

LISANDRA AKEMI SUZUKI

*AVALIAÇÃO DOS MARCADORES SOROLÓGICOS
UTILIZADOS NO IMUNODIAGNÓSTICO DA
TOXOPLASMOSE AGUDA ADQUIRIDA*

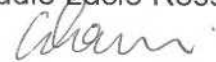
Campinas

1999

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentado ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, Área Ciências Biomédicas da aluna Lisandra Akemi Suzuki.

Campinas, 23 de novembro de 1999

Prof. Dr. Cláudio Lúcio Rossi
Orientador



LISANDRA AKEMI SUZUKI

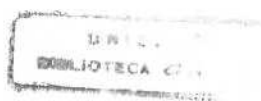
***AVALIAÇÃO DOS MARCADORES SOROLÓGICOS
UTILIZADOS NO IMUNODIAGNÓSTICO DA
TOXOPLASMOSE AGUDA ADQUIRIDA***

*Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de Mestre em
Ciências Médicas, na área de Ciências Biomédicas.*

ORIENTADOR: Prof. Dr. Cláudio Lúcio Rossi

Campinas

1999



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA	71 UNICAMP
	Su 99a
V.	Ex.
ICARHO	BC/39990
PROD.	229/99
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	13/01/00
N.º CPD	

CM-00130613-6

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

Su99a

Suzuki, Lisandra Akemi

Avaliação dos marcadores sorológicos utilizados no
imunodiagnóstico da toxoplasmose aguda adquirida / Lisandra Akemi
Suzuki. Campinas, SP : [s.n.], 1999.

Orientador : Cláudio Lúcio Rossi

Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas.

1. *Toxoplasma gondii*. 2. Sorologia. 3. Reações antígeno-
anticorpo. I. Cláudio Lúcio Rossi. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Lúcio Rossi

Membros:

1. Prof. Dra. Yoshimi Imoto Yamamoto - Yoshimi Yamamoto
2. Prof. Dra. Sílvia de Barros Nazari - Sílvia de Barros Nazari
3. Prof. Dr. Cláudio Lúcio Rossi - Cláudio

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, área Ciências Biomédicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 23/11/99

	PÁG.
RESUMO	<i>i</i>
1. INTRODUÇÃO	1
2. ARTIGO I	15
Summary.....	16
Introduction.....	17
Materials and Methods.....	18
Results.....	20
Discussion.....	21
Resumo.....	22
References.....	23
Table 1.....	25
3. ARTIGO II	26
Abstract.....	28
Introduction.....	30
Materials and Methods.....	32
Results.....	36
Discussion.....	38
References.....	44
Table 1.....	49
Table 2.....	50
4. DISCUSSÃO	51

5. CONCLUSÕES	61
6. SUMMARY	63
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

Dedicatória

À minha avó Isaura, meu
amuleto da sorte

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Cláudio Lúcio Rossi, pelo profissionalismo, pela compreensão e por todas as oportunidades a mim proporcionadas.

À Dra. Sílvia de Barros Mazon, por ter me dado a oportunidade de permanecer na área de Imunologia.

À Dra. Maria Heloísa S. L. Blotta, pelo constante incentivo e interesse.

À Dra. Rosângela Junqueira Rocha e aos funcionários do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia, pela cessão de material à nossa pesquisa e apoio técnico.

Aos funcionários da Seção de Imunologia do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, pela atenção e pelo apoio técnico.

Aos meus companheiros de pós-graduação, Andrea Domênica Teodoro da Silva e Ronei Luciano Mamoni, cuja amizade sempre me fortaleceu.

Aos meus pais, por nunca deixarem de acreditar em mim.

RESUMO

O diagnóstico da toxoplasmose aguda adquirida é, frequentemente, baseado na detecção de anticorpos específicos IgM anti-*T.gondii* e/ou elevação significativa dos títulos de anticorpos IgG. Entretanto, a elevada ocorrência de altos títulos de IgG anti-*T. gondii* em pessoas saudáveis e a persistência, em alguns casos, dos anticorpos IgM por muito tempo após infecção com o parasita pode dificultar a interpretação dos resultados dos testes sorológicos quando se suspeita de toxoplasmose aguda. Em nosso primeiro estudo, são apresentados os resultados da detecção de anticorpos específicos da classe IgA e da determinação da avididade dos anticorpos IgG em amostras sequenciais de soros de um paciente apresentando níveis significativos de anticorpos IgM anti-*T.gondii* durante sete anos após o início dos sintomas clínicos da toxoplasmose. Os anticorpos IgA foram quantificados por uma técnica de ELISA de captura (ETI-TOXOK-A). O paciente ainda apresentou um resultado positivo (>10 UA/ml) em uma amostra de soro coletada dois anos após o início das manifestações clínicas. A avididade dos anticorpos IgG foi determinada com o sistema Falcon assay screening test (F.A.S.T.®) – ELISA, utilizando somente uma diluição da amostra de soro. Índices de avididade compatíveis com uma infecção aguda foram encontrados nas amostras de soros obtidas durante os cinco primeiros meses após o início dos sintomas clínicos. O objetivo do segundo estudo foi avaliar vários marcadores sorológicos para o diagnóstico da toxoplasmose aguda adquirida, tais como a detecção de anticorpos IgA e IgE anti-*T. gondii*, o teste de aglutinação diferencial (AC/HS) e os testes baseados na determinação da avididade dos anticorpos IgG. Foram testadas, num total de 64 amostras de soros, 31 amostras de soros de pacientes com infecção adquirida recentemente e 33 amostras de soros de pacientes com infecção crônica. Os anticorpos IgA foram quantificados por meio de dois “kits” de ELISA de captura (Platelia® Toxo-IgA e ETI-TOXOK A) e um “kit” de ELISA automatizado (IMx Toxo-IgA). Níveis de anticorpos IgA compatíveis com infecção recente foram detectados em todas as amostras de soros dos pacientes com toxoplasmose aguda, com os três “kits”. Por outro lado, a análise das amostras de soros dos 33 pacientes com toxoplasmose crônica mostrou que níveis significativos de anticorpos IgA podem ser detectados com alta frequência durante a fase crônica da infecção, com os três “kits”. Anticorpos IgE anti-*T. gondii* foram detectados, pela técnica de imunocaptura-aglutinação (ISAGA), em 26 (84%) dos 31 pacientes com toxoplasmose aguda e em duas amostras de soros de pacientes com toxoplasmose crônica coletadas mais de um ano após o início das manifestações clínicas. Vinte e nove (94%) dos

31 pacientes com infecção aguda e 15 (45%) dos 33 pacientes com infecção crônica apresentaram, no teste AC/HS, um padrão compatível com toxoplasmose aguda. A avidéz dos anticorpos IgG anti-*T. gondii* foi determinada por dois métodos diferentes. Um dos métodos, utilizando o “kit” comercial Platelia Toxo-IgG, foi baseado na titulação de cada amostra de soro e cálculo dos títulos, com e sem o tratamento com uréia, em relação a um valor de “cut-off” definido. No outro método, utilizando o sistema F.A.S.T.- ELISA, foi feita apenas uma única diluição da amostra de soro, e foram comparadas as absorbâncias das reações na presença e ausência de uréia. Todas as 31 amostras de soros de pacientes com infecção aguda apresentaram índices compatíveis com toxoplasmose aguda pelo método de titulação, ao passo que, com o método de diluição única, 4 destas amostras apresentaram resultados duvidosos, mostrando que o método de titulação das amostras foi mais sensível para o diagnóstico de infecção recente. Resultados semelhantes foram obtidos no grupo de 33 pacientes com toxoplasmose crônica pelos dois métodos; apenas uma amostra de soro apresentou um índice de avidéz não compatível com a fase crônica, pelo método de titulação.

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que os marcadores sorológicos, atualmente utilizados para o diagnóstico da toxoplasmose aguda adquirida, possuem limitações significativas. Nossos dados sugerem que a determinação da avidéz dos anticorpos IgG anti-*T. gondii*, principalmente pelo método de titulação das amostras de soros, pode ser bastante útil para um diagnóstico mais confiável do estágio em que se encontra a infecção, nos pacientes que apresentam níveis significativos de anticorpos IgM.

1. INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma infecção causada pelo protozoário intracelular *Toxoplasma gondii*. O ciclo sexual ocorre no epitélio intestinal do hospedeiro felino e resulta na formação de oocistos não-infectantes, que são eliminados nas fezes dos gatos. Na presença de oxigênio, com temperatura variando de 20 a 30°C, num intervalo de um a três dias, os oocistos esporulam, tornando-se infectantes para pássaros e mamíferos, incluindo o homem (FRENKEL, 1991). Quando ocorre ingestão de cistos ou oocistos, as formas taquizoítas são liberadas no tubo gastrointestinal, onde se multiplicam nas células da mucosa. Os taquizoítas se disseminam, então, por via hematogênica ou linfática, infectando células nucleadas do hospedeiro. Após multiplicação intracelular, as células infectadas rompem-se e as novas formas taquizoítas liberadas são capazes de infectar as células adjacentes. A destruição celular ocorre até o desenvolvimento da imunidade humoral e celular (COUVREY & DESMONTS, 1988). Os cistos formados no interior das células do hospedeiro são compostos de um conjunto de formas bradizoítas, que são envoltas por uma membrana resistente. Os cistos podem se localizar em vários tecidos ou órgãos, mas são encontrados preferencialmente no cérebro, na retina e nos músculos estriados (LUFT & REMINGTON, 1985; MACÊDO, 1994). Na maioria das vezes, o homem adquire a infecção pela ingestão dos oocistos presentes no solo, pelo consumo de carne crua ou mal-cozida ou por infecção transplacentária (FRENKEL, 1991). Outras vias pouco comuns de transmissão incluem a transfusão sanguínea, a infecção laboratorial e o transplante de órgãos (DESMONTS & REMINGTON, 1980; REMINGTON & DESMONTS, 1990).

A toxoplasmose é, geralmente, assintomática ou está associada com sintomas clínicos brandos e não-específicos, em indivíduos imunocompetentes (KEAN, 1972; KRICK & REMINGTON, 1978). A manifestação clínica mais comumente observada na toxoplasmose aguda adquirida é a linfadenopatia cervical (McCABE *et al.*, 1987; REMINGTON & DESMONTS, 1990). Frequentemente, podem, também, estar envolvidos os grupos de linfonodos das áreas suboccipital, supraclavicular, axilar e inguinal (REMINGTON & DESMONTS, 1990). A linfadenopatia regional é a mais observada, e está, ocasionalmente, associada com febre, mal-estar geral, dor de cabeça, dor de garganta e mialgia, raramente evoluindo para uma doença disseminada (JONES, KEAN, KIMBALL, 1969; RAFATY, 1977; COUVREY & DESMONTS, 1988; REMINGTON & DESMONTS, 1990; MONTOYA & REMINGTON, 1995).

Ao contrário do que ocorre em indivíduos imunocompetentes, a toxoplasmose pode ser altamente debilitante e, ocasionalmente fatal, em determinados tipos de pacientes, como crianças com infecção congênita e pacientes com deficiência do sistema imune. As manifestações no recém-nascido variam de uma infecção assintomática a um quadro de má formação, podendo haver envolvimento ocular e cerebral e, inclusive, resultar em óbito (DESMONTS & COUVREUR, 1974a; DESMONTS & COUVREUR, 1974c; WILSON *et al.*, 1980; REMINGTON & DESMONTS, 1990). No caso de pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), a complicação mais grave é a encefalite toxoplásmica, considerada a infecção mais comum do sistema nervoso central em indivíduos HIV positivos (JONES *et al.*, 1996; RAMÍREZ *et al.*, 1997). Vários estudos indicam a presença de infecção por *T. gondii* pré-existente que permanece inativa até o comprometimento da imunidade do hospedeiro, quando o parasita torna-se novamente capaz de disseminar e causar doença sistêmica, freqüentemente fatal (WALLS, 1988).

O diagnóstico da toxoplasmose é, freqüentemente, baseado em testes sorológicos que detectam anticorpos IgM específicos ou um aumento significativo nos níveis de anticorpos específicos da classe IgG. Entretanto, em virtude da ocorrência de altos títulos de IgG anti-*T. gondii* em pessoas sadias (REMINGTON & DESMONTS, 1990) e da persistência, em alguns casos, dos anticorpos IgM por muito tempo após infecção com o parasita (VAN LOON *et al.*, 1983; BROOKS, McCABE, REMINGTON, 1987; DEL BONO *et al.*, 1989; BOBIC, SIBALIC, DJURKOVIC-DJAKOVIC, 1991), a interpretação dos resultados sorológicos pode ser difícil quando se suspeita de toxoplasmose aguda (REMINGTON, MILLER, BROWNLEE, 1968; VAN LOON *et al.*, 1983; DEL BONO *et al.*, 1989; TAKAHASHI & ROSSI, 1994; JENUM, STRAY-PEDERSEN, GUNDERSEN, 1997).

Para a confirmação da suspeita clínica de toxoplasmose aguda adquirida ou congênita, são utilizadas as seguintes técnicas laboratoriais:

Isolamento do *T. gondii* a partir de tecidos ou fluidos do corpo

O parasita pode ser isolado inoculando-se o material a ser estudado (sangue, líquido cefalorraquidiano, tecidos) na cavidade peritoneal de camundongos (ABBAS, 1967; DESMONTS & COUVREUR, 1974b) ou em cultura de células (CHANG *et al.*, 1972;

DEROUIN, MAZERON, GARIN, 1987; MACÊDO, 1994). Quando os parasitas são virulentos para o camundongo, as formas taquizoítas podem ser demonstradas no exsudato peritoneal do animal num período de três a sete dias após a inoculação. Nos casos em que o parasita apresenta baixa virulência, o isolamento pode demorar de quatro a seis semanas (ABBAS, 1967; DESMONTS & COUVREUR, 1974b; WALLS, 1988; REMINGTON & DESMONTS, 1990).

Os métodos de isolamento do *T. gondii* são úteis para o diagnóstico da toxoplasmose, sobretudo quando os testes sorológicos são inconclusivos, mas são praticados rotineiramente apenas em laboratórios especializados. Convém ressaltar que o isolamento do parasita, a partir de tecidos, pode demonstrar apenas a presença de cistos, o que não torna definitivo o diagnóstico da toxoplasmose aguda.

