with sensitivity of 99.2%, specificity of 82.7%, and kappa of 0.86. Results indicate that the CMIA is able to characterize clearly the different stages of *T. gondii* infection and is more sensitive than the IFI. Results showed that ELISA-rROP2 antigen was positive for both phases of infection (acute and chronic). However, in determining the levels of IgM by ELISA-rROP2, there was a significant difference in IgM levels between acute and chronic infection groups ( $p < 0.0001$ ), and between acute and negative groups ( $p < 0.0001$ ), showing, therefore, a higher antibody affinity belonging to the acute than chronic phase of infection.

**Keywords:** *T. gondii*. Sorodiagnosis. Rhoptry. Recombinant antigen. ROP2.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> –Estágios morfológicos do <i>Toxoplasma gondii</i> . .....	14
<b>Figura 2</b> –Ciclo Biológico do <i>Toxoplasma gondii</i> .....	16
<b>Figura 3</b> –Morfologia geral da forma taquizoíta do <i>Toxoplasma gondii</i> .....	18
<b>Figura 4</b> –Eletroforese de gel em poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12% representando o antígeno solúvel (STAg) e o antígeno recombinante (rROP2) do <i>Toxoplasma gondii</i> . .....	38
<b>Figura 5</b> –Níveis de anticorpos IgM anti- <i>Toxoplasma gondii</i> obtidos por ELISA indireto e expressos em índice ELISA (IE) usando antígeno rROP2 em amostras de soro humano de fase aguda (grupo I), crônica (grupo II) negativa (grupo III) e outras doenças (grupo IV).....	42
<b>Figura 6</b> –Níveis de anticorpos IgG anti- <i>Toxoplasma gondii</i> obtidos por ELISA indireto e expressos em índice ELISA (IE) usando antígeno rROP2 em amostras de soro humano de fase aguda (grupo I), crônica (grupo II) negativa (grupo III) e outras doenças (grupo IV).....	43
<b>Figura 7</b> –Níveis de IgG anti- <i>Toxoplasma gondii</i> determinados por ELISA indireto e expressos em índice ELISA (IE) usando antígeno STAg em amostras de soro humano de fase aguda e crônica, comparado a amostras de soro humano não expostos (negativo).....	44
<b>Figura 8</b> –Análise pareada dos níveis de anticorpos IgG anti - <i>Toxoplasma gondii</i> obtidos nas amostras de soro humano caracterizadas como de fase aguda e fase crônica determinados por ELISA indireto e expressos em índice ELISA (IE) usando antígeno rROP2 e o antígeno STAg. ....	44
<b>Figura 9</b> –Análise pareada dos níveis de anticorpos IgG anti <i>Toxoplasma gondii</i> em amostras de soro humano negativo (Grupo III) determinados por ELISA indireto e expressos em índice ELISA (IE) usando antígeno rROP2 e antígeno STAg.....	45

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> –Análise da reprodutibilidade intra-ensaio para ELISA-IgM (rROP2).....	39
<b>Tabela 2</b> –Análise da reprodutibilidade intra-ensaio para ELISA-IgG (rROP2). ....	40
<b>Tabela 3</b> –Análise da reprodutibilidade inter-ensaio para ELISA-IgM (rROP2).....	40
<b>Tabela 4</b> –Análise da reprodutibilidade inter-ensaio para ELISA-IgG (rROP2). ....	40
<b>Tabela 5</b> –Avaliação da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, acurácia e valor Kappa nos testes de CMIA-IgG, ELISA-IgG (rROP2), ELISA-IgG (STAg) utilizando a IFI como padrão ouro.....	46
<b>Tabela 6</b> –Avaliação da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, acurácia e valor Kappa nos testes de IFI, ELISA-IgG (rROP2), ELISA-IgG (STAg) utilizando o método de CMIA como padrão ouro.....	46
<b>Tabela 7</b> –Avaliação da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, acurácia e valor Kappa no teste de ELISA-IgM (rROP2), utilizando a CMIA como padrão ouro. ....	47
<b>Tabela 8</b> –Avaliação da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), acurácia e valor Kappa no teste de ELISA-IgG (rROP2) utilizando a ELISA-IgG (STAG) como padrão ouro.....	47

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	11
1.1	INTRODUÇÃO .....	11
1.2	HISTÓRICO.....	12
1.3	O AGENTE .....	13
1.3.1	Taxonomia e Biologia do <i>Toxoplasma Gondii</i> .....	13
1.3.3	Fontes de Infecção .....	16
1.3.4	Organelas e Proteínas do <i>Toxoplasma Gondii</i> .....	18
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	25
2.1	OBJETIVO GERAL.....	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
<b>3</b>	<b>ARTIGO</b> .....	26
3.1	RESUMO.....	26
3.2	ABSTRACT .....	27
3.3	INTRODUÇÃO .....	27
3.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.4.1	Aspectos Éticos da Pesquisa.....	29
3.4.2	Amostras de Soro .....	29
3.4.3	Camundongos .....	30
3.4.4	Amostra de <i>Toxoplasma Gondii</i> .....	31
3.4.5	Preparo da Suspensão de Taquizoítas de <i>Toxoplasma Gondii</i> .....	31
3.4.6	Preparo do Antígeno Solúvel de <i>Toxoplasma Gondii</i> .....	31
3.4.7	Construção dos Plasmídeos de Expressão .....	32
3.4.8	Clonagem do Gene ROP2 .....	32
3.4.9	Expressão em <i>Escherichia coli</i> e Purificação da Proteína Recombinante ROP2 .....	33
3.4.10	Dosagem Proteica do Antígeno ROP2 Recombinante de <i>Toxoplasma Gondii</i> .....	33
3.4.11	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Presença de Dodecil-Sulfato de Sódio (sds-page) e Western Blot .....	33
3.4.12	Reação de IFI.....	34
3.4.13	Padronização do Ensaio Imunoenzimático (ELISA Indireto) .....	35

3.4.13.1	Estudo da diluição do soro, conjugado, concentração do antígeno e tempo da reação com substrato. ....	35
3.4.13.2	Elisa-igg e igm (rrop2) .....	35
3.4.13.3	Elisa-igg (stag).....	36
3.4.14	Reprodutibilidade do ELISA rROP2.....	37
3.4.15	Análise Estatística .....	37
3.5	RESULTADOS .....	38
3.5.1	Expressão e Purificação das Proteínas Recombinantes.....	38
3.5.2	Padronização do Ensaio Imunoenzimático (ELISA).....	39
3.5.2.1	Diluição do soro, conjugado e concentração do antígeno recombinante e tempo da reação com substrato.....	39
3.5.3	Reação Cruzada.....	39
3.5.4	Reprodutibilidade Intra-ensaio e Inter-ensaio.....	39
3.5.5	Detecção de Anticorpos Anti-t. Gondii por ELISA-IgG e ELISA-igm (rROP2) e ELISA-IgG (stag).....	41
3.5.6	Sensibilidade, Especificidade e Índice Kappa.....	45
3.6	DISCUSSÃO .....	48
	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>53</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>54</b>

# 1 REVISÃO DE LITERATURA

## 1.1 INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma zoonose causada pelo *Toxoplasma gondii*, parasito intracelular obrigatório, de distribuição mundial e que acomete animais endotérmicos (NICOLLE, MANCEAUX, 1909; DUBEY, BEATTIE, 1988). A infecção possui alta prevalência sorológica e, no Brasil, a prevalência da infecção em humanos é elevada, chegando a 100% em algumas regiões. Estes dados podem variar entre áreas geográficas dentro do mesmo país e até em grupos étnicos de uma mesma região; no entanto, os casos de doença clínica são menos frequentes (DUBEY et al., 2006). Condições ambientais, hábitos culturais e a própria fauna constituem alguns dos fatores que podem explicar essa variabilidade na prevalência da infecção (DUBEY, 1977).

O homem adquire a infecção por três vias principais: ingestão de oocistos esporulados presentes no meio ambiente, ingestão de cistos teciduais em carne crua ou mal cozida de animais infectados e pela via transplacentária (FRENKEL et al., 1970).

A infecção primária em adultos e crianças imunocompetentes é geralmente assintomática, causando uma infecção autolimitada e com sintomas não específicos que raramente demandam de tratamento (REMINGTON et al., 2001). Porém, em indivíduos imunocomprometidos, como aqueles em tratamento com drogas imunossupressoras ou pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), a toxoplasmose geralmente resulta da reativação de uma infecção pregressa e afeta, principalmente, o sistema nervoso central (MARTINO et al., 2000).

A transmissão congênita do *T. gondii* ocorre na primo-infecção durante a gestação e a gravidade das sequelas no feto pode variar de acordo com o período gestacional em que ocorre a infecção aguda (DUBEY, 1977; DESMONT et al., 1985), virulência da cepa do parasito, a capacidade da resposta imunológica da gestante além da forma infectante e quantidade de inóculo do parasito (DESMONTS; COUVREUR, 1974). Menos comumente pode ocorrer a transmissão congênita em mulheres cronicamente infectadas que têm comprometimento importante do sistema imunológico durante o período gestacional (REMINGTON et al., 2001). Nas gestantes, o diagnóstico precoce da infecção pelo *T. gondii* e o tratamento antiparasitário adequado podem reduzir a gravidade das sequelas ao feto (FOULON et al., 1994).

A maioria dos recém-nascidos infectados congenitamente é assintomática; no entanto, se não tratados durante o primeiro ano de vida, muitos desenvolverão sequelas meses ou anos após o nascimento (MCAULEY, 1994). Os sintomas clássicos da toxoplasmose congênita são hidrocefalia, coriorretinite, calcificação cerebral e retardo mental, conhecidos como Tétrade de Sabin, que podem não se manifestar na infância ou na fase adulta (SABIN, 1942).

O diagnóstico da toxoplasmose tem maior importância médica em detectar a transmissão do parasito via placenta da mãe para o seu feto e a detecção da reativação da infecção crônica em indivíduos imunocomprometidos (REMINGTON; THULLIEZ; MONTOYA, 2004; SENSINI, 2006; HOLEC et al., 2007).

Com o objetivo de se obter um diagnóstico mais preciso da infecção, bem como a determinação da fase da infecção, diversos métodos laboratoriais têm sido desenvolvidos. Como auxílio na determinação da infecção aguda, utiliza-se a detecção de anticorpos IgM específicos anti-*T. gondii*; entretanto, a interpretação do resultado IgM reagente é complicada pela persistência dessa imunoglobulina por mais de 18 meses após a infecção recente e pela possibilidade de resultado reagente mesmo que o indivíduo já não esteja mais na fase aguda da infecção quando se empregam os testes de elevada sensibilidade atualmente disponíveis (JONES et al., 2003; WILSON; MCAULEY, 1999). A elevada sensibilidade de métodos como o ensaio imunoenzimático (ELISA) de captura de IgM ou quimioluminescência, trouxe a realidade da presença de anticorpos IgM anti-*T. gondii* residuais, que leva à interpretação incorreta no diagnóstico final.

## 1.2 HISTÓRICO

O protozoário *T. gondii* foi primeiramente encontrado no baço, fígado e sangue de um pequeno roedor popularmente conhecido como gundi (*Ctenodactylus gundi*), descrito por Nicolle e Manceaux em 1908, no Instituto Pasteur da Tunísia, Norte da África, sendo denominado de *Leishmania gondii* (NICOLLE; MANCEAUX, 1909). Ao mesmo tempo e independentemente, Splendore isolou o parasito de um coelho mantido no Instituto Biológico de São Paulo, Brasil, e o denominou de *Toxoplasma cuniculli* (SPLENDORE, 1909). Somente no ano seguinte ocorreu a adequação da nomenclatura que, baseada nas características morfológicas, ficou denominado como *T. gondii*, parasito pertencente ao filo Apicomplexa, cujo gênero é derivado do grego *toxon* (arco) e *plasma* (molde), devido ao seu formato curvado e crescente (NICOLLE; MANCEAUX, 1909).

A primeira descrição da infecção por *T. gondii* em humanos ocorreu na cidade de Praga, em uma criança de 11 meses que faleceu com hidrocefalia congênita, microftalmia e presença de cistos oculares (JANKU, 1923). Em 1927, Torres encontrou lesões no sistema nervoso central, coração e músculo esquelético e a presença de um parasito intracelular em uma menina recém-nascida na cidade do Rio de Janeiro, Brasil (GUIMARÃES, 1943). Somente no ano de 1939, a infecção congênita foi descrita por Wolf, Cowen e Peige, como causa da morte de uma menina com um mês de vida que desenvolveu convulsões e coriorretinite em ambos os olhos e o parasito *T. gondii* foi isolado de animais inoculados com material da medula espinhal e córtex cerebral após a necropsia da mesma. No ano de 1940, os autores Pinkerton e Weinman foram os primeiros a descreverem a doença em um adulto de 22 anos, do Peru, e um ano depois, Pinkerton e Henderson relataram outros dois casos em adultos com idade entre 40 a 50 anos em Saint Louis, Missouri. Esses foram os primeiros relatos de toxoplasmose em adultos com ausência de sinais neurológicos (WEISS; DUBEY, 2009).

Somente após a introdução da técnica sorológica desenvolvida por Albert Sabin e Feldman Herry, o teste do corante, que se tornou possível a realização de estudos epidemiológicos sobre a real incidência da infecção pelo *T. gondii* no homem e a prevalência mundial desta infecção (SABIN; FELDMAN, 1948).

### 1.3 O AGENTE

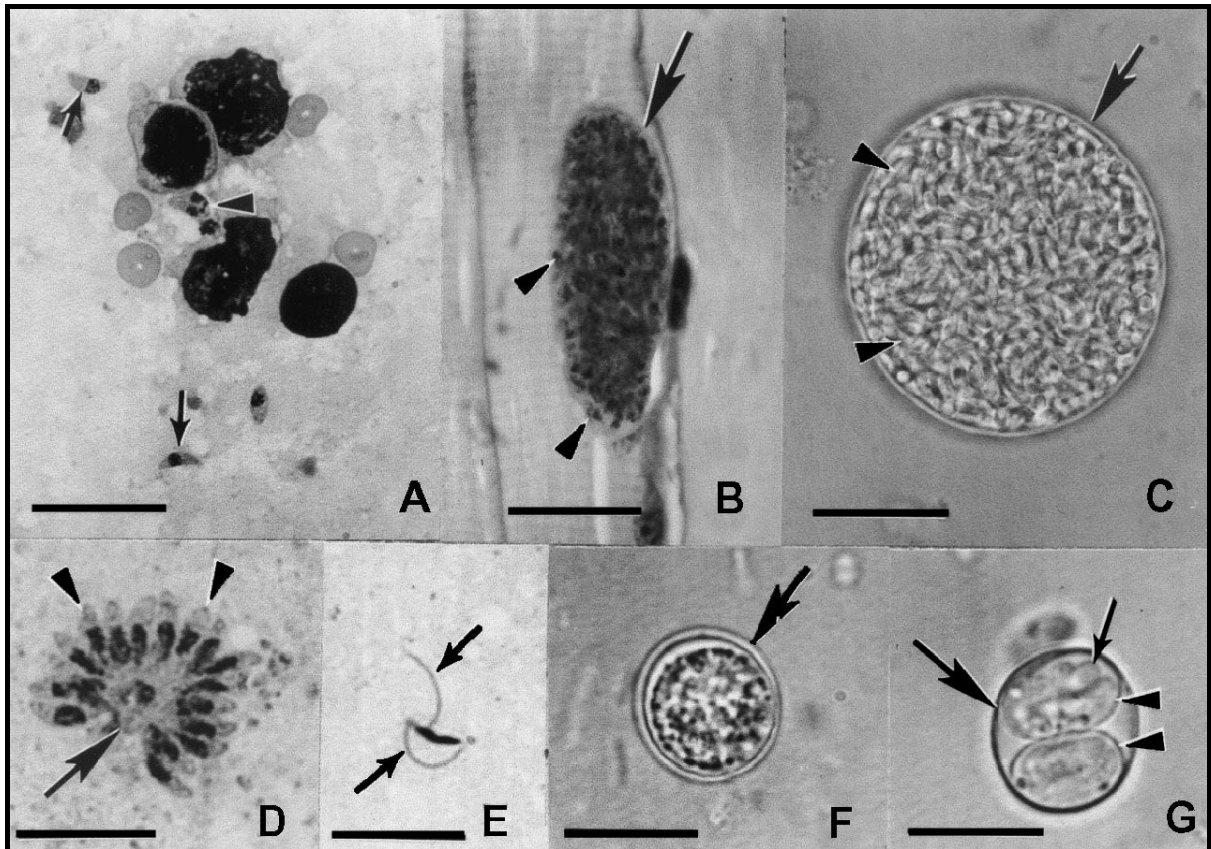
#### 1.3.1 Taxonomia e Biologia do *T. gondii*

Segundo Levine (1977, 1980) o *T. gondii* é um protozoário pertencente ao filo *Apicomplexa*, classe *Sporozoa*, família *Sarcocystidae*, subfamília *Toxoplasmatinae*, gênero *Toxoplasma* (NICOLLE; MANCEAUX, 1909) e espécie *Toxoplasma gondii* (NICOLLE; MANCEAUX, 1909). É um parasito intracelular obrigatório que possui a capacidade de invadir uma enorme variedade de células, tecidos e hospedeiros; porém, somente os membros da família *Felidae* (gatos domésticos e felídeos selvagens) são os hospedeiros definitivos do parasito, podendo excretar até 100.000 oocistos/g de fezes no período de uma a duas semanas durante a primoinfecção (FRENKEL et al., 1970).

Este parasito apresenta ciclo biológico heteróximo envolvendo três formas infecciosas: 1) os taquizoítas (livres ou em grupos) encontrados na fase aguda da infecção como forma proliferativa capaz de invadir todas as células nucleadas do hospedeiro; 2) os

bradizoítas (presente nos cistos teciduais) presentes em vários tecidos na fase crônica da infecção; e 3) os esporozoítas (presente nos oocistos) que são produzidos nas células intestinais dos felídeos (figura 1) (HILL; DUBEY 2002).

**Figura 1** –Estágios morfológicos do *Toxoplasma gondii*.



(A) Taquizoítas circulantes. As setas apontam taquizoítas individuais em forma 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 pela cabeça de seta; (D) Esquizonte com alguns merozoítas (cabeça 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 esporocisto (cabeça da seta). Cada esporocisto contém quatro esporozoítas (seta menor), não totalmente focados nesta figura.

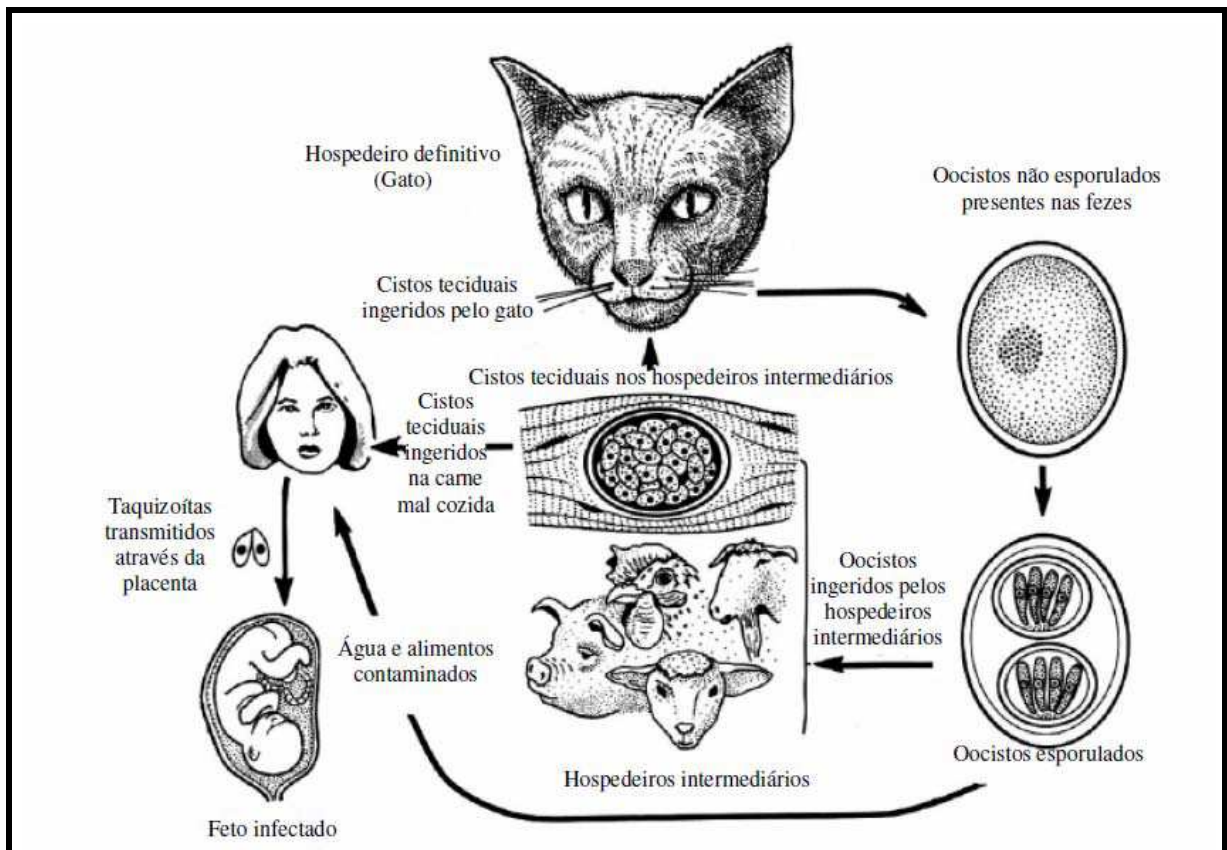
**Fonte:** Hill e Dubey (2002).

O ciclo biológico do *T. gondii* envolve duas fases, uma assexuada (ou extra-intestinal) e uma sexuada (ou enteroepitelial) (figura 2). Na fase assexuada, após a ingestão de cistos ou dos oocistos, ocorre a liberação dos bradizoítas ou esporozoítas por degradação enzimática e as formas infectantes são liberadas no lúmen intestinal que invadem os enterócitos do tecido dos hospedeiros e transformam-se em taquizoítas, por endodiogenia, multiplicando-se localmente e se disseminando por todo o organismo pela via hematogênica

(DUBEY et al., 1998). Em aproximadamente duas semanas, com o desenvolvimento da imunidade do hospedeiro, os taquizoítas se confinam no citoplasma das células em cistos, fazendo com que a taxa de multiplicação do parasito diminua, dando origem à última geração destes que são os bradizoítas (MARTINS, 2003). A resposta imunológica do hospedeiro destrói os taquizoítas, mas os bradizoítas ficam protegidos pelo cisto intracelular e permanecem viáveis, por muitos anos, em estado latente.

Nos felídeos, além da fase assexuada, ocorre também a fase sexuada no epitélio do intestino delgado desses animais por um processo denominado esquizogonia seguido de gametogonia. No interior dos enterócitos, os parasitos aumentam de tamanho, transformam-se em esquizontes, reproduzem-se e originam os merozoítas. Estes invadem outras células epiteliais e prosseguem com o processo de multiplicação assexuada. O ciclo sexuado começa quando após a ingestão dos cistos teciduais, alguns merozoítas originam os macrogametócitos e outros, os microgametócitos. Os microgametas rompem as células do hospedeiro, atingem a luz do intestino e são atraídos pelos macrogametas que se encontram, no interior dos enterócitos. A fecundação ocorre na célula da parede intestinal, com a união dos dois núcleos que resultando na formação do ovo ou zigoto que, após segregar a parede cística, dá origem ao oocisto. As células epiteliais infectadas se rompem e despejam os oocistos no lúmen intestinal que começam a ser eliminados com as fezes dos felídeos (DUBEY et al., 1994; MILLER, 1997). Os oocistos, entretanto, devem esporular antes de se tornarem infectantes, processo que leva de um a cinco dias após a excreção. A esporulação ocorre no ambiente dependente da temperatura, oxigênio e umidade (DUBEY, 1994; DUBEY et al., 1998). Após a maturação, os oocistos podem permanecer, por muito tempo, viáveis no ambiente numa temperatura entre  $-20^{\circ}\text{C}$  e  $37^{\circ}\text{C}$ , desde que não expostos à luz solar direta (DUBEY; FRENKEL, 1972).

**Figura 2** –Ciclo Biológico do *Toxoplasma gondii*



Principais formas de transmissão do parasito para os hospedeiros.

Fonte: Hill e Dubey (2002).

### 1.3.2 Fontes de Infecção

Muitos fatores estão associados à ocorrência da toxoplasmose incluindo clima, comportamento cultural, hábitos alimentares e padrões de higiene (RORMAN et al., 2006).

A infecção pelo *T. gondii* ocorre, principalmente pelo consumo de carne crua ou mal cozida contendo cistos teciduais viáveis e alimentos e água contaminada pelos oocistos esporulados provenientes das fezes dos felídeos. Dubey (2004) e Dubey e Shen (1991), afirmaram que as infecções causadas por oocistos esporulados, em humanos, são mais graves comparadas com aquelas induzidas por cistos teciduais; porém, ainda não existem testes capazes de diferenciar as fontes de infecções (GAGNE, 2001). O solo contaminado com oocistos do *T. gondii* provenientes dos gatos domésticos é uma via de transmissão de grande importância epidemiológica; já o contato com o animal não resulta grande perigo porque os oocistos não se aderem aos pelos do animal (DUBEY et al., 2006). Além da infecção usual pela ingestão de cistos teciduais ou por oocistos esporulados, outras vias de transmissão foram

relatadas como transplante de órgãos, transmissão congênita, transfusão sanguínea e acidentes de laboratório (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

Diversos surtos de toxoplasmose ligados à ingestão de água não filtrada contaminada têm sido relatados. No Canadá, em 1995, houve um súbito aumento no número de casos de toxoplasmose aguda, onde cerca de 100 indivíduos foram afetados e destes, 19 apresentaram retinite e 51 tiveram linfadenopatia. Após o estudo e mapeamento dos casos, concluiu-se que a provável via de transmissão foi a água fornecida pelo sistema municipal que era apenas clorada e não filtrada (BOWIE et al., 1997).

O primeiro surto de toxoplasmose, relatado no Brasil, causado pela água, ocorreu na cidade de Santa Isabel do Ivaí, no Noroeste do Estado do Paraná, no final do ano de 2001, onde um dos reservatórios que abastecia a cidade foi contaminado por oocistos liberados pelos filhotes de uma gata doméstica que vivia no local. Mais de 600 pessoas se infectaram e sete mulheres gestantes soroconverteram; destas, seis bebês nasceram com toxoplasmose congênita, um apresentou anomalia congênita grave e uma teve abortamento espontâneo (FUNASA, 2002). Segundo Silveira (2002), a Vigilância Sanitária deve ficar em alerta para a importância da qualidade da água de beber como via de transmissão da toxoplasmose, pois este episódio demonstrou a vulnerabilidade dos sistemas de abastecimento de água para a contaminação por oocistos de protozoários.

Em levantamento realizado por Mead et al. (1999), a toxoplasmose foi a terceira maior causa de morte atribuída à ingestão de alimentos contaminados (21%), perdendo apenas para a salmonelose (31%) e para a listeriose (28%). A maioria dos óbitos por toxoplasmose ocorreu em pacientes infectados pelo HIV. Uma pesquisa realizada pelo Serviço de Pesquisas Econômicas do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América (EUA) concluiu que metade dos casos de toxoplasmose dos EUA é causada pela ingestão de carne contaminada. O custo desta infecção foi estimado em 7,7 bilhões de dólares por ano, principalmente devido a toxoplasmose congênita (BUZBY; ROBERTS, 1996).

Em um estudo multicêntrico europeu, Cook et al. (2000) determinaram que a ingestão de carne crua ou mal cozida corresponde ao principal fator de risco para a infecção em gestantes, em 30% a 63% dos casos, seguido do contato com o solo contaminado, com 6% a 17% das infecções.

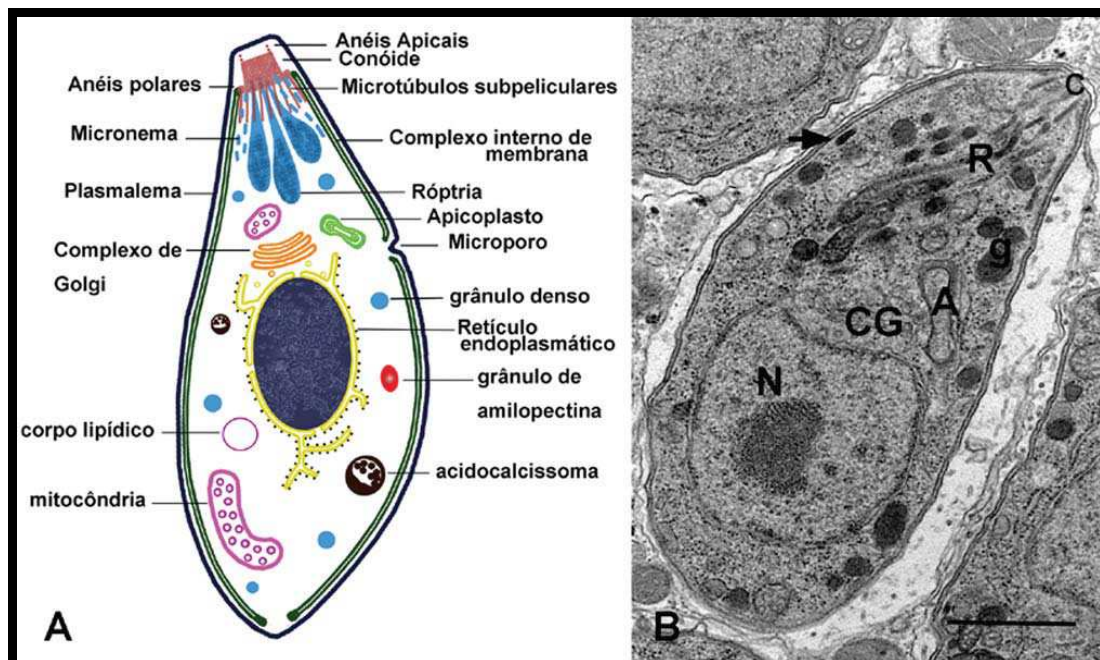
Outro estudo realizado por Roghmann et al. (1999), a prevalência de toxoplasmose encontrada em um grupo de 105 pessoas pertencente a um grupo religioso cuja alimentação é livre de carne, foi de 18%, mais baixa quando comparada à prevalência de 40% obtida em um grupo controle, composto por 146 pessoas que não tinham restrição à

alimentação com carne. Esta informação sustenta a estimativa de que, aproximadamente, metade dos casos de exposição ao *T. gondii* é devido à ingestão de carne contaminada. Carne crua e linguiça suína tipo frescal são, provavelmente, as principais vias de transmissão do *T. gondii* em muitos países, seguidas das carnes de caprinos, ovinos e aves (DUBEY; TOWLE, 1986).