Diagnóstico imunohistoquímico

A demonstração de formas taquizoítas de *T. gondii* em cortes de tecido (biópsia), em esfregaço (aspirado de medula, lavagem brônquica) ou fluidos do corpo (sangue, líquido cefalorraquidiano, líquido amniótico) do hospedeiro pode confirmar o diagnóstico de infecção aguda (MACÊDO, 1994). Pelo fato do encistamento poder ocorrer precocemente na infecção, a detecção de cistos nas análises imunohistoquímicas não afasta a possibilidade da doença estar, ainda, na fase aguda (REMINGTON & DESMONTS, 1990). As técnicas de imunofluorescência e, particularmente, a técnica da peroxidase-anti-peroxidase (PAP) podem ser utilizadas em cortes de tecidos com a finalidade de detectar pequenas quantidades de taquizoítas (FRENKEL, 1991), difíceis de serem observadas em colorações usuais.

Deteção de antígenos específicos

As técnicas que detectam antígenos de *T. gondii* em tecidos, soro e outros fluidos corporais são importantes na determinação de infecção aguda; a demonstração de antígenos é altamente indicativa de doença em atividade (WALLS, 1988). A detecção de antígenos tem especial importância em pacientes com deficiência do sistema imune, que não conseguem formar uma resposta de anticorpos adequada (FRENKEL, 1991). Na maioria das técnicas imunoenzimáticas (ELISA), para a detecção de antígenos circulantes, os antígenos são capturados por anticorpos da classe IgG ou por fragmentos F(ab')₂ dos anticorpos IgG, geralmente utilizados no revestimento de placas de poliestireno.

Van Knapen & Panggabean (1977) realizaram o primeiro estudo no qual foram detectados antígenos de *T. gondii* em amostras de soros de pacientes com toxoplasmose. Ao analisar 1162 amostras de soros de pacientes com suspeita de toxoplasmose aguda, por uma técnica de ELISA, foram detectados antígenos de *T. gondii* em 5.7% dos casos. Num estudo posterior, Araujo & Remington (1980) detectaram, por ELISA, antígenos de *T. gondii* em 15 (65%) de 23 amostras de soros de 22 pacientes com toxoplasmose aguda. Não foram detectados antígenos em soros de indivíduos com toxoplasmose crônica e de pessoas saudáveis.

Pesquisa de anticorpos no soro

A demonstração de anticorpos no soro tem sido bastante utilizada para a confirmação da suspeita clínica de toxoplasmose, tanto da toxoplasmose aguda adquirida, quanto da toxoplasmose congênita. O diagnóstico baseia-se principalmente em testes sorológicos que detectam a presença de anticorpos IgM específicos ou um aumento significativo nos níveis de anticorpos IgG.

Entre as reações sorológicas utilizadas para o imunodiagnóstico da toxoplasmose destacam-se:

Reação de Sabin-Feldman (RSF)

A RSF foi descrita por Sabin & Feldman, em 1948, e consiste em incubar taquizoítas vivos com soro do paciente diluído, complemento e azul de metileno. Não havendo anticorpos específicos no soro, os taquizoítas incorporam o corante, tornando-se azuis. Na presença de anticorpos no soro do paciente, os parasitas não incorporam o corante, em virtude da desestruturação de sua membrana celular pela ação do anticorpo e do complemento (SABIN & FELDMAN, 1948). A reação não possibilita a distinção entre anticorpos IgM e IgG. Os títulos da RSF sobem rapidamente, atingindo valores máximos no decorrer dos dois primeiros meses de infecção e diminuem vagarosamente, o que torna difícil determinar a época em que ocorreu a infecção (WELCH *et al.*, 1980; BROOKS *et al.*, 1987). Embora seja considerada uma reação sorológica de referência para o imunodiagnóstico da toxoplasmose, a RSF é realizada apenas em laboratórios especializados, em virtude da utilização de parasitas vivos.

Reação de fixação de complemento (RFC)

Na RFC, uma quantidade fixa de antígeno é adicionada ao soro diluído do paciente. Quando anticorpos específicos estão presentes no soro, formam-se complexos antígeno-anticorpo (Ac-Ag). Uma fonte de sistema complemento, em geral soro de cobaia, é, então, adicionada à mistura. Na presença de complexos Ac-Ag, o complemento será fixado e consumido. Na etapa final, um sistema indicador (hemácias de carneiro sensibilizadas com anticorpo) é adicionado ao sistema. Havendo qualquer complemento residual, observa-se a lise das hemácias, mas se o complemento tiver sido consumido pelos imunocomplexos, as células permanecerão intactas.

A RFC para a toxoplasmose foi descrita por Warren & Sabin, em 1942, e foi amplamente utilizada até o advento da RSF, quando se demonstrou que esta era mais sensível e específica que a primeira. A falta de padronização dos antígenos e a relativa baixa sensibilidade contribuíram para que a RFC deixasse de ser utilizada para o imunodiagnóstico da toxoplasmose (WALLS, 1988; FRENKEL, 1991).

Reação de imunofluorescência indireta (IFI)

O teste de IFI utiliza parasitas fixados em lâminas de microscopia. Diluições do soro são colocadas sobre espaços delimitados em lâminas de vidro contendo os parasitas e, após um período de incubação e lavagens adequados, utiliza-se um conjugado (anticorpos anti-IgG ou anti-IgM humana marcados com fluoresceína) para visualizar as reações. Um resultado positivo é indicado por uma cor amarelo-esverdeada das membranas dos parasitas, quando as lâminas são examinadas em microscópio de fluorescência.

Em um estudo qualitativo e quantitativo, Walton, Benchoff e Brooks (1966) compararam os resultados obtidos com as reações de IFI e RSF. Encontrou-se uma concordância de 97.5% nos resultados qualitativos e 96.4% nos resultados quantitativos. A excelente concordância com a RSF, o fato de não necessitar de organismos vivos e de permitir a detecção e quantificação dos anticorpos específicos das classes IgM e IgG isoladamente tornaram a reação de IFI mais vantajosa, em relação à RSF (WALLS, 1988; MACÊDO, 1994).

Com a técnica de IFI, o diagnóstico da toxoplasmose aguda pode ser feito pela detecção de IgM específica ou pelo aumento significativo nos títulos de anticorpos IgG específicos. Os anticorpos IgM aparecem mais precocemente que os da classe IgG, com níveis aumentando consideravelmente durante as primeiras semanas após a infecção (CAMARGO & LESER, 1976; WELCH *et al.*, 1980; MACÊDO, 1994). Camargo & Leser (1976) mostraram que anticorpos IgM anti- *T. gondii* foram detectados por um período que variou de 1 a 18 meses após o início das manifestações clínicas, sendo que em 50% dos casos a negatificação ocorreu nos seis primeiros meses após a infecção. Em dois casos, as reações permaneceram positivas 23 meses após o início dos sintomas clínicos. Com relação aos anticorpos IgG, na maioria dos pacientes, os títulos máximos foram alcançados nos dois primeiros meses após a infecção, para, em seguida, decaírem lentamente. Em um estudo de Welch *et al.* (1980), ao final do quinto mês após infecção, todos os pacientes com toxoplasmose aguda estudados apresentavam títulos de IgM por IFI < 160, sugerindo que títulos de IgM $\geq$ 160 seriam bons indicadores da fase aguda da infecção por *T. gondii*. Entretanto, é importante ressaltar que a interpretação de títulos de IgM $\geq$ 160 como indicadores de infecção aguda diminui significativamente a sensibilidade diagnóstica da técnica de IFI.

Os testes de IFI podem apresentar resultados falso negativos com relação à pesquisa de IgM, pelo excesso de anticorpos IgG (FRENKEL, 1991; NAOT & REMINGTON, 1980). Resultados falso positivos podem ocorrer na presença de fator reumatóide (CAMARGO, LESER, ROCCA, 1972; HYDE, BARNET, REMINGTON, 1975; CAMARGO *et al.*, 1978) e anticorpos anti-nucleares (ARAÚJO *et al.*, 1971). Os resultados falso positivos causados pela presença de fator reumatóide e os resultados falso negativos causados pelo excesso de IgG podem ser eliminados, mediante a utilização de anticorpos anti-IgG precipitantes ou pela absorção prévia dos soros com proteína A de *Staphylococcus aureus* ou com proteína G de *Streptococcus* do grupo C (CAMARGO *et al.*, 1972; HYDE *et al.*, 1975; LEINIKKI *et al.*, 1978; TAKAHASHI & ROSSI, 1994).

Reação de hemaglutinação indireta (HI)

Na HI, hemácias revestidas com antígenos de *T. gondii* são aglutinadas quando no soro do paciente há presença de anticorpos específicos para os antígenos utilizados no revestimento. A primeira descrição da utilização desta técnica para toxoplasmose foi feita por Jacobs & Lunde, em 1957.

Dependendo da preparação antigênica utilizada para o revestimento das hemácias, a cinética da detecção dos anticorpos anti-*T. gondii* pode variar. Quando o revestimento é feito com antígenos citoplasmáticos, os anticorpos detectados pela reação aparecem mais tardiamente do que os detectados por IFI, sendo que os títulos sobem lentamente no decorrer da infecção, após permanecerem em níveis baixos por algumas semanas (CAMARGO & LESER, 1976). No caso do revestimento ser feito com antígenos citoplasmáticos e de membrana, os anticorpos aparecem ao mesmo tempo do que os detectados por IFI e seus títulos sobem rapidamente, atingindo níveis máximos até 3 meses após o início dos sintomas clínicos (SENET, ROBERT, MAURAS, 1976; AMBROISE-THOMAS, SIMON, BAYARD, 1978). Em situações nas quais os títulos de RSF e IFI para IgG já estejam altos e estáveis, a elevação significativa dos títulos de HI pode ser bastante útil para o diagnóstico de infecção aguda. A HI é um teste simples, barato e relativamente rápido. Entretanto, em virtude da dificuldade de padronização da reação e da variação de resultados observados, a HI tornou-se pouco recomendada para o diagnóstico de toxoplasmose aguda adquirida e congênita (REMINGTON & McLEOD, 1986; MACÊDO, 1994).

Aglutinação direta (AD)

Na AD, descrita por Fulton & Turk em 1959, formas taquizoítas de *T. gondii* tratadas com formalina são aglutinadas por anticorpos específicos presentes nos soros de pacientes. Em 1980, Desmonts & Remington implementaram modificações importantes no teste, referentes ao modo de obtenção dos taquizoítas e ao tratamento prévio das amostras de soros com 2-mercaptoetanol (2-ME), para eliminar anticorpos naturais da classe IgM que ocasionavam reações falso positivas. Cumpre ressaltar que, devido ao tratamento prévio dos soros com 2-ME, a AD para toxoplasmose não é capaz de detectar anticorpos IgM anti-

T.gondii. Os níveis de anticorpos detectados pela AD elevam-se lentamente no início da infecção, continuando a subir no período em que os títulos de RSF já estabilizaram. Os títulos da reação de AD, comparados ao da RSF, são menores durante as primeiras semanas de infecção, ligeiramente superiores no decorrer da infecção e, muitas vezes, superiores na infecção crônica (DESMONTS & REMINGTON, 1980).

Reações imunoenzimáticas (ELISA)

Na técnica de ELISA direta (ELISAd), cavidades de placas de poliestireno são revestidas com antígeno. A essas cavidades são adicionados os soros de pacientes, previamente diluídos. Após um período de incubação e lavagem, adiciona-se às cavidades um conjugado, composto de anti-imunoglobulina humana marcada com uma enzima. A ação enzimática sobre o substrato produz uma cor que é medida em espectrofotômetro. A técnica de ELISA apresenta uma grande variação, incluindo técnicas manuais, semi-automatizadas e automatizadas. Uma das variações mais importantes é a técnica ELISA de captura (ELISAc). Nesta técnica, as cavidades das placas são revestidas com anti-imunoglobulina humana (anti-IgM, IgG, IgA ou IgE). Quando o soro é adicionado, ocorre reação entre a anti-imunoglobulina utilizada no revestimento da cavidade e a imunoglobulina correspondente que se encontra presente no soro. Após um período de incubação e lavagem, adiciona-se ao sistema uma solução composta de antígeno e anticorpos dirigidos contra o antígeno, marcados com enzima. Após outro período de incubação e lavagem, adiciona-se o substrato da enzima, para que haja produção da cor que permite visualizar a reação.

A técnica de ELISA para o diagnóstico da toxoplasmose foi inicialmente descrita por Voller *et al.*, em 1976, estudo no qual os autores encontraram boa correlação entre os resultados obtidos com as técnicas de ELISAd, RSF e HI. Camargo *et al.* (1978) avaliaram a eficácia de técnicas de ELISAd para anticorpos IgM e IgG anti-*T. gondii*, em pacientes com toxoplasmose aguda confirmada pela detecção de IgM por IFI. Observou-se uma concordância entre os resultados obtidos com as técnicas ELISA e IFI com relação à detecção de anticorpos IgG, mas, com relação à pesquisa de IgM, os títulos obtidos por ELISA foram mais de 5 vezes superiores aos títulos obtidos por IFI. Ainda com relação à detecção de anticorpos IgM, os autores também observaram, por ELISA e IFI, reações falso positivas. A maioria dos problemas associados com a detecção de IgM por IFI foi resolvida

com a técnica de ELISAc, inicialmente descrita por Duermeier, Wielaard e Van der Veen, em 1979, para a hepatite A. Para a pesquisa de anticorpos IgM anti-*T.gondii*, a primeira técnica de ELISAc utilizada foi descrita por Naot & Remington, em 1980. Em 29 amostras de soros de pacientes com toxoplasmose aguda, os anticorpos IgM foram detectados por ELISAc e IFI, respectivamente, em 28 (96.5%) e 17 (58.5%) dos soros. Nas amostras de soros positivas por ambas as técnicas, os títulos obtidos por ELISAc foram pelo menos 6 vezes superiores aos títulos obtidos pela IFI. Em 38 amostras de soros de pacientes com toxoplasmose crônica e em 9 pessoas saudáveis, a técnica de ELISAc apresentou resultados negativos, bem como em amostras de soros contendo fatores reumatóides e fatores antinucleares que foram obtidas de pacientes sem evidência clínica de toxoplasmose aguda, mas apresentando IFI positiva para IgM. Tais resultados demonstraram que a técnica de ELISAc apresentava sensibilidade e especificidade superiores a IFI. Estudos realizados posteriormente procuraram introduzir pequenas modificações nas técnicas de ELISA ou mesmo avaliar a eficiência de “kits” comerciais (VERHOFSTEDE, VAN RENTERGHEM, PLUM, 1989; BHOPALE *et al.*, 1997).