### 1.3.3 Organelas e Proteínas do *T. gondii*

Todas as formas invasivas do Filo *Apicomplexa* possuem um único complexo apical de organelas localizado na porção anterior do parasito. Cada uma dessas estruturas é formada por proteínas relacionadas à invasão, formação do vacúolo parasitóforo e manutenção do parasito no interior da célula hospedeira (DUBEY, 1983). O *T. gondii* é um eucarionte, estruturalmente formado por anéis polares, conóide, microtúbulos, grânulos densos, micronemas, roptrias, mitocôndria, retículo endoplasmático, complexo de Golgi, ribossomos, retículo endoplasmático rugoso, microporo e o núcleo (figura 3) (SOUZA et al., 2010; METSIS; PETERSEN, 1995).

**Figura 3** –Morfologia geral da forma taquizoíta do *Toxoplasma gondii*.



(A) Representação esquemática. O esquema foi construído a partir de cortes aleatórios do parasito observados em microscopia eletrônica de transmissão. (B) Corte longitudinal, onde várias das estruturas representadas em (A) estão assinaladas: N - núcleo, C - conóide, R - roptrias, A - apicoplasto, CG - Complexo de Golgi, g - grânulo denso, seta - micronema, VP - vacúolo parasitóforo. Barra: 1µm.

Fonte: Souza et al. (2010).

Diversas proteínas secretoras foram identificadas e associadas ao processo de invasão celular e estimulação da resposta imunológica do hospedeiro, tais como proteínas de micronemas (MIC), grânulos densos (GRA) e roptrias (ROP e RON).

As MIC são as primeiras proteínas a serem secretadas durante o contato inicial do complexo apical do parasito com a superfície da célula hospedeira. Existe aproximadamente uma população de 100 MIC no complexo apical do *T. gondii* e onze proteínas foram identificadas cuja função não está totalmente estabelecida, mas sabe-se que estão relacionadas à ligação do parasito e penetração na célula hospedeira (CARRUTHERS et al., 1999; CARRUTHERS, 2002). Após o processo de invasão, proteínas GRA são liberadas no interior do vacúolo parasitóforo, onde irão modificá-lo para a aquisição de nutrientes da célula hospedeira (CARRUTHERS, 2002).

As roptrias são as únicas organelas secretoras apicais partilhadas por todos os parasitos Apicomplexa, são conhecidas por estarem envolvidas na penetração ativa do parasito na célula hospedeira e associadas à biogênese do vacúolo parasitóforo no qual o parasito se multiplica intensamente, evitando a morte intracelular (DLUGONSKA, 2008).

Existem aproximadamente 8 a 12 roptrias e 29 proteínas de roptrias já foram descritas, das quais 24 se encontram presentes no bulbo desta organela, sendo denominadas proteínas ROP e cinco estão localizadas no pescoço da roptria, denominadas proteínas de RON (BOOTHROYD, DUBREMETZ, 2008).

A proteína ROP2 é um membro proeminente da família das roptrias, detectada em todos os três estágios do parasito, é extensiva e altamente importante, encontra-se intimamente associada com a membrana do vacúolo parasitóforo e, possivelmente, constitui uma proteína da membrana, além do fato que estas proteínas interagem entre si na adesão à célula do hospedeiro (BOOTHROYD; DUBREMETZ, 2008; SADAK et al., 1988).

Inúmeros estudos têm reportado o uso de proteínas recombinantes para o diagnóstico sorológico da infecção pelo *T. gondii*, (BEGHETTO et al., 2003; NIGRO et al., 2003; BUFFOLANO et al., 2004; PIETKIEWICZ et al., 2004; MARTIN et al., 1998) não apenas com a vantagem da redução dos custos de realização das técnicas como também devido ao baixo custo na produção dos antígenos recombinantes (PIETKIEWICZ et al., 2004).

## REFERÊNCIAS

- BEGHETTO, E.; BUFFOLANO, W.; SPADONI, A.; PEZZO, M. D.; CRISTINA, M. D. , 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,
- BOOTHROYD J. C; DUBREMETZ J.F. Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. **Nature reviews. Microbiology**. v. 6, 2008.
- BOWIE, W. R.; KING, A. S.; WERNER, D. H.; ISAAC-RENTON, J. L.; BELL, A.; ENG, S. B.; MARION, S. A. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. **Lancet**, v. 350, p. 173-177, 1997.
- 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. 825-803, 2004.
- BUZBY, J. C.; ROBERTS, T. ERS updates U.S. foodborne disease costs for seven pathogens. **Food Review**, v. 19, p. 20-25, 1996.
- CARRUTHERS, V. B.; GIDDINGS, O.; SIBLEY K, D. Secretion of micronemal proteins is associated with toxoplasma invasion of host cells. **Cellular Microbiology**, v.1, n.3, p. 225-235, 1999.
- CARRUTHERS, V.B , Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii* . Review article. **Acta Tropical**, n. 81, p. 111–122, 2002.
- COOK, A.J.; GILBERT, R.E.; BUFFOLANO, W. ZUFFEREY, J. PETERSEN, E.; JENUM, P.A. Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. **European Research Network on Congenital Toxoplasmosis**, v. 321, p. 142-147, 2000.
- DESMONTS, G., DAFFOS F., FORESTIER F. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. **Lancet**, n. 1, p. 500-504, 1985.
- DESMONTS, G; COUVREUR, J. Congenital toxoplasmosis. A prospective study of 378 pregnancies. **The New England Journal of Medicine**, v. 290, p. 1110-1116, 1974.
- DLUGONSKA, H. Toxoplasma Rhoptries: Unique Secretory Organelles and Source of Promising Vaccine Proteins for Immunoprevention of Toxoplasmosis Review Article **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. 2008.
- DUBEY, J. P. BEATTIE, C. P. Toxoplasmosis of animals and man. **Boca Raton: CRC, Press**, 1988. p. 1-220.
- DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Cyst induced toxoplasmosis in cat. **Journal of Protozoology**, v. 19, p. 155-177, 1972.

- DUBEY, J. P.; GOODWIN, M. A.; RUFF, M. D.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K.; WILKINS, G. C.; THULLIEZ. Experimental toxoplasmosis in Japanese quail. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, p. 216-221, 1994.
- 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. *Toxoplasma, Hammondia, Besnoitia, Sarcocystis* and others tissue cyst-forming coccidia of man and animals. In: KREIER, J.P. **Parasitic Protozoa**, v. 3, p. 101, 1977.
- DUBEY, J.P., Distribution of cysts and tachyzoites in calves and pregnant cows inoculated with *Toxoplasma gondii* oocysts. **Veterinary Parasitology**, v. 13, p. 199-211, 1983.
- DUBEY, J.P., SHEN SK., Rat Model of Congenital Toxoplasmosis. **Infect and Immunity**, v. 59, p. 3301-3302, 1991.
- DUBEY, J.P., Toxoplasmosis—a waterborn zoonosis. Review. **Veterinary Parasitology**, v. 126, n. 1-2, p. 57-72, 2004.
- DUBEY, J.P.; SUNDAR, N.; PINEDA, N.; KYVSGAARD, N. C.; LUNA, L. A.; RIMBAUD, E.; OLIVEIRA, J.B.; KWOK, O.C.H.; QI, Y.; SU, C. Biologic and genetic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Nicaragua, Central America. **Veterinary Parasitology**, v. 142, p. 47-53, 2006.
- DUBEY, J.P.; TOWLE, A. Toxoplasmosis in sheep. St. Albans, UK, **Commonwealth Institute of Parasitology**. p. 11, 1986.
- FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. 3º ed. São Paulo: Ícone, p. 139-143, 1997.
- FOULON, W.; NAESSENS, A.; DERDE, M. P. Evaluation of the possibilities for preventing congenital toxoplasmosis. **American Journal of Perinatology**, v. 11, p. 57-62, 1994.
- FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P.; MILLER, N. L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stage identified as coccidia oocysts. **Science**, v. 167, p. 893-896, 1970.
- FUNASA, Fundação Nacional de Saúde, **Ministério da Saúde**, Boletim Eletrônico, n. 07, p. 1-3, 2002.
- GAGNE, S.S., Toxoplasmosis. **Science**. v. 8, n. 3, p. 122-126, 2001.
- GUIMARÃES, F.N. Toxoplasmose humana Meningoencefalomielite toxoplasmica: Ocorrência em adulto e em recém-nascido. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n. 38, v. 3, 1943.
- HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 8, p. 634–640, 2002.
- 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.

- JANKU, J. Pathogenesis and pathologic anatomy of colomba of macula lutea in eye of normal dimensions, and in microphthalmic eye, with parasites in the retina. **Casopis Lekaru Ceskych**, v. 62, p. 1021-1027, 1923.
- JONES, J. L.; LOPEZ, A.; WILSON, M. Congenital Toxoplasmosis. **American Family Physician**, v. 67, p. 2131-2138, 2003.
- LEVINE, N.D. Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. **Journal Parasitol.** v. 66, n. 5, p. 830 – 834, 1980.
- LEVINE, N.D. Taxonomy of Toxoplasma. **Journal Protozoology.** v. 24, n. 1, p. 36 – 41, 1997.
- MARTIN, V.; ARCAVI, M.; SANTILLAN, G.; AMENDOEIRA, M. R. R.; NEVES, E. S.; GRIEMBERG, G.; GUARNERA, E.; GARBERI, J. C.; ANGEL, S. O. Detection of Human *Toxoplasma*-Specific Immunoglobulins A, M, and G with a Recombinant *Toxoplasma gondii* Rop2 Protein. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 5, n. 5, p. 627–631, 1998.
- MARTINO, R.; MAERTENS, J.; BRETAGNE, S.; ROVIRA, M.; DECONINCK, E.; ULLMANN, A. J.; HELD, T.; CORDONNIER, C. Toxoplasmosis after hematopoietic stem cell transplantation. **Clinical Infection Disease.** v. 31, n. 5, p. 1188-94, 2000.
- MARTINS, C. S. Zoonoses felinas: mitos e verdades. In: SOUZA, H. J. M de. **Coletâneas em Medicina e Cirurgia Felina**. Rio de Janeiro: L. F. Livros de Veterinária, Cap. 36, 2003, 447 p.
- MCAULEY, J.; BOYER, K.M.; PATEL, D.; METS, M.; SWISHER, C.; REOIZER, N. Early and longitudinal evaluations of treated infants and children and untreated historical patients with congenital Toxoplasmosis: The Chicago Collaborative Treatment Trial. **Clinical Infectious Diseases**, v. 18, p 38-72, 1994.
- MEAD, P. S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V., MCCAIG, L. F.; BRESEE, J. S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, p. 607-624, 1999.
- METSIS, A.; PETTSERSEN, E. *Toxoplasma gondii*: characterization of a monoclonal antibody recognizing antigens of 36 and 38 Kda with acid phosphatase activity located in dense granules and rhoptries. **Experimental Parasitology**, v. 81, p. 472-479, 1995.
- MILLER, J. B. Zoonoses de pequenos animais. In: ETTINGER, S.J & FELDMAN, E.C. (Eds.). **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 1º edição. São Paulo: Manole, Cap. 65, v. 1, p. 1495, 1997.
- MONTOYA, J.G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**, v. 363, n. 9425, p. 1965-1976, 2004.
- NICOLLE C., MANCEAUX L. Sur un protozoaire nouveau du gondi. **Comptes Rendus des Seances de L'Academie des Sciences**, v. 148 p. 369–372, 1909.
- NIGRO, M.; GUTIERRES, A.; HOFFER, A. M.; CLEMENTE, M.; KAUFER, F.; CARRAL, J.; MARTIN, V.; GRANERA, 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.

PIETKIEWICZ, H.; HISZCZYN'SKA-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. 1779-178, 2004.

REMYINGTON, 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.

REMYINGTON, J.S.; MCLEOD, R. THULLIEZ, P.; DESMONTS, G. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein JO, eds. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. 5ed. **WB Saunders**, p. 205-346, 2001.

ROGHMANN, M. C.; FAULKNER, C. T.; LEFKOWITZ. A.; PATTON, S.; ZIMMERMAN, J.; MORRIS JR, J. G. Decreased seroprevalence for *Toxoplasma gondii* in Seventh Day Adventists in Maryland. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, p. 790-792, 1999.

RORMAN, E.; ZAMIR, C.S.; RILKIS, I. ; BEM-DSVID, H. Congenital toxoplasmosis-prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. **Reproductive Toxicology**, v. 21, p. 458-472, 2006.

SABIN, A. B. Toxoplasmosis: recently recognized disease. **Advances in Pediatrics**, v. 1, p. 1-54, 1942.

SABIN, A. B, FELDMAN H.A. Dyes as Microchemical Indicators of a new Immunity Phenomenon Affecting a Protozoon Parasite (*Toxoplasma*). **Science**, v. 108, n. 2815, p. 660-663, 1948.

SADAK, A.; TAGHY, Z.; FORTIER, B.; DUBREMETZ, J. F. Characterization of a family of rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. **Molecular and Biochemical Parasitology**. p. 203-211, 1988.

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.

SHAW, M.K.; ROOS, D.S.; TILNEY, L.G. Cysteine and serine protease inhibitors block intracellular development and disrupt the secretory pathway of *Toxoplasma gondii*. **Microbes and Infection**, v. 4, m. 2, p. 119-131, 2002.

SILVEIRA, C. A. M. **Toxoplasmose: Dúvidas e Controvérsias**. Erechim: EdiFAPES, 2002.

SOUZA W.; DUARTE, E. S. M.; LEMGRUBER, L.; ATTIAS, M.; VOMMARO, R.C. Organização estrutural do taquizoítio de *Toxoplasma gondii*. **Scientia Medica**, v. 20, n. 1, p. 131-143, 2010.

SPLENDRE A. Sur un nouveau protozoaire parasite du lapin: deuxième note préliminaire. **Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique**, v.2, p.462-465, 1909.

WEISS, L. M.; DUBEY, J. P. Toxoplasmosis: a history of clinical observations. **International Journal of Parasitology**, v. 39, n. 8, p. 895–901, 2009.

WILSON, M.; MCAULEY, J. B. Toxoplasma. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. editors. **Manual of Clinical Microbiology**, 7 ed., Washington, D.C. **American Society for Microbiology**, p. 1374-1382, 1999.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o emprego da proteína recombinante de roptrias ROP2 (rROP2) do *T. gondii* em um ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto para o diagnóstico da toxoplasmose humana.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Expressar e purificar a proteína rROP2 do *T. gondii* a partir de plasmídeos recombinantes;
- Padronizar um ELISA indireto utilizando rROP2 para detecção de anticorpos específicos IgM e IgG anti-*T.gondii* em amostras de soro humano obtidas na fase aguda e crônica da infecção;
- Comparar o desempenho diagnóstico do ELISA com rROP2 com os testes de ELISA indireto com antígeno STAg, imunofluorescência indireta (IFI) e quimioluminescência (CMIA).

### 3 ARTIGO

PAGLIARI, Sthefany. **Avaliação do antígeno recombinante ROP2 do *Toxoplasma gondii* no ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos IgG e IgM em soro humano.** 2013. 63 f. dissertação (Mestrado Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, 2013.

3.1 RESUMO: Proteínas recombinantes têm sido utilizadas para o diagnóstico sorológico da infecção por *Toxoplasma gondii* para diferenciar as fases aguda e crônica da toxoplasmose. No presente trabalho foi avaliado a viabilidade da utilização do antígeno recombinante de roptrias (ROP2) em um ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto para a detecção de anticorpos das classes IgG e IgM anti-*T. gondii* em soro humano e comparar os resultados obtidos com o antígeno rROP2 aos obtidos com antígeno total solúvel do *T. gondii* (ELISA-STAg), na imunofluorescência indireta (IFI) e quimioluminescência (CMIA). Foram avaliadas amostras de soro divididas em quatro grupos, de acordo com o perfil de anticorpos obtidos nos métodos de IFI e CMIA para detecção de IgG e IgM anti-*T. gondii* e avidéz de IgG. No grupo I foram incluídas 72 amostras compatíveis com a fase aguda; no grupo II, 207 amostras compatíveis com fase crônica; grupo III, com 110 amostras de indivíduos não expostos ao *T. gondii* e grupo IV, com 21 amostras de pacientes com diagnóstico de outras doenças infecciosas ou autoimunes. Os resultados demonstraram uma positividade para ambas as fases de infecção (aguda e crônica). Em amostras de soro do grupo I, o ELISA-rROP2 IgG apresentou uma positividade de 72,2% (52/72) e sensibilidade de 75,6%. Em amostras de soro do grupo II, o teste de ELISA ROP2-IgG apresentou positividade de 77,2% (122/158) Para a detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii*, o ELIA-rROP2 apresentou uma positividade de 94,3% (67/71) no grupo I de amostras e de 62,2% (99/159) no grupo II de amostras, resultando em uma sensibilidade geral de 92,5%. No ELISA-rROP2 IgG, apenas as amostras do grupo IV, com outras doenças não relacionadas ao *T. gondii*, foram discriminadas. A CMIA foi capaz de detectar um maior número de amostras com anticorpos IgG reagente do que a IFI, apresentando sensibilidade de 99,2%, especificidade de 82,7% e concordância kappa de 0,86. Os resultados obtidos indicam que a CMIA mostrou ser capaz de caracterizar de forma clara as diferentes fases da infecção pelo *T. gondii*, sendo mais sensível que a IFI. Os resultados obtidos na determinação dos níveis de anticorpos IgM pelo ELISA-rROP2 demonstraram uma diferença significativa nos níveis de IgM entre os grupos de amostras do grupo de infecção aguda *versus* crônica ( $p < 0,0001$ ) e aguda *versus* negativo ( $p < 0,0001$ ), demonstrando, portanto, uma maior afinidade por anticorpos pertencentes à fase aguda da infecção.

**Palavras-chave:** Toxoplasmose. Roptrias. ROP2. Enzima imunoensaio. Quimioluminescência. IgG. IgM

PAGLIARI, Sthefany. **EVALUATION of ROP2 recombinant antigen *Toxoplasma gondii* by enzyme immunoassay for detection of IgG and IgM antibodies in human serum.** 2013. 63 f. dissertação (Mestrado Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, 2013.

3.2 ABSTRACT: Recombinant proteins have been used for the serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) to differentiate between acute and chronic phases of toxoplasmosis. The present study evaluated the availability of using recombinant ROP2 antigen in a enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA) for the detection of IgG and IgM antibodies anti-*T. gondii* in human serum and to compare the results obtained with the ELISA- rROP2 with those obtained with soluble antigen of *T. gondii* (ELISA-STAg), IFI, and CMIA. Sera samples were divided into four groups according to the profile of antibodies obtained in the methods of IFI and CMIA for detection of IgG and IgM anti- *T. Gondii* and IgG avidity. Group I comprised 72 samples with the acute phase, group II consisted of 207 samples with chronic phase, group III comprised with 110 samples from individuals not exposed to *T. gondii*, and group IV, 21 samples from patients with other diseases infectious or autoimmune diseases. Regarding IgM antibody anti-*T. gondii* by ELISA-rROP2, the positivity was 94.3% (67/71) in the group I and 62.2% (99 /159) in the group II. . For the detection of IgG anti-*T. gondii* by ELISA-rROP2, the seropositivity was 72.2% (52/72) in the group I, and 77.2% (122/158) in the group II. In ELISA-rROP2 for IgG detection, only samples of group IV, with *non T.gondii*-associated diseases, were discriminated. When the results obtained for the detection of IgM using ELISA-rROP2 were compared with the CMIA, the sensitivity was 92.5% and the specificity was 38.3%. When the results for detection of IgG were compared with IFI, the ELISArROP2 showed 75.6% of sensitivity and 33.3% of specificity; and when compared to CMIA, ELISA-rROP2 showed 75.2% of sensitivity and 32.9% if specificity for IgG anti-*T. gondii*. The CMIA method was able to detect a larger number of positive IgG anti-*T. gondii* samples than IFI, with sensitivity of 99.2%, specificity of 82.7%, and kappa of 0.86. Results indicate that the CMIA is able to characterize clearly the different stages of *T. gondii* infection and is more sensitive than the IFI. Results showed that ELISA-rROP2 antigen was positive for both phases of infection (acute and chronic). However, in determining the levels of IgM by ELISA-rROP2, there was a significant difference in IgM levels between acute and chronic infection groups ( $p<0.0001$ ), and between acute and negative groups ( $p<0.0001$ ), showing, therefore, a higher antibody affinity belonging to the acute than chronic phase of infection.

**Keywords:** Toxoplasmosis. Rhoptry. ROP2. Enzyme Linked Immuno sorbent assay. Chemiluminescence. IgG. IgM.

### 3.3 INTRODUÇÃO

A toxoplasmose cujo agente etiológico é o *Toxoplasma gondii* é uma infecção cosmopolita e uma das zoonoses parasitárias mais frequentes no ser humano. A infecção adquirida ocorre principalmente pela ingestão de alimentos ou água contaminada com oocistos ou ainda pela ingestão de carnes cruas ou pouco cozida contendo cistos teciduais (DUBEY, 2004).

Em hospedeiros imunocompetentes, a infecção geralmente é assintomática e produz uma proteção permanente, prevenindo a transmissão do parasito às gerações subsequentes (TENTER et al., 2000). Porém, se a infecção ocorrer no período gestacional, o *T. gondii* pode ser transmitido ao feto causando aborto, má formações e lesões inflamatórias, as quais podem resultar em danos neurológicos e oftalmológicos (PETERSEN, 2007).

Devido a dificuldade do diagnóstico direto da infecção, vários métodos sorológicos foram desenvolvidos nas últimas décadas, sendo que a maioria visa a detecção de anticorpos anti- *T. gondii* (VIDOTTO et al., 1990).

Desde a década de 60, técnicas como imunofluorescência indireta (IFI) e hemaglutinação indireta são utilizadas para o diagnóstico da toxoplasmose por serem de fácil execução e baixo custo, adequadas a pequenas rotinas laboratoriais, apresentando sensibilidade e especificidade compatíveis ao teste de Sabin Feldman (CAMARGO, 1973).

Os testes imunoenzimáticos (*enzyme linked immunosorbent assay* ou ELISA) começaram a ser desenvolvidos no final dos anos 60 e início da década de 70 e consolidaram-se como excelentes métodos para detecção de anticorpos anti-*T.gondii* em soro humano, superando em sensibilidade, a já consagrada IFI (CALAMEL, LAMBERT, 1985). Os testes imunoenzimáticos apresentam algumas vantagens sobre a IFI, principalmente, por possibilitarem a análise de grande número de amostras de soro em menor tempo, pela objetividade, rapidez, automação e possibilidade de informatização (MINEO, CAMARGO, 1980).

Com o passar dos anos houve o aprimoramento das técnicas para o sorodiagnóstico da toxoplasmose como o ELISA de captura de IgM e o imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência (CMIA), com elevada sensibilidade para a detecção de anticorpos da classe IgM anti-*T. gondii*. À medida que se tornaram mais sensíveis para a pesquisa de anticorpos IgM, os resultados positivos persistiram por longos períodos após a infecção aguda, denominados anticorpos IgM residuais, sendo um problema crucial para o diagnóstico da toxoplasmose aguda principalmente em gestante, dificultando a interpretação correta da fase de infecção a qual o indivíduo se encontra (ARAÚJO; FERREIRA, 2008; MONTOYA; ROSSO, 2005, NIGRO et al., 2003).

Em relação as técnicas sorológicas clássicas, investigações têm sido conduzidas na tentativa de aumentar a sensibilidade e a especificidade dos testes levando a uma maior confiabilidade nos resultados. Assim, novas preparações antigênicas e novos desenhos experimentais têm sido investigados.

A utilização de antígenos recombinantes do *T. gondii* produzidos em sistemas procariotos, como em *Escherichia coli* encontra-se descrita em diversos trabalhos, com o objetivo de avaliar o potencial desses antígenos como marcadores das diferentes fases de infecção, permitindo assim, a detecção de anticorpos humanos específicos direcionado contra determinados antígenos alvos (SOUZA, SILVA et al., 2012; PIETKIEWICZ et al., 2004).

Para segurança e precisão diagnóstica, torna-se imprescindível a utilização e interpretação adequada dos métodos laboratoriais disponíveis associados a dados epidemiológicos e clínicos. Desta forma, a identificação de proteínas expressas na fase aguda ou crônica da toxoplasmose pode contribuir na padronização de uma técnica de diagnóstico com melhora da sensibilidade e especificidade para a diferenciação das fases da infecção pelo *T. gondii* (GOLKAR et al., 2007).

Sendo assim, o presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a viabilidade da utilização do antígeno recombinante de ROP2 (rROP2) em um ELISA indireto para a detecção de anticorpos das classes IgM e IgG anti-*T. gondii* em amostras de soro humano nos diferentes estágios da infecção. Além disso, comparar o desempenho deste antígeno recombinante com o desempenho do antígeno solúvel - STAg e comparar estes resultados com as técnicas de IFI e CMIA.

### 3.4 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.4.1 Aspectos Éticos da Pesquisa

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (CONEP sob o nº 047/05) da Universidade Estadual de Londrina e realizado de acordo com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Dados pessoais e do prontuário foram mantidos em sigilo, manipulados apenas pelos integrantes do projeto.

#### 3.4.2 Amostras de Soro

Foram utilizadas 410 amostras de soro humano provenientes da soroteca do Setor de Imunologia Clínica do Laboratório de Análises Clínicas, do Hospital Universitário da UEL que foram analisadas na rotina, por método automatizado, o imunoensaio de

micropartículas por quimioluminescência (CMIA, ARCHITECT, ABBOTT®) e por método sorológico manual como a IFI (IMUNO-COM®, WAMA Diagnóstica, Brasil) para detecção de anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii*.

As amostras foram separadas em quatro grupos de acordo com o perfil sorológico da infecção obtido pela triagem sorológica na IFI para a detecção de anticorpos IgG específicos anti-*T. gondii* e por CMIA para a detecção de anticorpos IgG, IgM e avides da IgG. De acordo com os resultados obtidos, os quatro grupos foram constituídos:

- Grupo I: 72 amostras de soro compatíveis com a fase aguda da toxoplasmose definida pela presença de anticorpos IgM específicos e fraca avides de anticorpos IgG anti-*T. gondii* → fase aguda da infecção
- Grupo II: 207 amostras de soro de pacientes na fase crônica da toxoplasmose definida pela presença de anticorpos IgG anti-*T. gondii* de forte avides. → fase crônica da infecção
- Grupo III: 110 amostras de soro de pacientes com sorologia não reagente para *T. gondii* definida pela não reatividade de anticorpos IgG e IgM → não expostos ao parasito, ou negativo.
- Grupo IV: 21 amostras de soro de pacientes com infecções não relacionadas, com diagnóstico para outras doenças como doença de Chagas (n=4), sífilis (n=2), paracoccidiodomicose (n=2), doenças autoimunes com fator antinuclear reagente (n=4), autoanticorpos contra DNA de dupla hélice (anti-DNAs) reagente (n=4), infecção pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) (n=4) e leishmaniose (n=1). Este grupo foi utilizado para avaliação de reatividade cruzada e as amostras não apresentaram sorologia reagente para IgG e IgM anti- *T. gondii* pelos métodos sorológicos empregados na rotina (IFI e CMIA).

### 3.4.3 Camundongos

Camundongos fêmeas, albinos suíços Webster, entre 45 a 60 dias (pesando entre 20 a 25g), foram utilizados para replicar a cepa RH do *T. gondii* para obtenção de taquizoítas utilizados nos testes sorológicos e *Western Blot*.

#### 3.4.4 Amostra de *T. gondii*

Foi utilizada a amostra RH do *T. gondii*, isolada por Sabin (1941) de uma criança com encefalite. É uma cepa não cistogênica, do tipo I, utilizada na obtenção de taquizoítas para a extração do DNA e incorporação em vetor para expressão da proteína ROP2 e também para a reação de IFI-IgG.

#### 3.4.5 Preparo da Suspensão de Taquizoítas de *T. gondii*

Para a obtenção dos taquizoítas puros da amostra RH, cinco camundongos foram inoculados, pela via intraperitoneal, com uma suspensão de  $10^6$ /mL de taquizoítas vivos em solução fisiológica estéril. O exsudado foi obtido pela lavagem da cavidade peritoneal 48 horas após a inoculação. Em seguida as suspensões parasitárias foram submetidas a uma centrifugação rápida ( $45 \times g$ , 1 minuto,  $4^\circ\text{C}$ ) para remover debris celulares do hospedeiro. O sobrenadante foi coletado e lavado por duas vezes ( $720 \times g$ , 10 minutos,  $4^\circ\text{C}$ ) com PBS. O sedimento final da suspensão parasitária foi ressuspenso em 10 mL de PBS e os parasitos foram padronizadas em  $10^7$ /mL por contagem em câmara de Neubauer (LUNDÉN, 1995). Após lavagem com PBS, o sedimento foi armazenado a  $-20^\circ\text{C}$  para posterior preparação de antígenos solúveis de *T. gondii*.

#### 3.4.6 Preparo do Antígeno Solúvel de *T. gondii*

O antígeno solúvel de taquizoítas de *T. gondii* foi preparado de acordo com a metodologia descrita por Scott et al. (1987), com modificações. Suspensões parasitárias ( $1 \times 10^8$  taquizoítas/mL) foram tratadas com inibidores de proteases [fenil-metil-sulfonil-fluoreto (PMSF)] a 1,6 mM, leupeptina a 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e aprotinina a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) e submetidas a seis ciclos rápidos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a  $37^\circ\text{C}$ , seguido por seis ciclos de ultrassom (Thorton-INPEC Eletrônica S/A, Santo Amaro, SP, Brasil) por 1 minuto, a 60 Hz, em banho de gelo. Após a centrifugação ( $10.000 \times g$ , 30 minutos,  $4^\circ\text{C}$ ), o sobrenadante foi coletado e a concentração proteica foi determinada pelo método descrito por Lowry et al. (1951). Aliquotas foram armazenadas em *freezer* a  $-20^\circ\text{C}$  até o momento da sua utilização.