Imunocaptura-aglutinação (ISAGA)

No teste de ISAGA, as cavidades da placa de poliestireno são revestidas com anti-imunoglobulina humana (anti-IgM, IgG, IgA e IgE). Quando o soro do paciente é adicionado às cavidades, ocorre a interação entre a anti-imunoglobulina utilizada no revestimento das cavidades da placa com a imunoglobulina correspondente que está presente na amostra do soro. Após um período de incubação e lavagem, é adicionado ao sistema uma suspensão de formas taquizoítas de *T. gondii* tratadas com formalina. Após outro período de incubação, as reações são visualizadas pelo padrão de aglutinação. A técnica de ISAGA para a detecção de anticorpos IgM anti-*T.gondii* foi descrita por Desmonts, Naot e Remington (1981). Neste estudo, 50 amostras de soros de pacientes com toxoplasmose aguda, 25 com anticorpos IgM detectados por IFI e 25 com IFI negativa para IgM, foram analisadas por ELISAc e ISAGA. Nas amostras com IFI positiva, ambos os testes foram positivos para todos os pacientes. Com relação às amostras com IFI negativa, as técnicas de ELISAc e ISAGA detectaram anticorpos IgM, respectivamente, em 25 (100%) e em 16 (64%) pacientes.

Avaliação de marcadores sorológicos para o imunodiagnóstico da toxoplasmose aguda

A elevada ocorrência de altos títulos de anticorpos IgG anti-*T.gondii* em pessoas saudáveis e a persistência dos anticorpos IgM, em alguns casos, por meses ou até anos, após a infecção com o parasita têm dificultado a interpretação dos resultados sorológicos para o diagnóstico da toxoplasmose aguda. Em virtude destes fatos, nos últimos anos, diversos estudos têm avaliado a importância de outros possíveis marcadores sorológicos para o diagnóstico da toxoplasmose adquirida ou congênita, tais como a detecção de anticorpos específicos IgA e IgE, o teste de aglutinação diferencial (AC/HS) e a determinação da avidez de anticorpos IgG.

Pesquisa de anticorpos IgA anti-*T.gondii*

Nos últimos anos, diversos estudos demonstraram que os anticorpos IgA anti-*T.gondii* são encontrados com alta frequência em pacientes com toxoplasmose aguda adquirida ou congênita (DECOSTER *et al.*, 1988; STEPICK-BIEK *et al.*, 1990; BESSIÈRES *et al.*, 1992; TAKAHASHI & ROSSI, 1994). Entretanto, existem controvérsias a respeito da persistência desses anticorpos após a infecção com *T. gondii*. No estudo realizado por Turunen, Vuorio e Leinikki (1983), observou-se que os níveis dos anticorpos IgA, em pacientes com toxoplasmose aguda, aumentam mais lentamente do que os níveis dos anticorpos IgG, e que seu declínio é mais lento do que o dos anticorpos IgM. Diferentemente, no estudo de Le Fichoux, Marty e Chan (1987), observou-se, em pacientes com infecção aguda, que os anticorpos IgA desapareceram antes dos anticorpos IgM. Pujol, Morel e Malbruny (1989) observaram que os anticorpos IgA atingiram níveis máximos até 3 meses após a infecção e desapareceram antes de seis meses. Bertozzi, Suzuki e Rossi (1999) estudaram um paciente com anticorpos IgM anti-*T.gondii* que persistiram por até sete anos após a infecção e detectaram níveis significativos de IgA em amostras coletadas até dois anos após o início das manifestações clínicas. Apesar da discrepância de resultados observados na literatura especializada, tais estudos indicaram que a detecção de anticorpos IgA específicos para *T. gondii* poderia ser um importante marcador para toxoplasmose aguda. Estudos recentes têm procurado avaliar a eficácia dos testes sorológicos que detectam anticorpos IgA anti-*T.gondii* (PATEL *et al.*, 1993; TAKAHASHI & ROSSI, 1994; DECOSTER *et al.*, 1995; GORGIEVSKI-HRISOHO, GERMANN, MATTER, 1996). Patel

et al. (1993) avaliaram os testes de ELISA e ISAGA para a detecção de anticorpos IgA e mostraram que o teste de ISAGA é mais sensível que os métodos convencionais para o diagnóstico da toxoplasmose congênita. Em um estudo de Takahashi & Rossi (1994), delineado para avaliar as reações de ELISAd, ELISAc e ISAGA para a pesquisa de IgA anti-*T. gondii*, demonstrou-se que as três reações têm eficácia similar no diagnóstico da toxoplasmose aguda adquirida.

Pesquisa de anticorpos IgE específicos anti-*T.gondii*

Existem, ainda, poucos estudos que relatam a importância da detecção de anticorpos IgE específicos em pacientes com toxoplasmose. Em 1990, Pinon *et al.* pesquisaram anticorpos específicos das classes IgM, IgA e IgE em amostras de soros de 29 mulheres que adquiriram toxoplasmose aguda durante a gravidez, utilizando a técnica de ISAGA. Anticorpos IgE específicos foram detectados em amostras de soros de 25 (86%) das 29 gestantes. Anticorpos IgE apareceram precocemente durante a infecção, ao mesmo tempo em que anticorpos IgM estavam presentes, e precederam ligeiramente a presença de IgA. Em amostras seriadas de soros das pacientes, os anticorpos IgE nunca persistiram por mais tempo do que os anticorpos IgM. Além disto, o teste IgE-ISAGA foi negativo em todas as amostras de soros coletadas a partir de quatro meses após a infecção. Estes resultados sugeriram que a detecção de anticorpos IgE poderia contribuir para o diagnóstico da infecção toxoplásmica recente, uma vez que, aparentemente, a IgE específica seria detectável por um período mais curto do que a IgM. Num estudo posterior, Wong *et al.* (1993), utilizando as técnicas de ELISA e ISAGA, pesquisaram anticorpos IgE anti-*T.gondii* em 42 amostras sequenciais de soros de oito mulheres que apresentaram soroconversão durante a gestação, em 17 amostras de soros de pacientes com linfadenopatia toxoplásmica e em 48 amostras de soros de pacientes com infecção crônica. As técnicas de ELISA e ISAGA detectaram anticorpos IgE nas amostras de soros de 8 (100%) e 5 (63%) gestantes, respectivamente. Com relação aos pacientes com linfadenopatia toxoplásmica, as técnicas de ELISA e ISAGA detectaram anticorpos IgE em 16 (96%) e 15 (88%) dos casos. Por outro lado, anticorpos IgE não foram detectados em nenhuma amostra de soro de pacientes com toxoplasmose crônica. Embora a persistência dos anticorpos IgE tenha variado consideravelmente, notou-se uma tendência a um declínio mais rápido da IgE com o teste ISAGA.

Teste de aglutinação diferencial (AC/HS)

Em 1986, Thulliez *et al.* desenvolveram uma reação de aglutinação com formas taquizoítas de *T. gondii*, na tentativa de diferenciar infecção toxoplásmica aguda e crônica, utilizando uma única amostra de soro. A técnica, chamada de aglutinação diferencial (AC/HS), consiste em utilizar uma suspensão de formas taquizoítas tratadas com formalina (antígeno HS), como no teste de aglutinação direta, e outra tratada com acetona (antígeno AC). Soros de pacientes com infecção aguda apresentaram altos títulos de anticorpos com a preparação antigênica AC, enquanto os soros de pacientes com infecção crônica apresentaram altos títulos de anticorpos com a preparação antigênica HS, mas baixos títulos (ou mesmo resultados negativos) com a preparação AC. Após a descrição do teste de aglutinação diferencial, vários estudos têm procurado avaliar a utilidade do teste AC/HS como marcador sorológico da fase aguda da toxoplasmose (SUZUKI *et al.*, 1988; DANNEMANN *et al.*, 1990; LIESENFELD *et al.*, 1997).

Técnicas de detecção de avides de anticorpos da classe IgG

A partir da observação de que a avides dos anticorpos aumenta gradualmente após a exposição a um imunógeno (EISEN & SISKIND, 1964; WERBLIN *et al.*, 1973), vários estudos têm demonstrado que a baixa avides dos anticorpos IgG pode ser utilizada como marcador para o diagnóstico de infecções primárias recentes, como rubéola (HEDMAN & SEPPALA, 1988; THOMAS & MORGAN-CAPNER, 1988), hepatite B (THOMAS, 1997), hepatite C (WREGHITT *et al.*, 1990; WARD *et al.*, 1994), mononucleose infecciosa (GRAY, 1995), varicela-zoster (KANGRO, MANZOOR, HARPER, 1991), herpes (WARD *et al.*, 1993; HASHIDO, INOUE, KAWANA, 1997), doença de inclusão citomegálica (BLACKBURN *et al.*, 1991) e toxoplasmose (JOYNSON, PAYNE, RAWAL, 1990; CAMARGO *et al.*, 1991; LAPPALAINEN *et al.*, 1993; HOLLIMAN *et al.*, 1994; JENUM *et al.*, 1997; MELO & ROSSI, 1997; COZON *et al.*, 1998; ROSSI, 1998). Quando ensaios imunoenzimáticos são utilizados, o teste é feito usualmente em placas de poliestireno. Um agente que rompe ligações de hidrogênio é comumente utilizado para eluir os anticorpos de baixa afinidade dos antígenos utilizados no revestimento da placa. Entre estes agentes, a uréia tem sido amplamente utilizada em concentrações que variam de 6 a 8 M (HEDMAN & SEPPALA, 1988; HEDMAN *et al.*,

1989; HEDMAN & ROUSSEAU, 1989; BLACKBURN *et al.*, 1991; CAMARGO *et al.*, 1991; KANGRO *et al.*, 1991; WARD *et al.*, 1993; HOLLIMAN *et al.*, 1994; WARD *et al.*, 1994; GRAY, 1995; HASHIDO *et al.*, 1997; JENUM *et al.*, 1997). O sistema Falcon assay screening test (F.A.S.T.[®] - ELISA), utilizado inicialmente para a identificação de anticorpos monoclonais (SCHEINBERG *et al.*, 1983), foi adaptado por outros pesquisadores em ensaios imunoenzimáticos de rápida execução para detecção de anticorpos específicos para diversas doenças (HANCOCK & TSANG, 1986; HYLLIER & SOLER DES GALANES, 1991; ASHFORD *et al.*, 1993; PARTEL & ROSSI, 1998). Este sistema é constituído por placas apropriadas para todos os passos da reação, incluindo uma tampa de plástico onde estão fixadas 96 esferas de poliestireno que se encaixam nas cavidades de placas de microtitulação. Na realização do teste, a tampa com esferas revestidas com a preparação antigênica é transferida, sucessivamente, após lavagens apropriadas, para as placas contendo as amostras de soros a serem testadas, o conjugado e o sistema substrato. Utilizando o sistema FAST-ELISA, com uma única diluição das amostras de soros, Rossi (1998) mostrou que os índices de avidéz dos anticorpos IgG anti-*T.gondii* variaram de 10% a 40% (média = 25%) em pacientes com toxoplasmose aguda e de 58% a 94% (média = 73%) em pacientes com toxoplasmose crônica. Jenum *et al.* (1997), utilizando um “kit” de ELISA comercial (Platelia[®] Toxo-IgG), desenvolveram um teste de determinação da avidéz dos anticorpos IgG baseado na titulação das amostras de soros. Os autores observaram que os índices de avidéz variaram de 0.1% a 26.5% (média = 4.9%) em amostras de soros de gestantes coletadas até 20 semanas após o início da infecção e de 30.6% a 75.4% (média = 51.3%) em amostras de soros de pacientes com infecção crônica. Até o presente momento, não existem estudos comparativos entre o método de diluição única e o de titulação das amostras de soros para a determinação da avidéz dos anticorpos IgG na toxoplasmose.

Ainda existem diversas dúvidas com relação à eficiência dos marcadores normalmente utilizados para o diagnóstico sorológico da toxoplasmose. Desta forma, consideramos de grande importância a avaliação da utilidade desses marcadores para o imunodiagnóstico da toxoplasmose aguda adquirida, objetivo do presente estudo.

2. ARTIGO I

Serological diagnosis of toxoplasmosis: usefulness of IgA detection and IgG avidity determination in a patient with a persistent IgM antibody response to *Toxoplasma gondii*

Luciana C. BERTOZZI, Lisandra A. SUZUKI & Cláudio L. ROSSI

SUMMARY

We report the detection of specific IgA antibodies and the determination of IgG avidity in sequential serum samples from a patient exhibiting significant levels of *Toxoplasma*-specific IgM antibodies for seven years after the onset of the clinical symptoms of toxoplasmosis. IgM antibodies were detected by an indirect immunofluorescence test and by three commercial enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). Anti-*T. gondii* IgA was quantified by the α -capture ELISA technique using a commercial kit. As defined by the manufacturer of the IgA ELISA test used, most patients with acute toxoplasmosis have antibody levels > 40 arbitrary units per ml (AU/ml). At this cut-off level, the patient still had a positive ELISA result (45 AU/ml) in a serum sample taken one year after the beginning of clinical manifestations. The IgG avidity-ELISA test was performed with the Falcon assay screening test (F.A.S.T.[®])-ELISA system. Avidity indices compatible with a recent *Toxoplasma* infection were found only in serum samples taken during the first 5 months after the onset of the clinical symptoms of toxoplasmosis. These results show that the interpretation of positive IgM results as indicative of recently acquired toxoplasmosis requires additional laboratory confirmation either by other tests or by the demonstration of a significant rise in the antibody titers in sequential serum samples.

KEYWORDS: Toxoplasmosis, immunodiagnosis, IgM, IgA, IgG avidity.

Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, C. P. 6111, 13083-970 Campinas, S.P, Brasil.

Correspondence to: Cláudio Lúcio Rossi, Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6111, 13083-970 Campinas, São Paulo, Brasil

INTRODUCTION

Toxoplasmosis, an infection caused by the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*, is generally asymptomatic or is associated with mild, non-specific clinical manifestations in immunocompetent subjects^{7,8}. Serological diagnosis of acute toxoplasmosis is based on the demonstration of a significant increase in specific IgG antibody levels and/or the presence of specific IgM antibodies. However, the prevalence of high *Toxoplasma* IgG antibody titers among normal individuals in most populations¹⁰ and the sustained persistence of specific IgM antibodies in some persons^{1,3} have complicated the interpretation of serological tests when acute toxoplasmosis is suspected. Previous reports have shown that *Toxoplasma*-specific IgA antibodies are frequently detected in the early phase of toxoplasmosis^{2,9,12}. However, the persistence of such antibodies following acute infection is still surrounded by considerable controversy. The determination of IgG antibody avidity represents an important additional serological marker because low- and high-avidity antibodies are found predominantly in recent and long-term infections, respectively. In recent years, a variety of immunoenzymatic assays for specific IgG have been adapted to estimate antibody avidity in several diseases, including toxoplasmosis^{4-6,11}. In this article, we report the results obtained with the detection of specific IgA antibodies and the determination of IgG avidity in sequential serum samples from a patient with persistently elevated levels of specific IgM antibodies.

MATERIALS AND METHODS

Patient and serum samples

A 29-year-old man was admitted to the university hospital at the State University of Campinas (São Paulo State, Brazil) in September 1991, with a three-week history of malaise, mild fever, asthenia and myalgia. A general physical examination disclosed palpable and nontender axillary, right posterior cervical, and inguinal lymph nodes. Hematological tests showed a red blood cell count of $5.1 \times 10^6/\text{mm}^3$, a hemoglobin level of 16.4 g/dl, a hematocrit of 49.3%, and a white blood cell count of $8.500/\text{mm}^3$ (4% band cells, 35% segmented cells, 2% eosinophils, 4% monocytes and 55% lymphocytes). The platelet count was $140.000/\text{mm}^3$ and the blood sedimentation rate was 27 mm in the first hour. The only meaningful findings from serological studies were positive tests for toxoplasmosis: IgM-IIF 4,098; IgM-ELISA = reactive. Treatment with pyrimethamine and sulfadiazine was initiated one week after the serological diagnosis of toxoplasmosis, and four weeks later, the clinical symptoms had disappeared. A total of 13 serum samples obtained from this patient from 1 month to 7 years after the onset of the clinical symptoms of toxoplasmosis were assayed for *Toxoplasma*-specific antibodies and for immunoglobulin G antibody avidity.

Tests for *Toxoplasma* antibodies

The IgM-IIF and IgG-IIF tests were performed as described previously¹³. For the IgM-IIF test, all serum samples were pretreated with rheumatoid factor-absorbent (Behring, Marburg, Germany). IgM-IIF antibody titers ≥ 32 were considered positive³. Anti-*T. gondii* IgM was also detected by three commercial ELISA techniques. The primary test used was ETI-TOXOK-M reverse (Sorin Biomédica, Saluggia, Italy). Serum samples taken from 3 months to 7 years after onset of the clinical symptoms of infection were also tested using two automated enzyme immunoassays: TOXO-M-EIA (Abbott Laboratories, Chicago, USA) and VIDAS Toxo IgM (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France). Anti-*T. gondii* IgA was measured by the α -capture ELISA technique using a commercial kit (ETI-TOXOX-A) from Sorin Biomédica. According to the manufacturer of the above IgA ELISA, most patients with acute toxoplasmosis have antibody levels > 40 arbitrary units per ml (AU/ml). Levels

ranging from 10 to 40 AU/ml cannot be regarded as negative and their importance must be interpreted in association with specific IgM and IgG determinations; levels < 10 AU/ml are regarded as negative. The ELISA techniques for IgM and IgA detection were performed according to the manufacturers' instructions.

Avidity test

The IgG avidity-ELISA test was performed with the Falcon assay screening test (F.A.S.T.®)-ELISA system using 6 M urea in phosphate-buffered saline (PBS) to dissociate the low-avidity antibodies after the antigen-antibody interaction as described elsewhere¹¹. The F.A.S.T.-ELISA system uses polystyrene beads on sticks molded to the lid of a microtitration plate. For the assay, the beads were coated with a soluble antigen from sonicated *T. gondii*. A single dilution (1:21) of the serum samples being tested, the PBS-urea solution (or PBS as control), the conjugate (goat anti-human IgG - peroxidase) and the substrate system (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine/hydrogen peroxide) were placed in standard microtiter plates. The sensitized beads were exposed to the reagents by immersion, after appropriate washing. All serum samples were run twice in triplicate. The avidity index was calculated as the mean absorbance of reactions in which the beads were exposed to urea divided by the mean absorbance of reactions in which the beads were not exposed to urea, and expressed as a percentage. Avidity indices $\leq 40\%$ and $\geq 58\%$ were considered as indicative of recent and long-term infections, respectively.

RESULTS

As shown in Table 1, the patient had a positive IgM-IIF result for toxoplasmosis (≥ 32) in serum samples taken up to 4 years after the onset of clinical manifestations. A longer persistence of IgM was observed with ELISA techniques. All three *Toxoplasma* IgM-ELISA kits (Sorin, bio Mérieux and Abbott) detected significant levels of specific antibodies up to the last serum sample obtained 7 years after the onset of the clinical symptoms of infection. A shorter persistence of IgA was observed when values > 40 AU/ml represented significant antibody levels. However, a significant IgA level (45 AU/ml) was found in a serum sample taken 1 year after the beginning of clinical manifestations. Avidity indices compatible with a recent infection were found in serum samples taken during the first 5 months after the onset of clinical symptoms, whereas indices compatible with the presence of a long-term infection were found in serum samples taken 1 or more years after the onset of clinical symptoms.

DISCUSSION

Most infections caused by *T. gondii* are asymptomatic and only a minority of patients with clinical evidence of infection exhibit signs and symptoms that cannot be attributed to the presence of the parasite⁷. Often, the diagnosis of a recently acquired *Toxoplasma* infection is based on the detection of specific IgM antibodies in a single serum sample. The use of tests with a low specificity and the presence of *Toxoplasma* – specific IgM in the chronic stage of infection have lead to unnecessary concern, particularly with regard to pregnant women. Several reports have emphasised the value of detecting *Toxoplasma*-specific IgA antibodies for the diagnosis of acute human toxoplasmosis^{2,9,12}. The analysis of sequential serum samples from the above patient showed that when a cut-off of 10 AU/ml is used, IgA antibodies may be detected by ELISA long after the onset of clinical symptoms (2 years). In a previous study¹², we screened serum samples from 51 patients with acute acquired toxoplasmosis for specific IgA antibodies. Fifty of the 51 (99%) serum samples tested had antibody levels > 40 AU/ml (54 to > 160 AU/ml). According to the manufacturer of the IgA-ELISA test used, most patients with acute toxoplasmosis have antibody levels > 40 AU/ml. At this cut-off level, a shorter persistence of IgA was observed. However, the patient still had a positive ELISA result (45 AU/ml) in a serum sample taken one year after the beginning of clinical manifestations. In the present case, the usefulness of avidity determination in the serodiagnosis of a toxoplasmic infection was clearly demonstrated by the avidity index results obtained in the sequential serum samples from a patient exhibiting a persistent IgM antibody response. Avidity indices compatible with a recent *Toxoplasma* infection were found only in serum samples obtained during the first 5 months after the clinical symptoms of toxoplasmosis. These findings indicate that the serological diagnosis of acute toxoplasmosis may not be such an easy task. The interpretation of positive IgM results as indicative of recently acquired toxoplasmosis requires additional laboratory confirmation either by other tests or by the demonstration of a significant rise in the antibody titers in sequential serum samples.

RESUMO

Diagnóstico sorológico da toxoplasmose: utilidade da detecção de anticorpos IgA e da determinação da avidéz dos anticorpos IgG em um paciente com uma resposta persistente de anticorpos IgM anti-*Toxoplasma gondii*.

No presente trabalho, são descritos os resultados da detecção de anticorpos específicos da classe IgA e da determinação da avidéz dos anticorpos IgG em amostras sequenciais de soro de um paciente apresentando níveis significativos de anticorpos IgM anti-*Toxoplasma gondii* durante sete anos após o início das manifestações clínicas da infecção. Os anticorpos IgM foram detectados pelo teste de imunofluorescência indireta (IFI) e por três técnicas imunoenzimáticas (ELISA) comerciais. Os anticorpos IgA foram quantificados por uma técnica de ELISA de captura, utilizando um “kit” comercial. De acordo com as instruções do fabricante do “kit” utilizado para a pesquisa de IgA, a maioria dos pacientes com toxoplasmose aguda apresenta níveis de anticorpos > 40 unidades arbitrárias por ml (UA/ml). Utilizando este parâmetro, o paciente, ainda, apresentou um resultado de ELISA positivo (45 UA/ml) em uma amostra de soro coletada um ano após o início das manifestações clínicas. A avidéz dos anticorpos IgG foi determinada com uma técnica de ELISA, utilizando o sistema “Falcon assay screening test” (F.A.S.T.[®]-ELISA). Índices de avidéz compatíveis com uma infecção recente foram encontrados nas amostras de soros obtidas durante os primeiros 5 meses após o início dos sintomas clínicos da toxoplasmose. Os nossos dados mostram que a interpretação de resultados IgM positivos, como indicativos de toxoplasmose aguda, requer confirmação laboratorial com outros testes ou demonstração de um aumento significativo dos títulos de anticorpos em amostras sequenciais de soros.

REFERENCES

1. BROOKS, R.G.; MC CABE, R.E. & REMINGTON, J.S. - Role of serology in the diagnosis of toxoplasmic lymphadenopathy. **Rev. infect. Dis.**, **9**: 1055-1062, 1987.
2. DECOSTER, A.; DARCY, F.; CARON, A. et al. - IgA antibodies against P30 as markers of congenital and acute toxoplasmosis, **Lancet**, **2**: 1104-1107, 1988.
3. DEL BONO, V.; CANESSA, A.; BRUZZI, P. et al. - Significance of specific immunoglobulin M in the chronological diagnosis of 38 cases of toxoplasmic lymphadenopathy. **J. clin. Microbiol.**, **27**: 2133-2135, 1989.
4. HEDMAN, K.; LAPPALAINEN, M.; SEPPALA, I. et al. - Recent primary *Toxoplasma* infection indicated by a low avidity of specific IgG. **J. infect. Dis.**, **159**: 736-740, 1989.
5. HOLLIMAN, R.E.; RAYMOND, R.; RENTON, N. et al. - The diagnosis of toxoplasmosis using IgG avidity. **Epidem. Infect.**, **112**: 399-408, 1994.
6. JENUM, P.A.; STRY-PEDERSEN, B. & GUNDERSEN, A. - Improved diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in early pregnancy by determination of antitoxoplasma immunoglobulin G avidity. **J. clin. Microbiol.**, **35**: 1972-1977, 1997.
7. KEAN, B.H. - Clinical toxoplasmosis – 50 years. **Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.**, **66**: 549-571, 1972.
8. KRICK, J.A. & REMINGTON, J.S. - Toxoplasmosis in the adult – an overview. **New Engl. J. Med.**, **298**: 550-553, 1978.
9. LE FICHOUX, Y.; MARTY, P. & CHAN, H. - Les IgA sériques spécifiques dans le diagnostic de la toxoplasmose. **Ann. Pédiat.**, **34**: 375-379, 1987.
10. REMINGTON, J.S. & DESMONTS, G. - Toxoplasmosis. In: REMINGTON J.S. & KLEIN J.O., eds. **Infectious diseases of the fetus and the newborn infant**. Philadelphia, WB Saunders Company, 1990. p. 89-195.

11. ROSSI, C.L. - A simple, rapid enzyme-linked immunosorbent assay for evaluating immunoglobulin G antibody avidity in toxoplasmosis. **Diagn. Microbiol. infect. Dis.**, **30**: 25-30, 1998.
12. TAKAHASHI, E.E.H. & ROSSI, C.L. - Use of three immunological techniques for the detection of *Toxoplasma* sp IgA antibodies in acute toxoplasmosis. **J. clin. Path.**, **47**: 1101-1104, 1994.
13. WELCH, P.C.; MASUR, H.; JONES, T.C. et al. - Serologic diagnosis of acute lymphadenopathic toxoplasmosis. **J. infect. Dis.**, **142**: 256-264, 1980.



Table 1: Serological results for sequential serum samples from a patient exhibiting a persistent IgM antibody response to *T. gondii*.

Time*	IgM				IgG	IgA	IgG avidity index (%)
	IIF	ELISA			IIF	ELISA	
		Sorin	Bio Merieux	Abbott			
1 mo	4,096	R	ND	ND	4,096	>160	18
3 mo	2,048	R	R	R	32,768	>160	28
5 mo	1,024	R	R	R	32,768	96	30
8 mo	1,024	R	R	R	16,384	68	51
10 mo	512	R	R	R	16,384	56	56
1 y	256	R	R	R	16,384	45	60
1.5 y	128	R	R	R	16,384	16	65
2 y	64	R	R	R	8,192	12	71
3 y	32	R	R	R	8,192	9	ND
4 y	32	R	R	R	4,096	8	82
5 y	<32	R	R	R	4,096	6	83
6 y	<32	R	R	R	2,048	7	82
7 y	<32	R	R	R	2,048	8	84

* Months (mo) or years (y) from the onset of clinical symptoms to the time of blood sampling. Significant IgM antibody results: indirect immunofluorescence (IIF) ≥ 32 ; ELISA = Reactive (R); Significant IgA-ELISA results: > 40 AU/ml; Avidity indices $\leq 40\%$ are indicative of a recent infection; avidity indices $\geq 58\%$ are indicative of a long-term infection. ND = not determined.

3. ARTIGO II

Evaluation of Serological Markers for the Immunodiagnosis of Acute Acquired Toxoplasmosis

Lisandra A Suzuki*, Rosângela J Rocha**, Cláudio L Rossi*

* Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (Unicamp), Campinas, São Paulo, Brazil.

** Department of Parasitology, Institute of Biology, State University of Campinas (Unicamp), Campinas, São Paulo, Brazil.

Correspondence to Cláudio Lúcio Rossi, Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (Unicamp), P.O. Box 6111, 13083-970 Campinas, São Paulo, Brazil.

ABSTRACT

The detection of specific IgM antibodies has been the most used serological marker for diagnosing recently acquired *Toxoplasma* infection. However, the sustained persistence, in some persons, of specific IgM antibodies and the use of tests with a low specificity have complicated the interpretation of serological results when toxoplasmosis is suspected. The purpose of the present study was to determine the value of newer serological markers, such as the detection of specific IgA and IgE antibodies, the differential agglutination (AC/HS) test using formalin and acetone-fixed tachyzoites of *T. gondii* and the determination of the avidity of *Toxoplasma*-specific IgG, in the diagnosis of acute acquired toxoplasmosis. Sixty-four serum samples, 31 from patients with a recently acquired *Toxoplasma* infection and 33 from patients with chronic toxoplasmosis, were tested. Anti-*T. gondii* IgA was measured by two antibody capture ELISA tests (Platelia® Toxo IgA and ETI-TOXOK A) and an automated direct ELISA (IMx® Toxo IgA). The Platelia, ETI-TOXOK-A and IMx kits detected antibody levels compatible with a recent infection in serum samples from all patients with acute toxoplasmosis. On the other hand, the analysis of serum samples from 33 patients with chronic toxoplasmosis revealed that significant levels of IgA may be detected with a high frequency by the three kits during the chronic phase of infection. IgE antibodies detected by ISAGA were present in 26 (84%) of 31 patients with acute toxoplasmosis and in serum samples from two subjects with chronic infection taken more than one year after the beginning of the clinical symptoms of infection. Twenty-nine (94%) of 31 patients with a recent *Toxoplasma* infection and 15 (45%) of 33 subjects with chronic toxoplasmosis had an AC/HS pattern compatible with acute toxoplasmosis. The avidity of *Toxoplasma* IgG was evaluated by two methods. One method was based on the titration of each serum sample and calculation of the titers, in the absence and presence of urea, in relation to a defined cut-off value. In the other method, a single serum dilution was used and the absorbances of the reactions in the presence and absence of urea were compared. The titration method was more sensitive for diagnosing a recent primary *Toxoplasma* infection: All 31 serum samples from patients with acute toxoplasmosis had avidity indices compatible with acute toxoplasmosis by the titration method whereas with the single dilution method serum samples from four patients had equivocal results. In the 33 patients with chronic toxoplasmosis, similar results were obtained with the two avidity

methods; only one serum sample had an non compatible avidity value with the titration method. The results obtained in the present study show that the current serological markers used for diagnosing acute acquired toxoplasmosis have significant limitations. Our data suggest that determination of the avidity of *Toxoplasma*-specific IgG by the titration method in patients with detectable IgM antibodies could permit a more efficient diagnosis of the stage of infection by *T. gondii*.