### 3.4.7 Construção dos Plasmídeos de Expressão

Para a construção dos plasmídeos seguiu-se a metodologia descrita por Igarashi et al. (2008). A extração de DNA dos taquizoítas de *T. gondii* foi efetuada pelo Kit Qiagen® com lise de células e seguindo as orientações do fabricante. O material foi hidratado em tampão TE e refrigerado durante a noite, sendo quantificado em gel de agarose, observado com luz UV em Image Master® VDS (Pharmacia Biotech) e fotografado em Fuji Film®, Thermal Imaging system. O segmento de DNA do gene que codifica a proteína ROP2 foi obtido pela técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para os genes ROP2 *sense* (5'-CACC ATG GAA AAC TGT GCG TCG GTC-3') e *antisense* (5'- TGC CGG TTC TCC ATC AGT TTG-3') confeccionados a partir de sequência previamente conhecida. Para a realização da PCR foram utilizados 2,5 µL de tampão 10 vezes concentrado, 2 µL dNTPs (0,2 mM), 20 pmol de cada conjunto de *primers*, 0,25 µL da enzima taq polimerase Platinum® (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, Califórnia) e 50 ng de DNA de *T. gondii*, em um volume total de 25 µL. Para a reação de amplificação do DNA em moldes de clonagem, foi utilizada a enzima Pfx polimerase Platinum® (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Califórnia) que amplifica os DNA moldes em extremidades abruptas, importante na ligação com o vetor. Para a realização da PCR foram utilizados 0,5 µL da enzima Pfx polimerase Platinum® (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Califórnia) e 50 ng de DNA de *T. gondii* em um volume final de 25µL. O produto amplificado foi visualizado em gel de agarose 2%.

### 3.4.8 Clonagem do Gene ROP2

Os produtos de amplificação foram clonados de acordo com o protocolo descrito por Igarashi et al. (2008), usando o vetor pET102/D-TOPO de acordo com as recomendações do kit de clonagem pET102® Directional TOPO® (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, Califórnia). Cada clone foi linearizado a partir de enzimas de restrição para confirmação do tamanho esperado após a clonagem. O plasmídeo recombinante foi inserido pela reação de transformação em *Escherichia coli* TOP10 competente quimicamente. Os clones pET102/ROP2 foram cultivados em 3,0 mL de caldo LB contendo ampicilina, com o objetivo de multiplicação dos plasmídeos, os quais, foram obtidos por extração QIAprep Spin Miniprep Kit Protocol (Qiagen) seguindo orientações do fabricante. A confirmação da presença do inserto em fase de quadro de leitura para transcrição no vetor

pET102 /TOP10 foi realizada com o uso de enzima de restrição para a observação do tamanho esperado do plasmídeo linearizado. Após a confirmação da presença do inserto, uma nova reação de transformação foi realizada para a incorporação dos plasmídeos recombinantes em *E. coli* BL21 para a expressão das proteínas recombinantes.

#### 3.4.9 Expressão em *E. coli* e Purificação da Proteína Recombinante ROP2

A proteína recombinante ROP2, foi expressa em BL21 *E. coli* (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, Califórnia) e devido à presença dos seis tags de histidinas do vetor na região C-terminal, foi purificada por afinidade em coluna de resina de níquel seguindo orientações do fabricante (Qiagen®). Após a purificação, foram analisadas em gel de poliacrilamida, em presença de dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) num sistema descontínuo e desnaturante utilizando o sistema Mini Protean (BIO-RAD) e coradas com Nitrato de prata (YUEN et al., 1982).

#### 3.4.10 Dosagem Proteica do Antígeno ROP2 Recombinante de *T. gondii*

A concentração de proteínas expressas foi determinada pelo método de ácido biocinínico (BCA Protein Assay Reagente, Pierce), tendo como padrão soro albumina bovina e a leitura realizada em espectrofotômetro a 540nm.

#### 3.4.11 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Presença de Dodecil-Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) e *Western Blot*

A proteína rROP2 purificada foi separada por eletroforese vertical em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970). O gel de fracionamento utilizado foi de 12% e o gel de empilhamento a 5% em uma voltagem de 100V por aproximadamente quatro horas. As amostras aplicadas foram diluídas em tampão de amostra e como curva de referência foi utilizado o marcador BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, Califórnia). As proteínas separadas em SDS-PAGE foram transferidas eletroforicamente para membrana de nitrocelulose (iBlot Transfer Stacks Nitrocellulose, Mini, Invitrogen, Israel) em sistema de transferência semi-seco (iBlot Gel Transfer System, Invitrogen, Carlsbad, Califórnia), seguindo as orientações do fabricante.

Após a transferência, a membrana foi corada com *Ponceau* para verificar a eficiência da transferência e posteriormente foi bloqueada em solução de bloqueio (7Mm Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3Mm NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 140mM NaCl com 8% leite desnatado) por 1h a temperatura ambiente e sob agitação lenta. Após três lavagens, as tiras de nitrocelulose foram incubadas com as amostras de soro humano diluídos a 1:200 em tampão de lavagem (7Mm Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3Mm NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 140mM NaCl com 5% leite desnatado) por 1 hora a temperatura ambiente. Após três lavagens com tampão de lavagem, as tiras foram incubadas com anticorpo anti-imunoglobulina humana IgG e IgM, (diluído 1:4.000 em tampão de lavagem (Bethyl Lab, Montgomery, TX, USA) por 1 hora a temperatura ambiente. A atividade da peroxidase foi revelada usando solução de substrato cromógeno diaminobenzidine (DAB) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a reação foi interrompida com água destilada.

#### 3.4.12 Reação de IFI

A presença de anticorpos IgG anti-*T. gondii* nas amostras de soro dos pacientes foram analisadas pela reação de IFI (CAMARGO, 1973). Lâminas de vidro contendo 20 a 30 taquizoítas formolizados por orifício receberam 20µL de soro na diluição seriada de 1:16, 1:64, 1:256, 1:1024 e 1:4096 em solução tampão fosfato (PBS) e foram incubadas a 37°C, em câmara úmida por 30 minutos. Após incubação, as lâminas foram lavadas três vezes por 5 minutos com PBS; em seguida, foram adicionados 20 µL de anti-IgG humana marcada com fluoresceína (conjugado fluorescente) na diluição 1:2000 em PBS e incubadas novamente a 37°C, em câmara úmida por 30 minutos. Após a incubação, repetiu-se a etapa de lavagem das lâminas, que posteriormente foram secas a temperatura ambiente, protegidas da incidência de luz. Para a realização da leitura, prosseguiu-se com a montagem das lâminas com a adição de glicerina tamponada pH 8,6 e lamínulas de 24x60 mm. A leitura da lâmina foi realizada na objetiva de 40x, em microscópio de epi-iluminação de halogênio (Nikon Labophot, Japan), sendo considerado como título, a maior diluição da amostra do soro onde os taquizoítas apresentaram fluorescência verde na membrana celular. A ausência de fluorescência ou apenas a presença da fluorescência polar do parasito foi considerada como resultado não reagente.

### 3.4.13 Padronização do Ensaio Imunoenzimático (ELISA indireto)

#### 3.4.13.1 Estudo da diluição do soro, conjugado, concentração do antígeno e tempo da reação com substrato.

Várias diluições das amostras de soro foram avaliadas para a detecção de anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii* (que variaram de 1:50 a 1:400). As diferentes diluições das amostras de soro foram avaliadas, também, frente a diferentes concentrações do antígeno rROP2. Para a padronização do ensaio, foram avaliadas concentrações do antígeno recombinante rROP2 variando de 1µg a 10µg e para o conjugado foram avaliadas diluições de 2.500µL/mL a 40.000µL/mL.

Foram avaliadas diferentes temperaturas de incubação com o substrato cromógeno : 5, 10 e 15 minutos.

#### 3.4.13.2 Elisa-igg e igm (rrop2)

Para a padronização do ELISA com antígeno rROP2, seguiu-se a metodologia descrita por Igarashi et al. (2008) com algumas modificações, como diferenças nas diluições das amostras de soro, na concentração de antígeno rROP2 e conjugado enzimático. Microplacas (Nunc-Immuno Plate, MaxiSorp, Dinamarca) foram adsorvidas com o antígeno rROP2 diluído em tampão carbonato-bicarbonato (0,1M, pH 9,6) e incubadas, *overnight*, a 4°C em câmara úmida. Após a adsorção, a solução antigênica foi descartada por inversão das microplacas e 200µL de PBS-Tween 20 (50 mM Tris-HCL, pH 7,4, contendo 150 mM de NaCl e Tween 20 0,05%) foram adicionados em cada poço da microplaca para a realização das lavagens (três vezes). As áreas dos poços não adsorvidas com o antígeno rROP2 foram bloqueadas com 200 µL de tampão carbonato contendo 8% de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé, São Paulo, SP) e incubadas a 37°C por uma hora. Posteriormente, a etapa de lavagem foi repetida, como já descrito. Amostras de soros controles e testes foram diluídas em PBS-Tween 20 com 5% de leite em pó desnatado e foram adicionados (100 µL), em duplicata, na microplaca e incubadas a 37°C por uma hora.

Após nova etapa de lavagem com tampão de lavagem, adicionou-se 100 µL de conjugado anti-humano IgG e IgM marcados com peroxidase diluído em PBS-Tween 20 com 5% de leite em pó. Novamente as microplacas foram incubadas a 37°C por uma hora. Após nova etapa de lavagem, a atividade da peroxidase foi revelada com adição de 100 µL do

tampão substrato cromógeno 40mg ortofenilenodiamino (OPD) (SIGMA) e 100mL de tampão citrato/fosfato 0,1 M, pH 6,0 e 40 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). A reação foi interrompida com 50  $\mu$ L de ácido clorídrico (HCl) 1N. A leitura da densidade óptica (D.O.) foi obtida em leitor de microplacas (Spectra II Microplate Reader, Tecan) em comprimento de onda de 450 e 620 nm. As amostras foram testadas em duplicatas e para o cálculo da reatividade foi utilizada a média das D.O.s obtidas. O ponto de corte (*cut-off*) foi calculado pela média dos valores de D.O.s obtidas pelos controles negativos acrescida de dois desvios padrões.

Soros controles positivos e negativos foram incluídos em cada microplaca ensaiada. Os resultados foram expressos em índices de reatividade de ELISA (IE) seguindo a fórmula: IE: D.O. amostra/D.O. *cut-off*, onde valores de IE >1,2 foram considerados positivos para a exclusão dos valores próximos a IE = 1,0.

#### 3.4.13.3 Elisa-igg (stag)

Para a realização do ELISA indireto (STAg) seguiu-se a metodologia descrita previamente (MINEO et al., 1980), com modificações, sendo utilizada para a detecção de anticorpos IgG específicos contra *T. gondii*. Placas de microtitulação de poliestireno de alta afinidade (Corning Laboratories Inc., New York, EUA) foram adsorvidas com o antígeno solúvel de *T. gondii* (STAg) na concentração de 5 $\mu$ g/mL, diluídos em tampão carbonato-bicarbonato 0,06M (pH 9,6) e incubadas durante 18 horas a 4°C. Após a incubação, as placas foram lavadas três vezes com PBS-Tween e bloqueadas com PBS-Tween a 5% de leite em pó desnatado e incubadas por 1 hora a 37°C. Após lavagem por três vezes com PBS-Tween, as placas foram incubadas com amostras de soro diluídas 1:64 em PBS-Tween mais 5% de leite em pó desnatado, em duplicata e posteriormente incubadas por 1 hora a 37°C. Após a incubação do soro, fez-se as lavagens por seis vezes para prosseguir com a incubação do anticorpo de cabra anti-IgG conjugado com peroxidase diluído 1:1000 em PBS-Tween a 5% de leite por 1 hora a 37°C. Após nova lavagem por seis vezes a reação foi revelada com 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)-diammonium salt (ABTS). A D.O. 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 da reatividade (*cut-off*) da reação foi determinado pela média das D.O.s obtidas nos soros controles negativos acrescida de dois desvios padrões. Os resultados foram expressos em IE como já mencionado para.

#### 3.4.14 Reprodutibilidade do ELISA rROP2

A avaliação da reprodutibilidade intra-ensaio foi realizada somente para o ELISA utilizando o antígeno rROP2. Foram utilizadas duas amostras (uma não reagente e uma reagente) testadas seis vezes, na mesma placa de ELISA.

Para a reprodutibilidade inter-ensaio, foram utilizadas duas amostras (uma não reagente e uma reagente) testada seis vezes em todos os ensaios de ELISA nos diferentes dias em que a reação foi executada. A variação da reprodutibilidade foi avaliada pelo desvio-padrão e coeficiente de variação encontrados nas leituras de D.O.s obtidas nos ensaios para anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii* (FERREIRA; ÁVILA, 1996).

#### Índice Kappa

Para avaliação da concordância entre os resultados obtidos nos testes de ELISA, IFI e CMIA, foi determinado o índice Kappa. A interpretação do índice obtido foi realizada segundo Pereira (1995), demonstrado no quadro 1.

**Quadro 1** – Interpretação dos valores do índice Kappa, segundo Pereira (1995).

Valor de Kappa	Correlação
< 0,00	Ausente
0,00- 0,20	Ruim
0,21- 0,40	Fraca
0,41- 0,60	Regular
0,61- 0,80	Boa
0,81 – 0,99	Ótima
1,00	Perfeita

#### 3.4.15 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada pelo programa computacional *GraphPad Prism* versão 5.0 (*GraphPad Software, Inc., San Diego, USA*).

Níveis de anticorpos entre os grupos de pacientes foram comparados utilizando o teste Kruskal Wallis. A comparação entre os resultados obtidos nos diferentes testes sorológicos e no ELISA utilizando diferentes antígenos foi realizada pelo teste Qui-

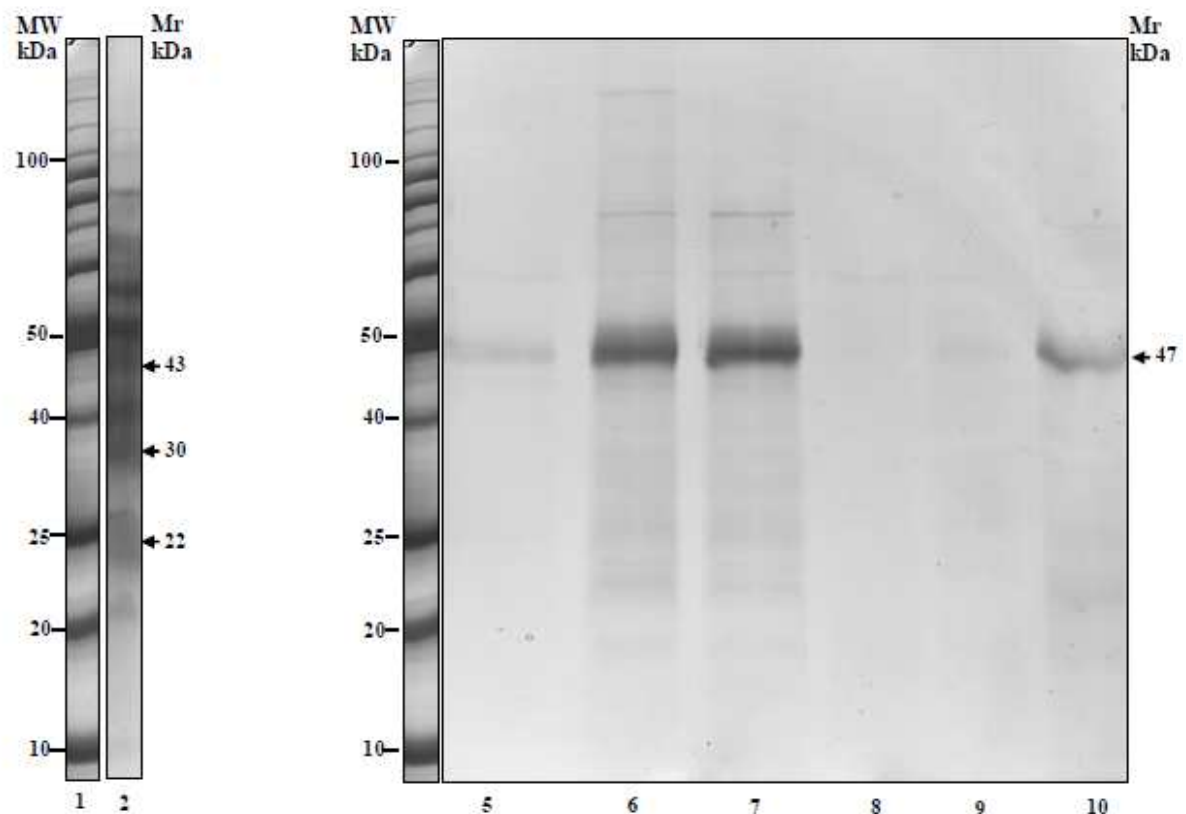
Quadrado ( $\chi^2$ ). Os valores foram expressos em intervalos de confiança (IC) de 95%. Um valor de  $p \leq 0,05$  foi considerado como estatisticamente significativo. Foi calculado o índice Kappa para verificar a concordância entre os teste utilizados neste estudo, utilizando o programa estatístico OpenEpi Website.