INTRODUCTION

Toxoplasmosis, a worldwide infection caused by the obligatory intracellular coccidian *Toxoplasma gondii*, is usually acquired through the ingestion of raw or undercooked meat or by contamination by oocysts present in the feces of cats infected with the parasite. Following multiplication within the intestinal epithelial cells, the parasites disseminate hematogenously and invade and destroy host cells of virtually every organ. *Toxoplasma* infections are generally asymptomatic or are associated with mild, nonspecific clinical symptoms in immunocompetent subjects (Kean 1972; Krick and Remington 1978).

The diagnosis of recently acquired *Toxoplasma* infection has traditionally been done by detecting specific immunoglobulin (Ig) M antibodies or by demonstrating a significant increase in specific IgG antibodies, or both. However, the prevalence of high *Toxoplasma* IgG antibody titers among normal individuals in most populations (Remington and Desmonts 1990) and the sustained persistence, in some persons, of specific IgM antibodies (Bertozzi et al. 1999; Bobic et al. 1991; Brooks et al. 1987; Del Bono et al. 1989; Van Loon et al. 1983), have complicated the interpretation of serological tests when toxoplasmosis is suspected. For this reason, there is an increasing demand for newer, more accurate diagnostic markers to distinguish recent from long-term *Toxoplasma* infections.

Several reports have emphasized the value of detecting *Toxoplasma* specific IgA and IgE antibodies for the diagnosis of the early phase of toxoplasmosis (Bessi eres et al. 1992; Decoster et al. 1988; Le Fichoux et al. 1987; Montoya and Remington, 1995; Pinon et al. 1990; Pujol et al. 1989; Takahashi and Rossi 1994; Wong et al. 1993). However, the persistence of such antibodies following an acute infection is still controversial. The fixation of tachyzoite forms of *T. gondii* with either formalin or acetone makes a remarkable difference in their ability to react with antibodies from patients with acute and chronic infections. The differential agglutination (AC/HS) test compares antibody titers obtained with formalin and acetone fixed tachyzoite forms of *T. gondii*. (Dannemann et al. 1990; Suzuki et al. 1988; Thulliez et al. 1986). High titers in the AC test are associated with a recently acquired infection whereas high titers in the HS test are associated with a chronic infection (Dannemann et al. 1990; Montoya and Remington 1995). Following the observation that antibody avidity gradually increases after exposure to an immunogen (Eisen

and Siskind 1964; Werblin et al. 1973), several reports have shown that the low avidity of IgG antibody can be used as a marker for diagnosing recent primary infections, including toxoplasmosis (Camargo et al. 1991; Hedman et al. 1989; Holliman et al. 1994; Jenum et al. 1997; Rossi 1998).

The purpose of the present study was to assess the usefulness of newer serological markers, such as the IgA ELISA, IgE immunosorbent agglutination assay (ISAGA), avidity of *Toxoplasma*-specific IgG, and differential agglutination (AC/HS) test in the diagnosis of acute acquired toxoplasmosis.

MATERIALS AND METHODS

Serological tests

Anti-*T. gondii* IgA was measured by three commercial ELISA techniques, IMx[®] Toxo IgA (Abbott Laboratories, Chicago, USA), Platelia[®] Toxo IgA (Sanofi Diagnostics, Marnes la Coquette, France) and ETI-TOXOK-A reverse (DiaSorin Biomédica, Sallugia, Italy). The three ELISA techniques were performed according to the manufacturers' instructions. The IMx[®] Toxo IgA, an automated microparticle direct enzyme immunoassay, was performed on an IMx Analyzer. The IMx assay indexes the patient sample rate to an IMx Toxo IgA index calibrator (anti-*T. gondii* IgA antibody) rate, using the formula: index = sample rate/index calibrator rate. IMx Toxo IgA indices ≥ 0.600 and < 0.500 were regarded as positive and negative, respectively; indices from 0.500 to 0.599 were considered as equivocal.

For the assays performed using the Platelia IgA kit, each run included positive (R 4b) and negative control sera, and a cut-off control serum (R 4a), in duplicate. Serum samples with an optical density (O.D.) $\geq$ the mean R4a O.D. were considered positive. Serum samples with an O.D. $<$ mean R4a O.D. $\times 0.80$ were considered negative; serum samples with values between the mean R4a O.D. $\times 0.80$ and the mean R4a O.D. were considered doubtful. The positive results were expressed by calculating the fixation index using the formula: serum fixation index = (sample O.D. – mean R4a O.D./R4b O.D. – mean R4a O.D.) $\times 10$. Fixation indices between 0 and 2 corresponded to a borderline positive serum whereas indices >2 probably indicated a recent infection by *T. gondii*.

In the tests performed using the ETI-TOXOK-A kits, serum standards ranging from 0 to 160 arbitrary units per ml (AU/ml) were included in each assay. All serum samples were tested in duplicate and the resulting mean absorbance then converted into AU/ml using an appropriate standard curve. According to the manufacturer's instructions, most patients with acute toxoplasmosis have specific IgA levels ≥ 40 AU/ml. Levels ranging from 10 to 40 AU/ml cannot be regarded as negative and their importance must be interpreted in association with specific IgM and IgG determinations; levels < 10 AU/ml are regarded as negative.

The IgE-ISAGA was performed as described by Ashburn et al. (1998), with a few modifications. Briefly, each well of a U-shaped polystyrene microtiter plate (Corning, New York, USA) was coated with 100 µl of anti-human IgE mouse monoclonal antibody (Sigma, St. Louis, MO, USA) diluted to 2.4 µg/ml in 0.1 M carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.5. Each serum sample was diluted 1 in 100 in phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.1% bovine serum albumin (BSA) and 100 µl were added to each of three adjacent wells. Positive and negative controls were included in each plate. After incubation for 2 h at 37 °C, the plates were washed with PBS plus 0.1% Tween 20 and then with PBS alone. A suspension of formalin-fixed tachyzoites was diluted in alkaline buffer (pH 8.7) to 1.25×10^7 parasites/ml and 100, 150 and 200 µl were added to the three wells corresponding to the same serum samples described above. After incubation, the results were read visually against a black background with lateral lighting. A complete tachyzoite carpet at the bottom of the well was assigned a value of 4 and a sedimentation pattern forming a discrete button was assigned a value of 0. Intermediate results which represented about 25, 50 and 75% agglutination were scored as 1, 2 and 3, respectively. The sum of the values of the three wells used for each serum sample can produce a minimum and a maximum value of 0 and 12, respectively. IgE ISAGA results ≤ 2 were considered to be negative, 3-4 equivocal and ≥ 5 positive.

The AC/HS test was done and interpreted as described by Dannemann et al. (1990). Briefly, formalin-fixed (HS antigen) and acetone-fixed tachyzoites (AC antigen) were resuspended in alkaline buffer (pH= 8.7) containing 1% BSA at a concentration of 3×10^7 parasites/ml. A 50 µl aliquot of antigen preparation (HS or AC antigen) was added to 50 µl of twofold dilutions of serum samples in microtiter plates. Serum samples were diluted in PBS, pH = 7.2 containing 0.2 M 2-mercaptoethanol. The first serum dilution for the HS antigen (1:2,000) was assigned an antibody titer of 100 international units per ml (IU/ml). The first serum dilution for the AC antigen was 1:100; to which an antibody titer of 50 IU/ml was assigned. The plates were read after an overnight incubation at room temperature.

The avidity of *Toxoplasma* IgG antibodies was measured by two ELISA techniques, one using the Falcon Assay Screening Test System (F.A.S.T.[®] -ELISA) and the other using a commercial ELISA kit for detecting specific IgG antibodies to *T. gondii* (Platelia[®] Toxo IgG, Sanofi Diagnostics Pasteur, France). The IgG avidity-F.A.S.T.-ELISA was performed as described elsewhere (Rossi 1998). Briefly, the F.A.S.T.-ELISA system uses polystyrene beads on sticks molded to the lid of a microtiter plate. For the assay, the beads were coated with a soluble antigen from sonicated *T. gondii*. A single dilution (1:21) of the serum samples being tested, the PBS containing 6 M urea (or PBS as control), the conjugate (goat anti-human IgG labelled with peroxidase) and the substrate system (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine/hydrogen peroxide) were placed in standard microtiter plates. The sensitized beads were exposed to the reagents by immersion, after appropriate washing. All serum samples were run twice in triplicate. The avidity index was calculated as the mean absorbance of reactions in which the beads were exposed to urea divided by the mean absorbance of reactions in which the beads were not exposed to urea, and expressed as a percentage. Avidity indices $\leq 40\%$ and $\geq 58\%$ were considered as indicative of recent and long-term infections, respectively. The IgG avidity test using the Platelia Toxo IgG was performed as described by Jenum et al. (1997). Briefly, each serum sample was analyzed in two fourfold range dilutions using two rows of the ELISA plate; the first serum dilution was 1:50 in one of the rows (row A) and 1:200 in the second row (row B). After incubation for 1 h at 37 °C, row A was washed three times with PBS-Tween containing 6 M urea whereas row B (control row) was washed three times with the washing solution (no urea) that accompanied the kit. During each wash, the microtiter plate was shaken vigorously for 5 min. The subsequent steps of the reaction, including the incubation with conjugate, washing, incubation with substrate and the addition of stopping solution were performed as recommended by the manufacturer. The optical density (O.D.) of each well was read in a microtiter plate reader (Spectra SLT Labinstruments, Salzburg, Austria) at 492 nm, with 620 nm used as the reference wavelength. For each serum sample, two endpoint titers, one for row A (wash with urea after antigen-antibody reaction) and one for row B (wash without urea), were calculated as the inverse value of the dilution giving an O.D. of 0.1 on a semilogarithmic plot (O.D., arithmetic scale; dilution, logarithmic scale) using the formula: $\text{titer} = \text{dilution}_x^{-1} \times 10^3$, where dilution_x is the highest dilution giving an O.D. > 0.1 and a is

equal to $\log_4 \times (O.D._x - 0.1) / (O.D._x - O.D._y)$ where 4 is the dilution factor, $O.D._x$ is the O.D. at dilution_x, 0.1 is the cut-off O.D., and $O.D._y$ is the O.D. at the next higher dilution from dilution_x. The IgG avidity was calculated with the formula: avidity = (titer in row A/titer in row B) x 100. Avidity indices $\leq 26.5\%$ were associated with a recent *Toxoplasma* infection (< 20 wk earlier) whereas indices ≥ 30.6 were associated with a latent infection.

Patients and serum samples

The serological tests were evaluated by testing 31 serum samples from patients with a recent primary *Toxoplasma* infection and 33 serum samples from subjects with preexisting *Toxoplasma* immunity. All patients were attended at the university hospital of the State University of Campinas (Campinas, São Paulo, Brazil). The patients were diagnosed as having acute toxoplasmosis based on serodiagnostic criteria: detectable IgM antibodies by IIF and ELISA tests plus either seroconversion or a ≥ 4 -fold rise in the titer of *Toxoplasma* specific IgG by an IIF test. All 31 patients in the first group had clinical symptoms compatible with acute toxoplasmosis. In all cases, the serum samples were collected in the first 3 months after the onset of clinical symptoms. The 33 subjects with past immunity all had a well-documented history of acute toxoplasmosis for at least 1 year before blood collection. Four of the 33 patients with chronic toxoplasmosis had a sustained persistence of *Toxoplasma*-specific IgM antibodies detected by ELISA.

RESULTS

The serological data obtained from serum samples of patients with acute toxoplasmosis and from subjects with a long term *Toxoplasma* infection are shown in tables 1 and 2, respectively.

All 31 patients with acute toxoplasmosis had specific IgA antibody levels compatible with a recent *Toxoplasma* infection using the IMx, Platelia and ETI-TOXOK kits. According to the manufacturer's instructions for the ETI-TOXOK A kit, most patients with acute toxoplasmosis have specific IgA levels > 40 AU/ml. Only one case (patient A 7) had a *Toxoplasma*-specific IgA antibody level < 40 AU/ml (20.1 AU/ml) with this kit. On the other hand, in the 33 subjects with chronic toxoplasmosis, IgA antibody levels compatible with a recent *Toxoplasma* infection were detected in six cases with the IMx kit (patients C1-C3, C6, C31 and C33) in five cases with the Platelia and ETI-TOXOK kits (patients C1-C3, C6, C31). Four equivocal results were obtained with the IMx kit (patients C4, C10, C14 and C17); two borderline positive results were obtained with the Platelia kit (patients C32 and C33). Five patients (C1-C3, C6, C31) had IgA antibody levels that were not compatible with chronic toxoplasmosis using the three kits; three of them had significant levels of specific IgM antibodies detected by ELISA (patients C2, C3 and C6).

IgE ISAGA results compatible with a recent *Toxoplasma* infection (score ≥ 5) were observed in 26 (84%) of 31 patients with acute toxoplasmosis, with antibody titers ranging from 7 to 12 (mean IgE ISAGA titer = 11.7). Of the five patients with incompatible results, four had a negative IgE ISAGA result (patients A4, A7, A18 and A31) and one had a doubtful result (patient 25). IgE ISAGA results compatible with a long-term *Toxoplasma* infection (score ≤ 2) were observed in 31 (94%) of 33 subjects with chronic toxoplasmosis. The two patients (C2 and C3) with incompatible results had IgE ISAGA values ≥ 11 and a positive ELISA for specific IgM antibodies.

An acute AC/HS pattern was seen in 29 (94%) of 31 patients with acute toxoplasmosis; patients A4 ($<50/<100$) and A12 (100/50) had AC/HS titers compatible with a non-acute pattern. On the other hand, AC/HS titers compatible with an acute pattern were observed in 15 (45%) of 33 patients with chronic toxoplasmosis (patients C1-C4, C6, C10,

C22, C25-C30, C32 and C33); four of these had detectable *Toxoplasma*-specific IgM antibodies by ELISA (patients C2-C4 and C6).

The F.A.S.T.-ELISA avidity indices for 31 serum samples from patients with acute toxoplasmosis ranged from 2-45% (mean index = 26.2%), whereas for sera from the 33 subjects with chronic infection, the indices ranged from 59-99% (mean index = 78.6%). F.A.S.T.-ELISA avidity indices $\leq 40\%$ and $\geq 58\%$ were considered as indicative of a recent and long-term *Toxoplasma* infection, respectively. In this study, 27 (87%) of 31 patients with acute toxoplasmosis had F.A.S.T.-ELISA avidity indices compatible with a recent infection. The remaining four patients (A19, A28, A30 and A31) had inconclusive avidity indices (42% to 45%). All 33 patients with chronic toxoplasmosis had F.A.S.T.-ELISA avidity indices compatible with a long-term *Toxoplasma* infection. The ELISA Platelia avidity indices for 31 serum samples from patients with acute toxoplasmosis ranged from 0.6-23.6% (mean index = 7.5%), whereas for sera from the 33 subjects with chronic infection, the indices ranged from 25-99% (mean index = 67.9%). ELISA Platelia avidity indices $\leq 26.5\%$ and $\geq 30.6\%$ were considered as indicative of a recent (infected < 20 weeks earlier) and latent *Toxoplasma* infection, respectively. All 31 patients with acute toxoplasmosis had ELISA Platelia avidity indices compatible with a recent *Toxoplasma* infection. Only one subject with a long-term *Toxoplasma* infection had an avidity index compatible with a recent infection (patient C33).

DISCUSSION

The diagnosis of a recently acquired *Toxoplasma* infection is usually based on the detection of specific IgM antibodies, seroconversion or a ≥ 4 -fold rise in the titer of *Toxoplasma*-specific IgG antibodies. As seroconversion and a rise in IgG titers are seldom demonstrable, the detection of *Toxoplasma*-specific IgM antibodies has been the most used serological marker for diagnosing acute infection. In many countries, the diagnosis of acute toxoplasmosis is usually based on the detection of specific IgM antibodies in a single serum sample. The use of tests with a low specificity and the presence of specific IgM antibodies in the chronic stage of infection have led to unnecessary concern, especially with regard to pregnant women. Liesenfeld et al. (1997) evaluated the accuracy of the Platelia Toxo IgM test in 575 serum samples obtained during an outbreak of toxoplasmosis in Canada in 1995. When compared with results obtained using a reference IgM ELISA (Montoya and Remington, 1995; Naot and Remington, 1980), the Platelia test had a sensitivity of 99.4% and a specificity of 49.2%. Of the 153 serum samples that were positive in the Platelia test and negative in the reference ELISA, 71 (46.4%) were negative in the Sabin-Feldman dye test. A variety of confirmatory tests have been proposed to distinguish a recent from a long-term *Toxoplasma* infection, including IgA and IgE antibody tests, the differential agglutination (AC/HS) test and IgG avidity tests.

Toxoplasma-specific IgA and IgE antibodies have been measured by ELISA and ISAGA in serum samples from patients with toxoplasmosis. In the present study, specific IgA antibodies were detected by two antibody capture ELISA tests (Platelia Toxo IgA and ETI-TOXOK-A) and an automated direct ELISA (IMX Toxo IgA). A surface protein of *T. gondii* with a molecular weight of 30,000 (P 30) has been shown by several immunological studies to be a major antigen of the parasite (Huskinson et al. 1990; Partanen et al. 1984). In antibody capture assays, a horseradish peroxidase-conjugated anti - P30 monoclonal antibody is used as the enzyme tracer. Several reports have shown that anti-*Toxoplasma* IgA antibodies are frequently detected in acute acquired toxoplasmosis (Bessi res et al. 1992; Decoster et al. 1988; Le Fichoux et al. 1987; Pujol et al. 1989; Takahashi and Rossi 1994). Decoster et al. (1988) showed that during toxoplasmosis an intense IgA antibody response is directed against the P30 antigen of *T. gondii*. Specific anti-P30 antibodies were detected in

serum samples of all patients studied during the acute phase of acquired toxoplasmosis. In a previous study, we screened serum samples from 51 patients with acute acquired toxoplasmosis for specific IgA antibodies using the ETI-TOXOK A kit. Fifty of the 51 (99%) serum samples tested had significant levels of specific IgA antibodies (Takahashi and Rossi 1994).

The persistence of *Toxoplasma*-specific IgA antibodies following acute infection is still controversial. Turunen et al. (1983) used a four-layer ELISA to evaluate specific antibodies during toxoplasmosis and showed that the IgA antibody response was slower than the IgM response. This suggested that the detection of IgA could improve the laboratory diagnosis in cases where IgM antibodies had already disappeared and where no further increase in IgG antibodies could be detected. Decoster et al. (1988) did not detect anti-P30 IgA antibodies in serum samples from patients with chronic toxoplasmosis, whereas in some samples significant levels of *Toxoplasma*-specific IgM antibodies were detected more than one year after the infection.

Gorgievski-Hrisoho et al. (1996) evaluated commercial *Toxoplasma* IgA kits and showed that the Platelia IgA kit was more sensitive than the TOXOK A and Toxo IgA ELISA (Eurogenetics S. A., Belgium) kits for diagnosing recently acquired *Toxoplasma* infection. Positive Platelia IgA results were found in all patients with an evolving immune response, suggestive of a recent *Toxoplasma* infection. On the other hand, kinetic studies of antibody responses to *T. gondii* revealed that in most cases the decline in the reactivity of IgA antibodies detected by the Platelia test was slower than for IgM antibodies detected by ELISA. Bertozzi et al. (1999) reported the detection of specific IgA antibodies by the ETI-TOXOK A kit in sequential serum samples from a patient exhibiting significant levels of *Toxoplasma*-specific IgM antibodies for seven years after the onset of the clinical symptoms of toxoplasmosis. A shorter persistence of specific IgA antibodies was observed. However, significant levels (> 10 AU/ml) of IgA were detected for two years after the onset of clinical symptoms. As defined by the manufacturer of the ETI TOXOK A kit, most patients with acute toxoplasmosis have IgA antibody levels > 40 AU/ml. At this cut-off value, significant levels of IgA were detected for one year after the beginning of clinical manifestations. IgA levels ≤ 40 AU/ml with the ETI TOXOK A kit do not exclude a recent

infection, since in some patients such levels can be reached very soon after infection with *T. gondii* (Takahashi and Rossi 1997). Decoster et al. (1995) reported no significant differences in the sensitivities and specificities of the Platelia IgA and the IMx toxo IgA kits for the diagnosis of acquired toxoplasmosis. Nevertheless, the Platelia IgA test was more efficient in establishing the date of infection because anti P30 IgA antibodies disappeared earlier than IgA antibodies detected by the IMx Toxo IgA kit.

The present study confirmed that anti-*Toxoplasma* IgA antibodies are detected with a high frequency in the acute acquired toxoplasmosis: The IMx, Platelia and ETI-TOXOK kits detected antibody levels compatible with a recent *Toxoplasma* infection in serum samples from all 31 patients with acute toxoplasmosis. On the other hand, the analysis of serum samples from 33 patients with chronic toxoplasmosis revealed that significant levels of specific IgA antibodies may be detected with a high frequency by the three kits during the chronic phase of toxoplasmosis. In some patients with chronic toxoplasmosis, specific IgA antibodies were detected in the absence of specific IgM antibodies.

Specific IgE antibodies appear early in *Toxoplasma* infection, practically simultaneously with IgM and IgA antibodies (Pinon et al., 1990). Measurement of specific IgE antibodies has been claimed to be of value for the diagnosis of current *Toxoplasma* infection. Significant levels of specific IgE antibodies have been demonstrated in 63-100% of patients with toxoplasmosis of documented onset (Montoya and Remington 1995; Pinon et al. 1990; Wong et al. 1993). Pinon et al. (1990) reported that the IgE-ISAGA was positive in serum samples from 25 (86%) of 29 women who seroconverted during gestation or had specific IgA and IgM antibodies. Specific IgE was present early during infection, at the time that IgM antibodies were present; but slightly preceding the presence of IgA antibodies. In sequential serum samples from 23 patients with toxoplasmosis, IgE antibodies never persisted for longer than 4 months after the beginning of the infection. Wong et al. (1993) reported that IgE-ISAGA and IgE ELISA were positive in 63% and 100% of women who seroconverted during gestation, respectively. In patients with toxoplasmic lymphadenopathy, a positive IgE ISAGA was obtained in 88% of the patients whereas the IgE ELISA was positive in 96% of the cases. The decline of anti-*T. gondii* IgE in individual patients varied

considerably; positive IgE ISAGA and IgE ELISA tests were found in a serum sample taken from a patient 37 weeks after seroconversion. In the present study, IgE antibodies detected by ISAGA were present in 26 of 31 (84%) patients with acute toxoplasmosis. Positive IgE ISAGA tests were found in serum samples from two subjects with chronic infection taken more than one year after the beginning of the clinical symptoms of infection.

The AC/HS test is a differential agglutination procedure which compares the titers obtained with formalin-fixed tachyzoites (HS antigen) with those obtained with acetone-fixed tachyzoites (AC antigen). The AC and HS antigens are membrane-associated antigens, the first found predominantly in tachyzoites and the latter in tachyzoites and bradyzoites (Suzuki et al. 1988). The AC and HS antigen preparations contain antigens which are recognized by IgG antibodies. High titers in the AC test are associated with a recently acquired infection whereas high titers in the HS test are associated with a long-term *Toxoplasma* infection (Dannemann et al. 1990; Montoya and Remington 1995; Suzuki et al. 1988). Dannemann et al. (1990) have shown that the AC/HS test is useful for confirming recently acquired *Toxoplasma* infections in patients who have both IgM and IgG specific antibodies. In a group of 33 patients with recently acquired toxoplasmosis (19 pregnant women who acquired infections during the pregnancy and 14 nonpregnant patients with toxoplasmic lymphadenopathy), the AC/HS test correctly identified acute infection in all of the 19 pregnant patients and in 12 of the 14 cases of toxoplasmic lymphadenopathy. On the other hand, an acute AC/HS pattern was still observed in 5 of 8 patients who were evaluated 14-21 months following the clinical onset of toxoplasmic lymphadenopathy and in 2 of 14 individuals who had been infected for more than 2 years. In the present study, 29 (94%) of 31 patients with a recent *Toxoplasma* infection had an AC/HS pattern compatible with acute toxoplasmosis. On the other hand, an acute pattern in the AC/HS test was detected in 15 of 33 subjects with chronic toxoplasmosis, including four patients with significant levels of anti-*T. gondii* IgM antibodies detected by ELISA.

In recent years, several immunoenzymatic assays for specific IgG have been adapted to estimate antibody avidity in several diseases, including toxoplasmosis (Camargo et al. 1991; Hedman et al. 1989; Holliman et al. 1994; Jenum et al. 1997; Joynson et al. 1990; Rossi 1998). In solid-phase ELISA systems, a hydrogen-bond disrupting agent is

commonly used to elute low-avidity antibodies from immobilized antigen. Among the hydrogen-bond destabilizers, urea has been used extensively at concentrations from 6-8 M (Blackburn et al. 1991; Camargo et al. 1991; Gray 1995; Hedman and Rousseau, 1989; Hedman and Seppala 1988, Hedman et al. 1989; Holliman et al. 1994; Jenum et al. 1997; Ward et al. 1994). In 1989, Hedman et al. reported an IgG avidity ELISA for toxoplasmosis based on titration of each serum sample and calculation of the titers, with and without urea treatment, in relation to a defined cut-off value. Avidity indices < 10% were found in serum samples from five patients with acute toxoplasmosis within 12 weeks after the onset of clinical symptoms. In contrast, in serum samples from 21 subjects with preexisting *Toxoplasma* immunity, the avidity indices ranged from 25-97% (mean index = 50.1%). Jenum et al. (1997) compared the results obtained with an avidity ELISA test based on the titration of serum samples using the Platelia Toxo-IgG kit in serum samples from pregnant women with different *T. gondii* immune status. The IgG avidity indices for 58 serum samples obtained within 20 weeks after the estimated time of infection from women diagnosed as having acute toxoplasmosis based on seroconversion or a ≥ 4 -fold rise in the Sabin-Feldman dye test titer, ranged from 0.1-26.5% (mean index = 4.9%). In 26 serum samples from women with latent infection, the avidity indices ranged from 30.6-75.4% (mean index = 51.3%).

Recently, we described an avidity test for toxoplasmosis using the Falcon assay screening test (F.A.S.T.®) ELISA system based on the assay of a single serum dilution. The avidity indices for 25 serum samples obtained two months after the onset of clinical symptoms from patients diagnosed as having acute toxoplasmosis based on IgM antibodies detected by indirect immunofluorescence (IIF) and ELISA plus either seroconversion or a ≥ 4 -fold rise in the titer of *Toxoplasma*-specific IgG (by an IIF test) ranged from 10-40% (mean index = 25.3%), whereas for 25 serum samples from subjects with preexisting *Toxoplasma* immunity, the indices ranged from 58-94% (mean index = 73.1%).

Variations in the ranges for low- and high-avidity antibodies are expected and are probably related to several factors, including the heterogeneity of the patients, the immune status of the patients at the time of blood collection, the time of blood sampling relative to infection with the parasite, the intrinsic properties of the techniques and antigen

preparations used in the assays, the type and concentration of hydrogen bond-disrupting agent used to elute low-avidity antibodies from immobilized antigen, and the method of calculating the antibody avidity. In the present study, we used two different tests to evaluate the avidity of IgG specific to *T. gondii*. One method was based on the titration of each serum sample and calculation of the titers, with and without urea treatment, in relation to a defined cut-off value (Hedman et al. 1989; Jenum et al. 1997). In the other method, a single serum dilution was used and the absorbances of the reactions performed in the presence and absence of urea were compared (Holliman et al. 1994; Rossi 1998). The titration method was found to be more sensitive for diagnosing a recent primary *Toxoplasma* infection since all 31 serum samples from patients with acute toxoplasmosis had avidity indices compatible with a recent *Toxoplasma* infection. With the single dilution method, serum samples from four patients had equivocal results. In the 33 patients with chronic toxoplasmosis, similar results were obtained with the two avidity methods; only one serum sample had a non compatible avidity value with the titration method.