### 3.5 RESULTADOS

#### 3.5.1 Expressão e Purificação das Proteínas Recombinantes.

A expressão e purificação das proteínas recombinantes em *E. coli*, assim como o antígeno solúvel do *T. gondii*, podem ser observadas na Figura 4. A proteína rROP2 foi recuperada em sua fração insolúvel e posteriormente purificada. As eluições apresentaram a respectiva proteína com tamanho em torno de 50kDa. O nível máximo de produção aproximou-se de 300 a 500ug/mL nas culturas de bactérias obtidas.

**Figura 4** –Eletroforese de gel em poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12% representando o antígeno solúvel (STAg) e o antígeno recombinante (rROP2) do *Toxoplasma gondii*.



Linha 1: Padrão de peso molecular (PM) de 10 a 220 kDa; Linha 2: STAg; Linhas 5 a 10: rROP2.

### 3.5.2 Padronização do Ensaio Imunoenzimático (ELISA).

#### 3.5.2.1 Diluição do soro, conjugado e concentração do antígeno recombinante e tempo da reação com substrato.

O melhor resultado obtido para a diluição do soro foi de 1/100 para o ELISA-IgM (rROP2) e 1/200 para o ELISA-IgG (rROP2). A diluição do conjugado enzimático ficou em 1/2000 para anti-IgM e 1/20.000 para anti-IgG e o tempo da reação com o substrato ficou determinado em 15 minutos. O antígeno rROP2 apresentou melhores resultados na concentração de 2,5µg/mL.

#### 3.5.3 Reação Cruzada.

As 21 amostras caracterizadas como não reagente para anticorpos IgG e IgM anti- *T. gondii* pelos métodos sorológicos empregados na rotina e reagente para outras doenças não relacionadas não apresentaram reatividade de anticorpos IgM e IgG ao antígeno rROP2.

#### 3.5.4 Reprodutibilidade Intra-Ensaio e Inter-Ensaio.

Na análise da reprodutibilidade intra-ensaio os valores das D.Os. das duplicatas nas amostras testadas em uma placa estão ilustrados na tabela 1 para a detecção de anticorpos IgM anti- *T. gondii* e na tabela 2 para a detecção de anticorpos IgG anti- *T. gondii*.

**Tabela 1** –Análise da reprodutibilidade intra-ensaio para ELISA-IgM (rROP2).

Amostra	D.O.		Média	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação
Amostra 1	0,106	0,102	0,102	0,006	5,7%
	0,097	0,096			
	0,111	0,099			
Amostra 2	0,601	0,594	0,592	0,01	1,94%
	0,604	0,579			
	0,577	0,598			

D.O. densidade óptica

**Tabela 2** –Análise da reprodutibilidade intra-ensaio para ELISA-IgG (rROP2).

<b>Amostra</b>	<b>D.O.</b>		<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Coefficiente de Variação</b>
Amostra 1	0,100	0,096	0,098	0,001	1,5%
	0,099	0,097			
	0,097	0,098			
Amostra 2	0,462	0,361	0,411	0,04	10%
	0,411	0,410			
	0,425	0,393			

D.O. : densidade óptica

Na análise da reprodutibilidade inter-ensaio, os valores obtidos das D.Os. obtidos estão ilustrados na tabela 3 na detecção de anticorpos IgM anti- *T. gondii* e na tabela 4 na detecção de anticorpos IgG anti- *T. gondii*.

**Tabela 3** –Análise da reprodutibilidade inter-ensaio para ELISA-IgM (rROP2).

<b>Resultados do teste de ELISA (D.O.)</b>					
<b>Amostra</b>	<b>Máximo</b>	<b>Média</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Coefficiente de Variação</b>
Controle negativo	0,187	0,118	0,082	0,03	32%
Controle positivo	0,842	0,646	0,550	0,09	13%

ELISA: enzimaensaio

D.O.: densidade óptica

**Tabela 4** – Análise da reprodutibilidade inter-ensaio para ELISA-IgG (rROP2).

<b>Resultados do teste de ELISA (D.O.)</b>					
<b>Amostra</b>	<b>Máximo</b>	<b>Média</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Coefficiente de Variação</b>
Controle negativo	0,334	0,208	0,096	0,05	24%
Controle positivo	1,284	0,676	0,361	0,1	26%

ELISA: enzimaensaio

D.O.: densidade óptica

### 3.5.5 Detecção de Anticorpos anti-*T. Gondii* por ELISA-IgG e ELISA-IgM (rROP2) e ELISA-IgG (STAg).

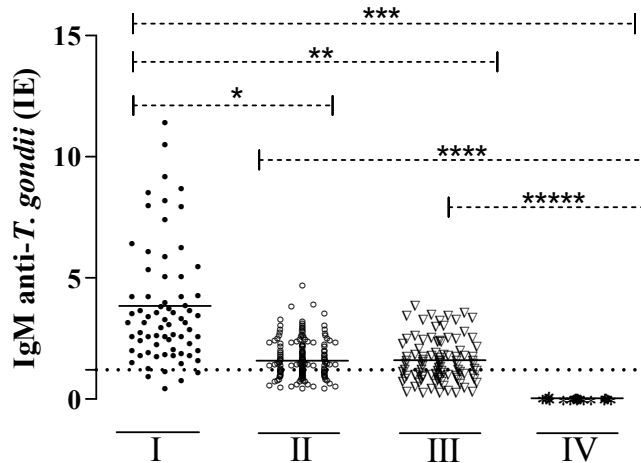
349 amostras foram analisadas pelo ELISA-IgM (rROP2) e 350 foram analisadas pelo ELISA- IgG (rROP2) devido a quantidade insuficiente de material disponível, assim uma amostra do grupo I, 48 do grupo II e 12 do grupo III não foram avaliadas pelo ELISA-IgM (rROP2) e 49 amostras do grupo II e 11 do grupo III não foram testadas pelo ELISA-IgG (rROP2). No grupo IV as 21 amostras foram avaliadas somente pelo ELISA-IgM (rROP2) e ELISA-IgG (rROP2).

Os níveis de anticorpos IgM anti-*T. gondii* obtidos pelo teste de ELISA (rROP2) foram analisados para cada grupo de amostras de soro humano inseridas neste estudo (Figura 5).

A positividade encontrada pelo ELISA-IgM para o grupo I (agudo) foi de 94,3% (67/71), 62,2% (99/159) para o grupo II (crônico) e 60,2% (59/98) foram positivos no grupo III (não expostos). No grupo II, 11 amostras apresentaram reatividade para anticorpos IgM e IgG sendo o IgG de forte avidéz; destas 11 amostras, oito foram reativas pelo ELISA-IgM (rROP2) e uma não foi analisada. Todas as amostras do grupo IV (n=21) não apresentaram reatividade para anticorpos IgM contra o antígeno avaliado, conforme já descrito no item 3.5.3.

Na determinação dos níveis de anticorpos IgM pelo ELISA (rROP2) observou-se uma diferença significativa nos níveis de IgM anti-*T. gondii* entre os grupos de amostras I (infecção aguda) e II (infecção crônica) ( $p < 0,0001$ ), amostras do grupo I e do grupo III (não exposto ou negativo) ( $p < 0,0001$ ) e amostras dos grupos I, II e III com o grupo IV  $p < 0,0001$ . Não foi encontrada diferença significativa entre os valores obtidos pelas amostras dos grupos II e III (infecção crônica e negativo, respectivamente).

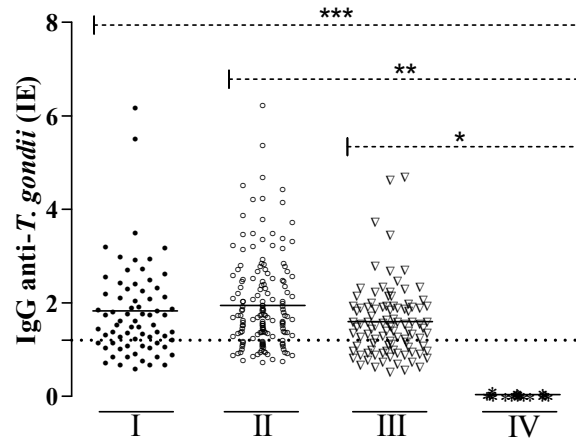
**Figura 5** – Níveis de anticorpos IgM anti-*Toxoplasma gondii* obtidos por ELISA indireto e expressos em índice ELISA (IE) usando antígeno rROP2 em amostras de soro humano de fase aguda (grupo I), crônica (grupo II) negativa (grupo III) e outras doenças (grupo IV). A linha tracejada indica o valor de cut-off (IE >1,2) (Teste de Kruskal-Wallis, pós Teste de Dunn) \*p < 0,0001; \*\* p < 0,0001; \*\*\* p<0,0001; \*\*\*\* p<0,0001; \*\*\*\*\* p<0,0001.



Os resultados obtidos no teste de ELISA (rROP2) na detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* mostraram uma positividade de 72,2% (52/72) e 77,2% (122/158) nos grupos de amostras de soro de pacientes com a doença aguda e crônica, respectivamente. A positividade entre os resultados para o grupo III (não expostos) foi de 66,6%. No grupo II, 11 amostras apresentaram reatividade para anticorpos IgM e IgG, sendo o IgG de forte avides; destas 11 amostras, sete foram reativas pelo ELISA-IgG (rROP2) e uma não foi analisada.

No ensaio para detecção de IgG no ELISA (rROP2), foi observada diferença entre os níveis de IgG do grupo I e IV ( $p < 0,0001$ ), entre o grupo II e IV ( $p < 0,0001$ ), e entre os grupos III e IV ( $p < 0,0001$ ), (figura 6).

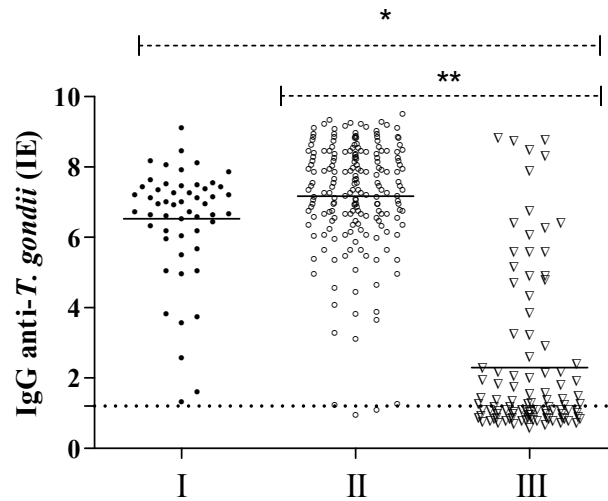
**Figura 6** – Níveis de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* obtidos por ELISA indireto e expressos em índice ELISA (IE) usando antígeno rROP2 em amostras de soro humano de fase aguda (grupo I), crônica (grupo II) negativa (grupo III) e outras doenças (grupo IV). A linha tracejada indica o valor de *cut-off* (IE >1,2) (Teste de Kruskal-Wallis, pós Teste de Dunn) \*p < 0,0001; \*\*p < 0,0001; \*\*\*p < 0,0001.



Para a determinação dos níveis de anticorpos IgG anti-*T. gondii* pelo ELISA-IgG (STAg), 353 amostras de soro foram testadas; 19 amostras do grupo I, 11 do grupo II, 6 do grupo III e o grupo IV não foram analisadas. Observou-se uma diferença significativa nos níveis de IgG anti-*T. gondii* dos grupos I e II de amostras (infecção aguda e crônica, respectivamente) em relação ao grupo III de amostras ( $p < 0,0001$ ); no entanto, não foi encontrada a diferença entre os grupos I e II de amostras (Figura 7).

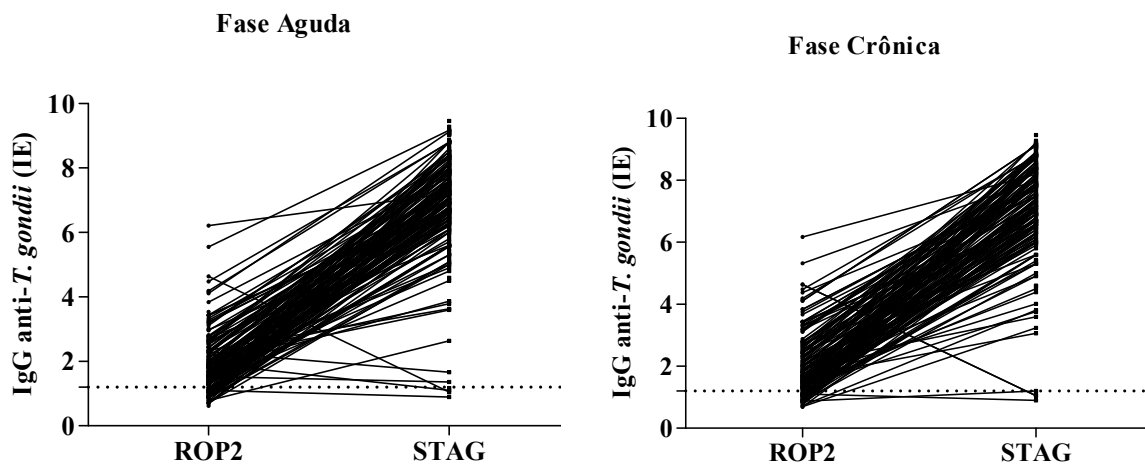
Ao verificar a positividade das amostras utilizando o ELISA-IgG (STAg), verificou-se uma alta concordância nas taxas de positividade nos grupos I e II, sendo 100% (53/53) no grupo I de amostras com infecção aguda e 97,9% (192/196) no grupo II de amostras com infecção crônica. No grupo III de amostras (não expostos), a concordância entre os resultados foi menor, de 50% (52/104). No grupo II, 11 amostras apresentaram reatividade para anticorpos IgM e IgG sendo o IgG de forte avides; destas 11 amostras, seis foram reativas pelo ELISA-IgM (rROP2) e cinco não foram analisadas. Quando os resultados obtidos nos testes de ELISA-IgG (STAg) e ELISA-IgG (rROP2) realizados com amostras de soro dentro do mesmo grupo (I e II), não foi encontrada diferença significativa.

**Figura 7** – Níveis de IgG anti-*Toxoplasma gondii* determinados por ELISA indireto e expressos em índice ELISA (IE) usando antígeno STAg em amostras de soro humano de fase aguda e crônica, comparado a amostras de soro humano não expostos (negativo). A linha tracejada indica o valor do *cut-off* (IE >1,2) (Teste de Kruskal-Wallis, pós Teste de Dunn). \* $p < 0,0001$ ; \*\* $p < 0,0001$ .