The results of the present study show that the current serological markers used for diagnosing acute acquired toxoplasmosis have significant limitations. Our data suggest that determination of the avidity of *Toxoplasma*-specific IgG by the titration method in patients with detectable IgM antibodies would provide a more efficient diagnosis of the stage of infection by *T. gondii*.

REFERENCES

- Ashburn D, Joss AWL, Pennington TH, Ho-Yen DO (1998) Do IgA, IgE, and IgG avidity tests have any value in the diagnosis of *Toxoplasma* infection in pregnancy? *J Clin Pathol* 51:312-315.
- Bertozi LC, Suzuki LA, Rossi CL (1999) Serological diagnosis of toxoplasmosis: usefulness of IgA detection and IgG avidity determination in a patient with a persistent IgM antibody response to *Toxoplasma gondii*. *Rev. Inst. Med Trop. S. Paulo* 41:175-177.
- Bessi res MH, Roques C, Berrebi A, Barre V, Cazaux M, S gu la JP (1992) IgA antibody response during acquired and congenital toxoplasmosis. *J Clin Pathol* 45:605-608.
- Blackburn NK, Besselaar TG, Shoub BD, O'Connell KF (1991) Differentiation of primary cytomegalovirus infection from reactivation using the urea denaturation test for measuring antibody avidity. *J Med Virol* 33:6-9.
- Bobic B, Sibalic D, Djurkovic-Djakovic O (1991) High levels of IgM antibodies specific for *Toxoplasma gondii* in pregnancy 12 years after primary *Toxoplasma* infection. *Gynecol Obstet Invest* 31:182-184.
- Brooks RG, McCabe RE, Remington JS (1987) Role of serology in the diagnosis of toxoplasmic lymphadenopathy *Rev Infect Dis* 9:1055-1062.
- Camargo ME, da Silva SM, Leser PG, Granato CH (1991) Avid ez de anticorpos IgG espec ficos como marcadores de infec  o prim ria pelo *Toxoplasma gondii*. *Rev Inst Med Trop S o Paulo* 33:213-218.
- Dannemann BR, Vaughan WC, Thulliez P, Remington JS (1990) Differential agglutination test for diagnosis of recently acquired infection with *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol* 28:1928-1933.
- Decoster A, Darcy F, Caron A, Capron A (1988) IgA antibodies against P 30 as markers of congenital and acute toxoplasmosis. *Lancet* ii:1104-1107.

- Decoster A, Gontier P, Dehecq E, Demory JL, Duhamel M (1995) Detection of anti-*Toxoplasma* immunoglobulin A antibodies by Platelia-Toxo IgA directed against P 30 and by IMx Toxo IgA for diagnosis of acquired and congenital toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 33:2206-2208.
- Del Bono V, Canessa A, Bruzzi P, Fiorelli MA, Terragna A (1989) Significance of specific immunoglobulin M in the chronological diagnosis of 38 cases of toxoplasmic lymphadenopathy. *J Clin Microbiol* 27:2133-2135.
- Eisen HN, Siskind GW (1964) Variations in affinities of antibodies during the immune response. *Biochemistry* 3:996-1008.
- Gorgievski-Hrisoho M, Germann D, Matter L (1996) Diagnostic implications of kinetics of immunoglobulin M and A antibody responses to *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol* 34:1506-1511.
- Gray JJ (1995) Avidity of EBV VCA-specific antibodies: distinction between recent primary infection, past infection and reactivation. *J Virol Methods* 52:95-104.
- Hedman K, Lappalainen M, Seppälä I, Mäkelä O (1989) Recent primary *Toxoplasma* infection indicated by a low avidity of specific IgG. *J Infect Dis* 159:736-740.
- Hedman K, Rousseau SA (1989) Measurement of avidity of specific IgG for verification of recent primary rubella. *J Med Virol* 27:288-292.
- Hedman K, Seppala I (1988) Recent rubella virus infection indicated by a low avidity of specific IgG. *J Clin Immunol* 8:214-221.
- Holliman RE, Raymond R, Renton N, Johnson JD (1994) The diagnosis of toxoplasmosis using IgG avidity. *Epidemiol Infect* 112:399-408.
- Huskinson J, Thulliez P, Remington JS (1990) *Toxoplasma* antigens recognized by human immunoglobulin A antibodies. *J Clin Microbiol* 28:2632-2636.

- Jenum PA, Stray-Pedersen B, Gundersen A (1997) Improved diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in early pregnancy by determination of antitoxoplasma immunoglobulin G avidity. *J Clin Microbiol* 35:1972-1977.
- Joynson DHM, Payne RA, Rawal BK (1990) Potential role of IgG avidity for diagnosing toxoplasmosis. *J Clin Pathol* 43:1032-1033.
- Kean BH (1972) Clinical toxoplasmosis – 50 years. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 66:549-571.
- Krick JA, Remington JS (1978) Toxoplasmosis in the adult – an overview. *N Engl J Med* 298:550-553.
- Le Fichoux Y, Marty P, Chan H (1987) Les IgA sériques spécifiques dans le diagnostic de la toxoplasmose. *Ann Pédiatr (Paris)* 34:375-379.
- Liesenfeld O, Press C, Montoya JG, Gill R, Isaac-Renton JL, Hedman K, Remington JS (1997) False-positive results in immunoglobulin M (IgM) *Toxoplasma* antibody tests and importance of confirmatory testing: the Platelia Toxo IgM test. *J Clin Microbiol* 35:174-178.
- Montoya JG, Remington JS (1995) Studies on the serodiagnosis of toxoplasmic lymphadenitis. *Clin Infect Dis* 20:781-789.
- Naot Y, Remington JS (1980) An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of IgM antibodies to *Toxoplasma gondii*: use for diagnosis of acute acquired toxoplasmosis. *J Infect Dis* 142:757-766.
- Partanen P, Turunen HJ, Paasivuo RTA, Leinikki PO (1984) Immunoblot analysis of *Toxoplasma gondii* antigens by human immunoglobulins G, M, and A antibodies at different stages of infection. *J Clin Microbiol* 29:133-135.
- Pinon JM, Toubas D, Marx G, Mougeot G, Bonnin A, Bonhomme A, Villaume M, Foudrinier F, Lèpan H (1990) Detection of specific immunoglobulin E in patients with toxoplasmosis *J Clin Microbiol* 28:1739-1743.

- Pujol M, Morel C, Malbruny B (1989) Intérêt de la recherche des IgA dans le diagnostic de la toxoplasmose. *Pathol Biol* 37:893-896.
- Remington JS, Desmonts G (1990) Toxoplasmosis. In *Infectious Diseases of the Fetus and the Newborn Infant*. Eds, JS Remington and JO Klein. Philadelphia: WB Saunders Company, pp 89-195.
- Rossi CL (1998) A simple, rapid enzyme-linked immunosorbent assay for evaluating immunoglobulin G antibody avidity in toxoplasmosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 30:25-30.
- Suzuki Y, Thulliez P, Desmonts G, Remington JS (1988) Antigen(s) responsible for immunoglobulin G responses specific for the acute stage of *Toxoplasma* infection in humans *J Clin Microbiol* 26:901-905.
- Takahashi EEH, Rossi CL (1994) Use of three immunological techniques for the detection of *Toxoplasma* sp IgA antibodies in acute toxoplasmosis. *J Clin Pathol* 47:1101-1104.
- Takahashi EEH, Rossi CL (1997) IgM and IgA antibody responses in 12 cases of human acquired toxoplasmosis. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 39:327-331.
- Thulliez P, Remington JS, Santoro F, Ovlaque G, Sharma S, Desmonts G (1986) Une nouvelle réaction d'agglutination pour le diagnostic du stade évolutif de la toxoplasmose acquise. *Pathol Biol* 34:173-177.
- Turunen H, Vuorio KA, Leinikki PO (1983) Determination of IgG, IgM and IgA antibody responses in human toxoplasmosis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Scand J Infect Dis* 15:307-311.
- Van Loon AM, Van der Logt JTM, Heessen FWA, Van der Veen (1983) Enzyme-linked immunosorbent assay that uses labelled antigen for detection of immunoglobulin M and A antibodies in toxoplasmosis: comparison with indirect immunofluorescence and double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 17:997-1004.

- Ward KN, Dhaliwal W, Ashworth KL, Clutterbuck EJ, Teo CG (1994) Measurement of antibody avidity for hepatitis C virus distinguishes primary antibody responses from passively acquired antibody. *J Med Virol* 43:367-372.
- Werblin TP, Kim YT, Quagliata F, Siskind GW (1973) Studies on the control of antibody synthesis. III. Changes in heterogeneity of antibody affinity during the course of the immune response. *Immunology* 24:477-492.
- Wong SY, Hadju MP, Ramirez R, Thulliez, P, McLeod R, Remington JS (1993) Role of specific immunoglobulin E in diagnosis of acute toxoplasma infection and toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 31:2952-2959.

TABLE 1. *Toxoplasma* serology in patients with acute acquired toxoplasmosis.

	Time (mo)	IgM		IgA			IgE- ISAGA (score)	AC/HS test (C / NC)	Avidity test	
		IIF	ELISA	IMx (index)	Platelia (index)	ETI- TOXOK (UA/ml)			FAST- ELISA (index)	Platelia (index)
A 1	1	2048	R	4.9	36.7	264.7	12	400 / <100 (C)	16	9.4
A 2	1	2048	R	3.1	44.0	250.1	12	>3200 / 1600 (C)	26	23.6
A 3	1	4096	R	3.2	48.4	291.9	12	>3200 / 800 (C)	19	3.1
A 4	1	128	R	3.1	30.2	209.4	2	<50 / <100 (NC)	23	18
A 5	1	4096	R	4.1	39.1	236.7	12	400 / 200 (C)	20	8.7
A 6	1.5	8192	R	3.0	40.8	188.1	12	1600 / 800 (C)	31	3.1
A 7	2	2048	R	1.6	5.0	20.1	0	1600 / 400 (C)	25	11.6
A 8	1	512	R	2.7	25.8	219.4	12	1600 / 800 (C)	24	6.3
A 9	1	8192	R	4.5	40.1	255.7	12	>3200 / 200 (C)	11	3
A 10	1	4096	R	4.2	42.1	267.6	12	800 / 400 (C)	28	7.3
A 11	2	2048	R	1.8	32.0	194.3	12	1600 / 800 (C)	30	3.1
A 12	1	512	R	2.6	18.6	177.4	12	100 / 50 (NC)	2	17.3
A 13	1.5	1024	R	4.9	36.2	261.5	11	1600 / 1600 (C)	27	6.8
A 14	1	1024	R	1.9	32.1	255.1	11	1600 / 1600 (C)	30	17.5
A 15	2	2048	R	5.4	45.0	273.8	12	>1600 / 1600 (C)	40	1.7
A 16	2	2048	R	4.1	46.7	259.8	12	>1600 / 3200 (C)	37	3.3
A 17	1	2048	R	4.8	44.3	276.8	12	400 / 400 (C)	25	7
A 18	1	512	R	4.8	38.2	275.9	2	>3200 / 400 (C)	17	6.1
A 19	3	4096	R	2.2	46.0	279.4	12	>3200 / 6400 (C)	42	0.9
A 20	1.5	8192	R	3.0	38.5	218.4	12	>3200 / 800 (C)	37	2.6
A 21	1.5	512	R	2.8	22.4	168.3	12	400 / 800 (C)	4	3.2
A 22	1	8192	R	2.9	41.2	196.9	12	>1600 / 800 (C)	13	5.8
A 23	1	1024	R	4.8	37.6	234.9	12	1600 / 1600 (C)	26	20
A 24	1	4096	R	2.2	49.6	262.4	12	>1600 / 800 (C)	25	7.9
A 25	1	1024	R	1.8	25.8	220.8	3	>1600 / 800 (C)	36	1.2
A 26	1	8192	R	4.8	45.4	261.4	7	>1600 / 1600 (C)	23	10
A 27	1	2048	R	1.3	40.2	263.6	12	>1600 / 1600 (C)	18	0.6
A 28	3	1024	R	1.4	42.5	264.1	10	>3200 / 1600 (C)	45	3.3
A 29	1	4096	R	2.4	34.6	201.6	12	>1600 / 800 (C)	22	6.3
A 30	3	512	R	1.3	35.0	237.3	12	>3200 / 6400 (C)	45	8.2
A 31	3	1024	R	1.6	54.9	189.9	0	>1600 / 800 (C)	44	5

P = patients; Time = months from the onset of clinical symptoms to the time of blood sampling;

Significant antibody results: IgM-IIF ≥ 32 ; IgM-ELISA = reactive (R); IgA-ELISA IMx index ≥ 0.6 ; IgA-ELISA Platelia index > 2 ; IgA-ELISA ETI-TOXOK > 10 AU/ml; IgE-ISAGA ≥ 5 ; AC/HS test – C = compatible with an acute pattern; NC = not compatible with an acute pattern.

FAST-ELISA avidity indices $\leq 40\%$ and $\geq 58\%$ are indicative of recent and long-term *Toxoplasma* infections, respectively. Platelia avidity indices $\leq 26.5\%$ and $\geq 30.6\%$ are indicative of recent and long-term *Toxoplasma* infections, respectively.

TABLE 2. *Toxoplasma* serology in patients with chronic toxoplasmosis.