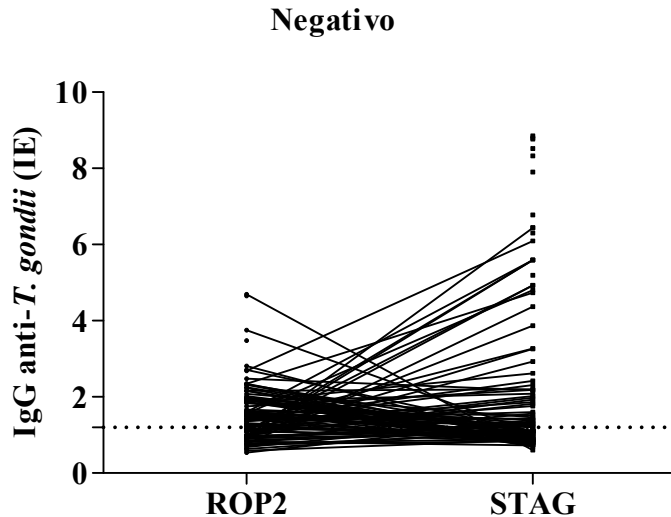


Os níveis de anticorpos IgG anti-*T. gondii* obtidos pelo teste de ELISA-IgG (rROP2) e ELISA-IgG (STAg) foram analisados para cada grupo de amostras de soro humano (Figuras 8 e 9).

**Figura 8** – Análise pareada dos níveis de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* obtidos nas amostras de soro humano caracterizadas como de fase aguda e fase crônica determinados por ELISA indireto e expressos em índice ELISA (IE) usando antígeno rROP2 e o antígeno STAg. A linha tracejada indica o valor do *cut-off* (IE >1,2) (Teste de Wilcoxon,  $p < 0,0001$  para ambos os grupos).



**Figura 9** – Análise pareada dos níveis de anticorpos IgG anti *Toxoplasma gondii* em amostras de soro humano negativo (Grupo III) determinados por ELISA indireto e expressos em índice ELISA (IE) usando antígeno rROP2 e antígeno STAg. A linha tracejada indica o valor do *cut-off* (IE >1,2) (Teste de Wilcoxon,  $p = 0,5350$ ).



### 3.5.6 Sensibilidade, Especificidade e Índice Kappa

As 410 amostras utilizadas neste trabalho, todas foram previamente triadas para verificar a presença de anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii* e avidéz de IgG pelos diferentes métodos sorológicos (IFI, CMIA).

A tabela 3 mostra a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, acurácia e valor Kappa, utilizando a IFI como “padrão ouro”.

Dentre a técnicas realizadas, a CMIA foi a que apresentou maior sensibilidade (99,2%) e especificidade (82,7%). Na análise da comparação entre os testes aplicados, a CMIA

apresentou melhor desempenho cujo valor Kappa foi de 0,86, significando uma ótima concordância entre as técnicas avaliadas. Já o menor índice de concordância obtido nesse estudo foi no teste de ELISA- IgG (rROP2), cujo índice Kappa foi ruim (0.02).

**Tabela 5** – Avaliação da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, acurácia e valor Kappa nos testes de CMIA-IgG, ELISA-IgG (rROP2), ELISA-IgG (STAg) utilizando a IFI como padrão ouro.

<b>Imunofluorescência indireta-IgG</b>						
<b>Teste</b>	<b>Sensibilidade (%)</b>	<b>Especificidade (%)</b>	<b>VPP (%)</b>	<b>VPN (%)</b>	<b>Acurácia (%)</b>	<b>Kappa</b>
<b>CMIA-IgG</b>	99,2	82,7	93,5	97,8	94,6	0,86
<b>ELISA-IgG (rROP2)</b>	75,6	33,3	72,5	37,0	62,9	0,09
<b>ELISA-IgG (STAg)</b>	98,0	50,0	82,4	92,8	84,0	0,55

CMIA: quimioluminescência com micropartícula

ELISA:enzimaimunoensaio

rROP2:antígeno recombinante de roptrias 2 do *Toxoplasma gondii*

STAg:antígeno total solúvel do *Toxoplasma gondii*

VPP: valor preditivo positivo

VPN: valor preditivo negativo

Na tabela 6, são demonstrados os valores obtidos na comparação entre os testes sorológicos, utilizando como “padrão ouro” a reação de CMIA-IgG.

**Tabela 6** – Avaliação da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, acurácia e valor Kappa nos testes de IFI, ELISA-IgG (rROP2), ELISA-IgG (STAg) utilizando o método de CMIA como padrão ouro.

<b>CMIA-IgG</b>						
<b>Teste</b>	<b>Sensibilidade (%)</b>	<b>Especificidade (%)</b>	<b>VPP (%)</b>	<b>VPN (%)</b>	<b>Acurácia (%)</b>	<b>Kappa</b>
<b>IFI-IgG</b>	93,5	97,8	99,2	82,7	94,6	0,86
<b>ELISA-IgG (rROP2)</b>	75,2	32,9	74,5	33,7	63,5	0,08
<b>ELISA-IgG (STAg)</b>	98,5	59,7	88,2	92,8	88,9	0,66

CMIA: quimioluminescência com micropartícula

ELISA:enzimaimunoensaio

ROP2:antígeno de roptrias 2 do *Toxoplasma gondii*

STAg:antígeno total solúvel do *Toxoplasma gondii*

VPP: valor preditivo positivo

VPN: valor preditivo negativo

Como teste único na identificação de anticorpos IgM realizado nas amostras do presente estudo, a CMIA-IgM foi considerada como “padrão ouro” para a comparação dos resultados obtidos na identificação de IgM pelo ELISA (rROP2).

A tabela 7 demonstra os resultados da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, acurácia e valor Kappa obtidos para o ELISA (rROP2).

**Tabela 7** –Avaliação da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, acurácia e valor Kappa no teste de ELISA-IgM (rROP2), utilizando a CMIA como padrão ouro.

CMIA-IgM						
Teste	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	VPP (%)	VPN (%)	Acurácia (%)	Kappa
<b>ELISA-IgM (rROP2)</b>	92,5	38,3	32,8	94,0	51,6	0,19

CMIA: quimioluminescência com micropartícula

ELISA:enzimaimmunoensaio

rROP2:antígeno recombinante de roptrias 2 do *Toxoplasma gondii*

VPP: valor preditivo positivo

VPN: valor preditivo negativo

Para compararmos a concordância entre os ELISAs na detecção de anticorpos IgG anti-*T.gondii*, foi calculado a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, acurácia e valor Kappa obtidos para o ELISA-IgG (rROP2), utilizando o ELISA-IgG (STAg) como “padrão ouro” e os resultados encontram-se na tabela 8.

**Tabela 8** –Avaliação da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), acurácia e valor Kappa no teste de ELISA-IgG (rROP2) utilizando a ELISA-IgG (STAg) como padrão ouro.

ELISA-IgG (STAg)						
Teste	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	VPP (%)	VPN (%)	Acurácia (%)	Kappa
<b>ELISA-IgG (rROP2)</b>	73,3	29,0	81,8	20,0	65,0	0.02

ELISA:enzimaimmunoensaio

rROP2:antígeno recombinante de roptrias 2 do *Toxoplasma gondii*

STAg:antígeno total solúvel do *Toxoplasma gondii*

VPP: valor preditivo positivo

VPN: valor preditivo negativo

### 3.6 DISCUSSÃO

Sabe-se que a infecção pelo *T. gondii* é frequentemente assintomática ou apresenta sintomas leves, tornando o diagnóstico clínico, na maioria das vezes, inconclusivo. Ensaios sorológicos para determinar a presença de anticorpos específicos são rotineiramente utilizados, tanto na identificação da infecção recente como na infecção tardia (SENSINI, 2006; CANDOLFI et al., 2007). A abordagem para a diferenciação das fases de infecção baseia-se na detecção de anticorpos IgM e IgG; porém, a persistência de anticorpos IgM residuais anti-*T. gondii* por meses e até anos após a infecção aguda faz com que a determinação da avidéz de IgG seja necessária (GATKOWSKA et al., 2010). No entanto, o tratamento com espiramicina em pacientes imunocomprometidos ou em mulheres grávidas pode retardar a produção e maturação da avidéz de anticorpos IgG anti-*T. gondii* (MECHAIN et al., 2000). Desta forma, a introdução de métodos que empreguem antígenos recombinantes bem definidos do *T. gondii* pode ser uma solução para melhorar o diagnóstico da toxoplasmose.

A utilização de antígenos recombinantes do *T. gondii* produzidos em sistemas procariotos, como em *Escherichia coli*, encontra-se descrita em diversos trabalhos. Pietkiewicz et al. (2004) e Hiszczyńska-Sawicka et al. (2003) avaliaram os antígenos recombinantes GRA1, GRA7 e SAG1 na pesquisa de IgG em soro humano e não encontraram influência da *E. coli* nos resultados do ELISA, ressaltando que a natureza e a pureza das proteínas obtidas pelo sistema de expressão em *E. coli* é de suma importância para garantir a exatidão dos resultados no ELISA.

No presente estudo, a presença de bandas não pertencentes à proteína rROP2 pode ser visualizada após a etapa de purificação desta proteína (figura 4), sugerindo a necessidade de uma melhora no procedimento de purificação deste sistema, garantindo maior pureza para este antígeno e diminuindo, desta forma, o ruído encontrado na leitura espectrofotométrica dos resultados obtidos no ELISA realizado.

A produção da proteína rROP2 tem se mostrado de baixa expressão e as técnicas de solubilização tem gerado alto grau de degradação da proteína (VAN GELDER, et al., 1993). Isso pode ser atribuído à sensibilidade dessa proteína as proteases do hospedeiro. Algumas formas de proteínas truncadas da rROP2 são expressas fusionadas com o peptídeo Cro-Lacl ou com seis resíduos de tag de histidina (MARTIN et al., 1998; COUGHALAN et al., 1995). A rROP2 obtida no presente trabalho apresentou nível baixo de expressão sendo encontrada sempre na fração insolúvel. Características como alta degradabilidade foi

verificada na expressão, purificação e durante o armazenamento desta proteína, o que pode explicar a baixa reprodutibilidade inter-ensaio apresentada nos resultados.

Utilizando o antígeno rROP2 para a detecção de anticorpos IgM e IgG anti-*T. gondii*, encontramos positividade para ambas as fases de infecção (aguda e crônica). Na detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii*, foi encontrada uma positividade de 94,3% (67/71) no grupo de amostras da fase aguda da infecção e de 62,2% (99/159) no grupo de amostras da fase crônica da infecção, resultando em uma sensibilidade de 92,5% quando comparado com a CMIA-IgM.

Quando o teste de IFI foi considerado padrão-ouro, o teste de ELISA-IgG (rROP2) para detecção de IgG apresentou uma positividade de 72,2% (52/72) no grupo de amostras da fase aguda e positividade de 77,2% (122/158) e sensibilidade de 75,6% no grupo fase crônica.

Martin et al. (1998) também obtiveram positividade para ambas as fases da infecção, sendo de 82,8% em amostras de soro pertencentes a fase crônica e de 97,6% em amostras de soro quem continham imunoglobulinas marcadoras de fase aguda (IgM e IgA) na infecção pelo *T. gondii*. Esses resultados mostraram que durante a infecção humana com o *T. gondii*, o antígeno ROP2 promove uma forte resposta humoral com produção de anticorpos de fase aguda (IgM e IgA), assim como os anticorpos de fase crônica (IgG), que por sua vez pode ser atribuída ao fato da proteína ROP2 ser detectada e expressa em todos os estágio de desenvolvimento do *T. gondii* (MARTIN et al., 1998; SADAK, et al., 1988). Resultados semelhantes a estes também foram obtidos por Aubert et al. (2000) e Van Gelder et al. (1993); neste último estudo, apenas 10% das amostras de soro testadas não apresentaram reatividade para o antígeno rROP2, possivelmente devido a heterogenicidade da resposta imunológica da população humana, onde alguns indivíduos podem não produzir uma resposta de anticorpo contra epítomos presentes neste antígeno.

O antígeno rROP2 utilizado para a detecção de IgG neste estudo não foi capaz de diferenciar amostras de soro pertencentes à fase aguda ou fase crônica, apresentando diferença significativa ( $p < 0,0001$ ) apenas na discriminação entre as amostras de soro de paciente na fase crônica, crônico e indivíduos não expostos com o grupo de amostras reativos para outras doenças. Porém, na determinação dos níveis de anticorpos IgM pelo ELISA (rROP2), observou-se uma diferença significativa nos níveis de IgM entre os grupos de amostras do grupo agudo (I) e crônico (II) ( $p < 0,0001$ ), agudo (I) e negativo (III) ( $p < 0,0001$ ) e agudo, crônico e negativo com outras doenças (IV) ( $p < 0,0001$ ). Gatkowska et al. (2010), utilizando o modelo experimental em camundongos para a determinação do potencial

diagnóstico dos antígenos recombinantes ROP2 e ROP4, observaram um aumento considerável e significativamente maior de anticorpos IgM durante o período da soroconversão (fase aguda para crônica) quando comparado com a concentração de IgM na fase crônica, demonstrando portanto, uma maior afinidade da rROP2 por anticorpos pertencentes à fase aguda da infecção, acompanhado de menores valores de anticorpos IgG. Segundo Beckers et al. (1994) e Carey et al. (2004), este fenômeno pode ser resultado da natureza dos antígenos de roptrias e pelo fato de serem liberados no início do processo de invasão celular como antígenos associados à entrada na célula do hospedeiro.

Diversos trabalhos relatam a reatividade distinta de anticorpos frente a diferentes antígenos recombinantes, sendo recomendado o uso de uma combinação de diferentes antígenos. Jacobs et al. (1999) avaliaram a performance dos antígenos recombinantes ROP2 e GRA7 na aplicação do diagnóstico em amostras de soro humano e verificaram que a proteína rGRA7 aumentou a sensibilidade do teste para 96% quando utilizada juntamente com a proteína rROP2 no ELISA, em comparação com a rGRA7 e rROP2 utilizadas sozinhas em cada teste, quando a sensibilidade foi de 81% e 88% respectivamente. Fica claro que a presença de múltiplos epítomos distintos aumentaria a probabilidade de detectar anticorpos anti-*T. gondii* em diferentes estágios de infecção (PIETKIEWICZ, et al., 2004; BUFFOLANO et al., 2004; BEGHETTO et al., 2006).

O teste de ELISA utilizando o antígeno STAg apresentou positividade de 100% (53/53) no grupo de amostras da fase aguda da infecção e de 97,9% (192/196) no grupo de amostras da fase crônica da infecção, com sensibilidade de 98%, especificidade de 50% e índice de correlação Kappa de 0,55 quando comparada à técnica de IFI. Resultados melhores que este foram obtidos por Albuquerque et al. (2012), que ao avaliarem três metodologias para o diagnóstico da toxoplasmose, encontraram maior índice de positividade (60%) ao utilizarem o ELISA quando comparado a IFI (51%), cuja sensibilidade foi de 92,8%, especificidade de 74,1% e índice de correlação Kappa de 0,7.

Mioranza et al. (2008) encontraram resultados muito semelhantes entre ambas as técnicas de IFI e ELISA, em que a sensibilidade foi de 97,8%, especificidade de 100% e valor do índice Kappa de 0,97. A concordância entre os resultados obtidos pela IFI e ELISA nem sempre são absolutas e as diferenças encontradas podem ocorrer devido ao uso de antígenos distintos, sendo ele íntegro na IFI e solúvel no ELISA, detectando neste último anticorpos de aparecimento mais tardio (VAN KNAPEN et al., 1984)

A técnica de IFI foi utilizada como padrão ouro para pesquisa de IgM no presente estudo pois, segundo Camargo (2001), apresenta sensibilidade e especificidade

semelhantes ao teste de Sabin Feldman, que apesar da sua utilização apresentar restrições pelo uso de toxoplasmas vivos, ainda é considerado um teste de referência para diagnóstico sorológico da toxoplasmose (REITER-OWONA et al., 1999). Atualmente, o método de IFI, por ser manual e necessitar de profissionais treinados para a sua leitura que é subjetiva, está sendo substituído por métodos automatizados como o ELISA e a CMIA.

Hovanec et al. (1998) pesquisaram a presença de anticorpos IgG no soro humano utilizando o método de CMIA (IMMULITE, DPC, Medlab) e como padrão ouro o teste de Sabin Feldman. Os resultados obtidos verificaram uma sensibilidade de 94%, especificidade de 100% e acurácia de 97,3%. Robert et al. (2001) obtiveram sensibilidade de 99,4% e especificidade de 100% na comparação entre a CMIA com o MEIA para a pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. gondii* e sensibilidade de 100% e especificidade de 98,4% na pesquisa de anticorpos IgM anti-*T. gondii*.

No presente estudo foi verificado que na comparação entre os métodos, a CMIA para pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. gondii* forneceu mais resultados concordantes com a IFI (padrão-ouro), apresentando alta sensibilidade, de 99,2%, especificidade de 82,7% e acurácia de 94,6%.

Ao analisarmos a positividade das amostras na identificação de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, encontramos um valor maior de amostras reagente obtidas pela técnica de CMIA que o valor encontrado na triagem realizada pela IFI, com uma discrepância dos resultados obtidos em somente 19 (4.8%) amostras. Das 207 amostras pertencentes ao grupo II, 14 (6.7%) amostras apresentaram títulos menores que 1:16 (o que significa indivíduo não exposto) na IFI, mas reagentes na CMIA e cinco (4,5%) amostras pertencentes ao grupo III foram reagentes na CMIA, porém menores que 1:16 na IFI. Nossos resultados indicam que a CMIA mostrou ser capaz de caracterizar as diferentes fases da infecção pelo *T. gondii*, sendo mais sensível que a IFI.

Para se tornar realmente útil, um teste empregado para o diagnóstico de qualquer doença, além de ter boa sensibilidade e especificidade, deve apresentar outras características relacionadas com custo, procedimento técnico, facilidade de obtenção e estabilidade dos reagentes. O método de ELISA (rROP2) avaliado neste estudo, apresentou baixa reprodutibilidade inter-ensaio o que pode refletir a não estabilidade da proteína recombinante obtida. Diante dos resultados obtidos, o emprego da rROP2 no ELISA como padronizado e descrito neste estudo mostrou ser um bom marcador de fase aguda da infecção, no entanto a sua utilização como um marcador diferencial das fases aguda e crônica deve ser melhor avaliada, situações estas que apresentam alta demanda em laboratórios de rotina para

o atendimento pré-natal das gestantes, monitoramento das gestantes de risco durante a gestação e para o diagnóstico da infecção congênita em recém-nascidos de mães expostas ao parasito durante a gestação.

Não se pretende esgotar o tema relativo ao diagnóstico laboratorial da toxoplasmose neste trabalho, ao contrário, os próprios resultados indicam que muito há ainda para ser feito. A avaliação de outros antígenos recombinantes do *T. gondii* assim como a associação de diferentes antígenos recombinantes ou peptídeos sintéticos que representam importantes epítomos do parasito são estratégias que podem aumentar a acurácia dos métodos laboratoriais, como o ELISA, e sua aplicabilidade no atendimento aos indivíduos com suspeita de toxoplasmose adquirida ou congênita.

## CONCLUSÕES

- A proteína rROP2 foi expressa a partir de plasmídeos recombinantes e apresentou tamanho em torno de 50kDa.
- Na detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii* pelo ELISA-rROP2, foi encontrada positividade de 94,3% (67/71) no grupo de amostras da fase aguda da infecção e de 62,2% (99/159) em amostras da fase crônica da infecção;
- Na detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* pelo ELISA-rROP2, amostras de soro de indivíduos com a fase aguda da infecção, o ELISA-rROP2 IgG apresentou positividade de 72,2% (52/72) e em amostras na fase crônica da infecção, apresentou 77,2% (122/158) de positividade;
- No ELISA-rROP2 IgG, apenas as amostras do grupo com outras doenças não relacionadas ao *T.gondii* foram discriminadas;
- Quando os resultados obtidos foram comparados com a CMIA, a ELISA rRPO2 IgM apresentou 92,5% de sensibilidade e 38,3% de especificidade. Quando os resultados obtidos foram comparados com a IFI, o ELISA rROP2 IgG apresentou 75,6% de sensibilidade e 33,3% de especificidade e quando comparado com a CMIA, o ELISA rRPO2 IgG apresentou 75,2% de sensibilidade e 32,9% de especificidade;
- O método de CMIA foi capaz de detectar um maior número de amostras com anticorpos IgG anti-*T. gondii* reagente do que a IFI, apresentando sensibilidade de 99,2%, especificidade de 82,7% e concordância kappa de 0,86;
- Os resultados obtidos indicam que a CMIA mostrou ser capaz de caracterizar, de forma clara, as diferentes fases da infecção pelo *T. gondii*, sendo mais sensível que a IFI;
- Os resultados demonstraram que ELISA com antígeno rROP2 fornece positividade para ambas as fases de infecção (crônica e aguda). No entanto, na determinação dos níveis de anticorpos IgM pelo ELISA-rROP2, observou-se uma diferença significativa nos níveis de IgM entre os grupos de amostras de infecção aguda e crônica e aguda e negativo, demonstrando, portanto, uma maior afinidade por anticorpos pertencentes à fase aguda da infecção.
- Os resultados da padronização do ELISA indireto utilizando o antígeno rROP2 mostraram que este antígeno pode ser utilizado apenas na triagem para anticorpos IgM anti-*T. gondii* em amostras de soro humano, não sendo indicado o seu uso como teste confirmatório da infecção pelo *T. gondii*.

## REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, M. C.; CONCEIÇÃO, R. M. P.; NICOLAU, J. L.; NEVES, L. B.; AMENDOEIRA, M. R. R. Avaliação de Três Métodos Sorológicos Utilizados no Diagnóstico da Toxoplasmose. **NewsLab**, p. 96-101. 2012.
- ARAÚJO, P. R. B., FERREIRA, A. W. F. Avidity of IgG antibodies against excreted/secreted antigens of *Toxoplasma gondii*: immunological marker for acute recent toxoplasmosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 2, p. 142-147, 2008.
- AUBERT, D.; MAINE, G. T.; VILLENA, I.; HUNT, J. C.; HOWARD, L.; SHEU, M.; BECKERS, J. M.; DUBREMETZ, J. F.; MERCEREAU-PUIJALON, O.; JOINER, K. A. The *Toxoplasma gondii* Rhopty Protein ROP 2 Is Inserted into the Parasitophorous Vacuole Membrane, Surrounding the Intracellular Parasite, and Is Exposed to the Host Cell Cytoplasm. **The Journal of Cell Biology**, v. 127, n. 4, p. 947-961, 1994.
- 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.
- BROJANAC, S.; CHOVAN, L. E.; NOWLAN, S. F.; PINON, J. M. Recombinant Antigens To Detect *Toxoplasma gondii*-Specific Immunoglobulin G and Immunoglobulin M in Human Sera by Enzyme Immunoassay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1144-1150, 2000.
- 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. 825-803, 2004.
- CALAMEL M. ; LAMBERT M. ELISA. Elaboration d'un modele mathématique Informatisé pour l'expression du sérodiagnostic de la toxoplasmose un U.I. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 136, p. 295-302, 1985.
- CAMARGO ME. Introdução às técnicas de imunofluorescência. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, n.10, p.143-171, 1973.
- CAMARGO, M. E. Toxoplasmose. In: FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. L. M. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-ímmunes**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 278-287.
- 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 Infection Disease**, v. 58, n. 1, p. 83-88, 2007.
- CAREY, K. L.; JONGEO, A. M.; KIM, K.; WARD, G. E. The *Toxoplasma gondii* rhopty protein ROP 4 is secreted into the parasitophorous vacuole and becomes phosphorylated in infected cells. **Eukaryotic cell**, v. 3, p. 1320-1330.

- COUGHLAN, N. S.; SAMAN, S.; JACOBS, D.; MERCIER, C.; CESBRON-DELAUW, M. F.; TREES, S. J. Cellular and humoral immune response to recombinant antigens in sheep infected with *Toxoplasma gondii*. **Parasite Immunology**, v. 17, p. 465-468, 1995.
- DUBEY, J. P., Toxoplasmosis—a waterborn zoonosis. Review. **Veterinary Parasitology**, v. 126, n. 1-2, p. 57-72, 2004.
- FERREIRA, W. A.; ÁVILA, S. L. M. **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças infecciosas e Auto-Imunes**. Rio de Janeiro: Guanabara; 1996. p 1-6.
- GATKOWSKA, J.; DZIADEK, B.; BRZOSTEK, A.; DZIADEK, J.; DZITKO, K.; DLUGONSKA, H. Determination of diagnostic value of *Toxoplasma gondii* recombinant ROP2 and ROP4 antigens in mouse experimental model. **Polish Journal of Microbiology**, v. 59, n. 2, p. 137-141, 2010.
- GOLKAR, M.; RAFATI, S.; ABDEL-LAFIT, 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 diagnosis 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.
- HISZCZYNSKA-SAWICKA, E.; KUR, J. PIETKIEWICZ, H. HOLEC, L.; GASIOR, S. 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.
- HOVANEC, D. B.; CERVANTES, C.; GERSTENECKER, B.; SOLL, H. J.; JANITSCHKE, J.; SHAMI, A. S. Detection of *Toxoplasma gondii*-Specific IgG by Immulite. Atlanta. Poster 11386, **American Society for Microbiology**, 1998.
- IGARASHI, M.; KANO, F.; TAMEKUNI, K.; MACHADO, R. Z.; NAVARRO, I. T.; VIDOTTO, O.; VIDOTTO, M. C.; GARCIA J. L. *Toxoplasma gondii*: Evaluation of an intranasal vaccine using recombinant proteins against brain cyst formation in BALB/c mice. **Experimental Parasitology**, v. 118, p. 386–392, 2008.
- JACOBS, D.; VERCAMMEN, M.; SAMAN, E. Evaluation of Recombinant Dense Granule Antigen 7 (GRA7) of *Toxoplasma gondii* for Detection of Immunoglobulin G Antibodies and Analysis of a Major Antigenic Domain. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 6; n.1; p. 24–29, 1999.
- 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.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 192, n. 1, p. 265-275, 1951.
- LUNDÉN, A. Immune responses in sheep after immunization with *Toxoplasma gondii* antigens incorporated into iscoms. **Veterinary Parasitology**, v. 56, p. 23-35, 1995.

- MARTIN, V.; ARCAVI, M.; SANTILLAN, G.; AMENDOEIRA, M. R. R.; NEVES, E. S.; GRIEMBERG, G.; GUARNERA, E.; GARBERI, J. C.; ANGEL, S. O. Detection of Human *Toxoplasma*-Specific Immunoglobulins A, M, and G with a Recombinant *Toxoplasma gondii* Rop2 Protein. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 5, n. 5, p. 627–631, 1998.
- MECHAIN, B.; GARIN, Y. J. F.; ROBERT-GANGNEUX, F.; DUPOUY-CAMET J.; DEROUIN, F.; Lack of utility of specific immunoglobulin G antibody avidity for diagnosis of reactivated toxoplasmosis in immunocompromised patients. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 7, p. 703-705, 2000.
- MINEO J. R.; CAMARGO M. E.; FERREIRA A.W. Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Toxoplasma gondii* polisaccharide in human toxoplasmosis. **Infection and Immunity**, v. 27, p. 283-287, 1980.
- MIORANZA, S. L.; MEIRELES, L. R.; MIORANZA, E. L.; ANDRADE, H. F J. Evidência sorológica da infecção aguda pelo *Toxoplasma gondii* em gestantes de Cascavel, Paraná. Serological evidence of acute *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women in Cascavel, Paraná. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 6, p. 628-634, 2008.
- MONTOYA, J. G.; ROSSO, F. Diagnosis and Management of Toxoplasmosis. **Clinics in Perinatology**, v. 32, p. 705– 726, 2005.
- NIGRO, M.; GUTIERRES, A.; HOFFER, A. M.; CLEMENTE, M.; KAUFER, F.; CARRAL, J.; MARTIN, V.; GRANERA, E. A.; ANGEL, S.O. Evaluation of *Toxoplasma gondii*
- PETERSEN, E. Toxoplasmosis, **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, v. 12, n. 2, p. 214-223, 2007.
- PIETKIEWICZ, H.; HISZCZYN´SKA-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. 1779–178, 2004.
- REITER-OWONA, I.; PETERSEN, E.; JOYNSON, D.; ASPÖCK, H.; DARDÉ, M. L.; DISKO, R.; DREAZEN, O.; DUMON, H.; GRILLO, R.; GROSS, U.; HAYDE, M.; HOLLIMAN, R.; HO-YEN, D. O.; JANITSCHKE, K.; JENUM, P. A.; NASER, K.; OLSZEWSKI, M.; THULLIEZ, P.; SEITZ, H. M. The past and present role of the Sabin-Feldman dye test in the serodiagnosis of toxoplasmosis. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 77, n. 11, p. 929-935, 1999.
- ROBERT, J. A. D.; HISKE, D. H.; JORIEN, K. D. H.; FER, V. Antenatal Screening for Hepatitis B and Antibodies to *Toxoplasma gondii* and Rubella virus: Evaluation of two commercial immunoassay systems. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.8, n.4, p. 785-787, 2001.
- SABIN, A. B. Toxoplasmic encephalitis in children, **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 116, p. 801–807, 1941.

- SADAK, A.; TAGHY, Z.; FORTIER, B.; DUBREMETZ, J. F. Characterization of a family of rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, p. 203-211, 1988.
- 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.
- SOUZA E SILVA, C. H.; ANDRADE, G. Q.; JANUÁRIO, J. N.; CARNEIRO, A. C. A. V.; CARNEIRO, M.; VASCONCELOS-SANTOS, D. V.; VITOR, R. W. A. Early diagnosis of congenital toxoplasmosis in newborn infants using IgG subclasses against two *Toxoplasma gondii* recombinant proteins. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 3, p. 342-347, 2012.
- SOUZA, W.; DUARTE, E. S. M.; LEMGRUBER, L.; ATTIAS, M.; VOMMARO, R.C. Organização estrutural do taquizoíto de *Toxoplasma gondii*. **Scientia Medica**, v. 20, n. 1, p. 131-143, 2010.
- TENTER A. M.; HECKEROTH A. R.; WEISS L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1217-58, 2000.
- VAN GELDER, P.; BOSMAN, F.; DE MEUTER, F.; VAN HEUVERSWEYN, H.; HERION, P. Serodiagnosis of Toxoplasmosis by Using a Recombinant Form of the 54-Kilodalton Rhoptry Antigen Expressed in *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 1, p. 9-15, 1993.
- VAN KNAPEN, F. V. Immunodiagnosis of Toxoplasmosis. **Drukkerij Veenaman BV**, Wagenigen, 1984.
- VIDOTTO, O.; NAVARRO I. T.; GIRALDI N.; FREIRE R. L.; MITSUKA R. Estudos Epidemiológicos da Toxoplasmose em suínos da região de Londrina-PR. **Semina**, v. 11; n. 1; p. 53-59, 1990.
- 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.