	Time	IgM		IgA			IgE-ISAGA	AC/HS test	Avidity test	
		IIF	ELISA	IMx	Platelia	ETI-TOXOK			FAST-ELISA	Platelia
	(mo)	(titer)	(R/ NR)	(index)	(index)	(UA/ml)	(score)	(C / NC)	(index)	(index)
C 1	20	< 16	NR	3.90	28.2	160	0	> 800 / 1600 (C)	83	95.0
C 2	13	< 16	R	3.00	38.0	180	11	>1600 / >3200 (C)	85	74.0
C 3	14	< 16	R	1.15	8.3	26	12	> 800 / 1600 (C)	87	68.0
C 4	72	16	R	0.54	NS	8	2	> 800 / 200 (C)	86	55.0
C 5	24	< 16	NR	0.17	NS	1	0	50 / 400 (NC)	68	63.0
C 6	16	< 16	R	2.43	5.1	13	0	1600 / 3200 (C)	87	99.0
C 7	72	< 16	NR	0.39	NS	4	0	100 / 800 (NC)	88	73.0
C 8	24	< 16	NR	0.09	NS	1	0	< 50 / 100 (NC)	67	87.0
C 9	26	< 16	NR	0.43	NS	3.5	0	50 / 400 (NC)	78	55.0
C 10	18	< 16	NR	0.51	NS	3.5	0	> 800 / 400 (C)	81	60.5
C 11	30	< 16	NR	0.44	NS	1.5	0	50 / 800 (NC)	73	79.4
C 12	26	< 16	NR	0.17	NS	1	0	< 50 / 200 (NC)	64	63.6
C 13	25	< 16	NR	0.06	NS	1.5	0	< 50 / 200 (NC)	77	56.0
C 14	27	< 16	NR	0.52	NS	1	0	50 / 800 (NC)	85	80.0
C 15	28	< 16	NR	0.10	NS	1	0	< 50 / 200 (NC)	95	84.0
C 16	25	< 16	NR	0.11	NS	1	0	< 50 / 400 (NC)	71	73.0
C 17	24	< 16	NR	0.52	NS	2	0	< 50 / 800 (NC)	63	55.6
C 18	26	< 16	NR	0.08	NS	1	0	< 50 / 400 (NC)	76	71.0
C 19	26	< 16	NR	0.07	NS	1	0	< 50 / 400 (NC)	81	99.0
C 20	28	< 16	NR	0.19	NS	1	0	< 50 / 800 (NC)	79	58.3
C 21	27	< 16	NR	0.13	NS	2	0	< 50 / 800 (NC)	68	61.5
C 22	25	< 16	NR	0.16	NS	2	0	> 1600 / 400 (C)	59	48.0
C 23	19	< 16	NR	0.07	NS	1	0	< 50 / 800 (NC)	78	43.0
C 24	20	< 16	NR	0.1	NS	1	0	< 50 / 800 (NC)	65	90.0
C 25	21	< 16	NR	0.12	NS	1	0	> 1600 / 400 (C)	67	68.0
C 26	20	< 16	NR	0.07	NS	1	0	> 1600 / 400 (C)	87	99.0
C 27	21	< 16	NR	0.22	NS	0.5	0	> 1600 / 800 (C)	78	50.0
C 28	22	< 16	NR	0.22	NS	0.5	0	> 1600 / 400 (C)	81	58.0
C 29	18	< 16	NR	0.16	NS	1.7	0	> 1600 / 800 (C)	69	63.0
C 30	19	< 16	NR	0.16	NS	0.5	2	> 1600 / 800 (C)	74	58.3
C 31	36	< 16	NR	1.42	7.4	26.5	2	400 / 3200 (NC)	99	71.0
C 32	36	< 16	NR	0.30	1.0	4	2	> 1600 / 800 (C)	99	57.0
C 33	38	< 16	NR	1.08	0.6	4	2	> 1600 / 800 (C)	95	25.0

P = patients; Time = months from the onset of clinical symptoms to the time of blood sampling;

Significant antibody results: IgM-IIF ≥ 32 ; IgM-ELISA = reactive (R); IgA-ELISA IMx index ≥ 0.6 ; IgA-ELISA Platelia index > 2 ; IgA-ELISA ETI-TOXOK > 10 AU/ml; IgE-ISAGA ≥ 5 ; AC/HS test – C = compatible with an acute pattern; NC = not compatible with an acute pattern.

IgA-ELISA IMx indices ranging from 0.500 to 0.599 were considered equivocal results; IgA ELISA Platelia indices < 2 were considered borderline positive results.

FAST-ELISA avidity indices $\leq 40\%$ and $\geq 58\%$ are indicative of recent and long-term *Toxoplasma* infections, respectively. Platelia avidity indices $\leq 26.5\%$ and $\geq 30.6\%$ are indicative of recent and long-term *Toxoplasma* infections, respectively.

NR = non-reactive. NS = non-significant.

4. DISCUSSÃO

O diagnóstico da toxoplasmose aguda adquirida é, frequentemente, baseado na detecção de anticorpos específicos IgM anti-*T.gondii*, soroconversão ou elevação significativa dos títulos de anticorpos IgG (REMINGTON, McLEOD, DESMONTS, 1995; LIESENFELD *et al.*, 1996). Como a soroconversão e a elevação dos títulos de IgG são difíceis de serem demonstrados, o marcador sorológico mais utilizado para o diagnóstico da toxoplasmose aguda é o anticorpo IgM. Em diversos países, o diagnóstico da toxoplasmose aguda é usualmente baseado na detecção de anticorpos IgM específicos em uma única amostra de soro. Testes comerciais para a detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii* têm sido cada vez mais utilizados; entretanto, a grande maioria dos testes disponíveis apresenta um grande número de resultados falso positivos e/ou falso negativos (VERHOFSTEDE *et al.*, 1989; ASHBURN *et al.*, 1992; LIESENFELD *et al.*, 1996). A utilização de testes para a detecção de IgM com baixa especificidade e a persistência, em alguns pacientes, dos anticorpos IgM na fase crônica da infecção têm dificultado o diagnóstico da infecção toxoplásmica, podendo acarretar procedimentos desnecessários, sobretudo com relação às gestantes (LIESENFELD *et al.*, 1996). Nos últimos anos, diversos estudos propuseram outros testes confirmatórios para auxiliar na distinção entre infecção toxoplásmica recente e antiga, incluindo testes de detecção de anticorpos IgA e IgE, o teste de aglutinação diferencial (AC/HS) e os testes baseados na determinação da avidéz dos anticorpos IgG. Este trabalho foi elaborado com o objetivo de avaliar os marcadores sorológicos utilizados para o imunodiagnóstico da toxoplasmose aguda adquirida.

Vários estudos têm enfatizado o valor da detecção de anticorpos IgA anti-*T. gondii* para o diagnóstico da toxoplasmose aguda. Decoster *et al.*, em 1988, utilizando uma técnica de ELISA, detectaram anticorpos IgA em todas as amostras de soros de pacientes com toxoplasmose aguda. Por outro lado, anticorpos IgA não foram detectados em nenhum paciente com toxoplasmose crônica. Num estudo posterior, Stepick-Biek *et al.* (1990) detectaram, também, por ELISA, anticorpos IgA específicos em 12 gestantes que apresentaram soroconversão durante a gravidez, em 10 pacientes com linfadenopatia toxoplásmica e em 8 de 9 crianças com toxoplasmose congênita (em alguns dos pacientes estudados, a pesquisa de anticorpos IgM foi negativa). Por outro lado, anticorpos IgA não foram encontrados nos 20 pacientes com toxoplasmose crônica incluídos no estudo. Num trabalho realizado por Bessi res *et al.* (1992), anticorpos IgA foram encontrados em 95%

dos casos de toxoplasmose aguda adquirida. Takahashi & Rossi (1994) analisaram amostras de soros de 51 pacientes com toxoplasmose aguda adquirida. Níveis significativos de anticorpos IgA específicos foram detectados em 50 (99%) das 51 amostras. Tais estudos demonstraram que os anticorpos IgA são encontrados com alta frequência em pacientes com toxoplasmose aguda. Embora anticorpos IgA específicos sejam detectados na maioria dos pacientes com toxoplasmose aguda, ainda existem controvérsias a respeito da persistência desses anticorpos após a infecção com *T. gondii*. Turunen *et al.* (1983) observaram que o aumento nos níveis séricos dos anticorpos IgA era mais lento do que o da IgG, embora os níveis máximos fossem atingidos ao mesmo tempo, e que o seu declínio era mais lento do que o da IgM, e mais rápido do que o da IgG. Em alguns pacientes, observou-se, inclusive, uma resposta prolongada e estável dos anticorpos IgA, ainda que num nível baixo. Em um estudo realizado por Le Fichoux *et al.* (1987), verificou-se que, em pacientes com toxoplasmose aguda adquirida, os anticorpos IgA específicos aparecem antes que os anticorpos IgG e, ao mesmo tempo, ou pouco tempo depois que os anticorpos IgM, e que seu desaparecimento ocorre antes da IgM e ao mesmo tempo em que está havendo o declínio dos títulos dos anticorpos IgG. Pujol *et al.* (1989) observaram, em gestantes com infecção toxoplásmica recente e títulos estáveis de anticorpos IgG e IgM, que os anticorpos IgA alcançaram níveis máximos em amostras coletadas até três meses após a infecção e não eram mais detectados em amostras coletadas após seis meses ou mais. Bertozzi *et al.* (1999) pesquisaram a presença de anticorpos IgA anti-*T. gondii* pelo “kit” ETI-TOXOK-A em amostras sequenciais de soros de um paciente que exibia níveis significativos de anticorpos IgM por sete anos após o início das manifestações clínicas. Observou-se uma menor persistência dos anticorpos IgA, com níveis significativos (> 10 UA/ml) sendo detectados dois anos após o início das manifestações clínicas da infecção. De acordo com as instruções do fabricante do kit ETI-TOXOK-A, níveis de IgA > 40 UA/ml são observados na maioria dos pacientes com toxoplasmose aguda. Níveis de IgA de 45 UA/ml foram encontrados em uma amostra de soro coletada um ano após o início das manifestações clínicas. Convém, ainda, ressaltar que níveis de anticorpos IgA ≤ 40 UA/ml com o “kit” ETI-TOXOK-A não excluem a possibilidade de uma infecção recente, uma vez que, em alguns pacientes, estes níveis podem ser alcançados rapidamente após a infecção com o parasita (TAKAHASHI & ROSSI, 1997).

Diversos estudos identificaram uma proteína de superfície do *T. gondii*, com peso molecular de 30.000 daltons (P30), como um dos principais antígenos do parasita, capaz de induzir, preferencialmente, uma resposta de anticorpos IgA (PARTANEN *et al.*, 1984; HUSKINSON, THULLIEZ, REMINGTON, 1990). Em vários testes de ELISA de captura (ELISAc) comerciais, como os “kits” Platelia® Toxo-IgA (Sanofi Diagnostics Pasteur, Marnes-la-coquette, França) e ETI-TOXOK-A (DiaSorin Biomedica, Saluggia, Itália), anticorpos monoclonais de camundongo anti-P30 conjugados com peroxidase têm sido utilizados na pesquisa de anticorpos IgA anti-*T. gondii*. Vários estudos foram idealizados para avaliar a eficácia das técnicas para a detecção de anticorpos IgA. Takahashi & Rossi (1994) utilizaram as técnicas de ELISA direta (ELISAd), ELISAc (realizada com o “kit” ETI-TOXOK-A), e ISAGA para a detecção de IgA, em 51 pacientes com toxoplasmose aguda, em 50 pacientes com infecções heterólogas e em 27 controles sadios. A técnica de ELISAd apresentou sensibilidade de 98% e especificidade de 97%; a técnica de ELISAc apresentou sensibilidade de 100% e especificidade de 99% e a técnica de ISAGA, sensibilidade e especificidade de 100%, demonstrando que as três técnicas apresentavam eficácia similar. Decoster *et al.* (1995) compararam dois “kits” de ELISA para a pesquisa de IgA, o Platelia Toxo-IgA, baseado na captura de anticorpos IgA, e o IMx Toxo-IgA (Abbott Diagnostics, Rungis, França), baseado em uma técnica direta, utilizando um sistema automatizado (IMx Analyzer). Os dois “kits” não apresentaram diferenças significativas com relação à especificidade e à sensibilidade nos casos de toxoplasmose adquirida. Com relação à toxoplasmose congênita, os “kits” apresentaram especificidades semelhantes (100% para o IMx Toxo-IgA e 97% para o Platelia Toxo-IgA), mas o “kit” Platelia apresentou maior sensibilidade (100%) do que o “kit” IMx (38%). O “kit” Platelia Toxo-IgA foi mais eficiente em estabelecer o início da infecção, em virtude do desaparecimento mais rápido dos anticorpos IgA anti-P30, em comparação aos anticorpos IgA detectados pelo “kit” IMx. Em outro estudo comparativo, Gorgievski-Hrisoho *et al.* (1996) pesquisaram anticorpos IgA anti-*T. gondii* em amostras sequenciais de soros de 82 pacientes com toxoplasmose aguda pelos “kits” Platelia Toxo-IgA, ETI-TOXOK-A e Toxo-IgA ELISA (Eurogenetics S.A., Tessenderlo, Bélgica). A primeira amostra de soro de todos os pacientes apresentava níveis significativos de anticorpos IgM anti-*T.gondii*. O “kit” Platelia demonstrou ser o mais sensível. Resultados positivos foram encontrados com este “kit” em

todos os pacientes com resposta imune que sugeriam uma infecção recente. Por outro lado, estudos da cinética da resposta dos anticorpos revelaram que, na maioria dos casos, o declínio da reatividade dos anticorpos IgA detectados pelo “kit” Platelia era mais lento do que o observado para anticorpos IgM detectados por ELISA. Em nosso estudo, anticorpos IgA foram pesquisados em 31 pacientes com toxoplasmose aguda e em 33 pacientes com toxoplasmose crônica, por meio de três “kits” comerciais de ELISA: Platelia Toxo-IgA (Sanofi), ETI-TOXOK-A (DiaSorin) e IMX Toxo-IgA (Abbott). Todos os 31 pacientes com toxoplasmose aguda apresentaram resultados compatíveis com infecção recente, com os 3 “kits”. Tais resultados confirmam que anticorpos IgA anti-*Toxoplasma* são detectados com uma alta frequência na toxoplasmose aguda adquirida. Com relação aos pacientes com toxoplasmose crônica, foram encontrados níveis significativos de anticorpos IgA específicos com uma frequência relativamente alta, com os três “kits” (6 pacientes com o IMx; 7 com o Platelia; 5 com o ETI-TOXOK-A), sendo que, em alguns destes pacientes, anticorpos IgA foram detectados na ausência de anticorpos IgM.

Alguns estudos têm sugerido que a detecção de anticorpos IgE específicos anti-*T. gondii* pode ter grande valor para o diagnóstico da fase aguda da toxoplasmose. Níveis significativos de anticorpos IgE específicos foram detectados em 63% a 100% de pacientes com toxoplasmose aguda adquirida (PINON *et al.*, 1990; WONG *et al.*, 1993; MONTOYA & REMINGTON, 1995). Na infecção por *T. gondii*, os anticorpos IgE específicos aparecem precocemente, praticamente ao mesmo tempo que os anticorpos IgM e IgA (PINON *et al.*, 1990; MONTOYA & REMINGTON, 1995). Em 1990, Pinon *et al.* introduziram um teste de imunocaptura-aglutinação (ISAGA) para a detecção de anticorpos IgE anti-*T.gondii*. Em seu estudo, o teste IgE-ISAGA foi positivo em 86% de mulheres que apresentaram soroconversão durante a gestação. Além disso, o teste foi negativo em todas as amostras de soros coletadas das pacientes quatro ou mais meses após a infecção, sugerindo que os anticorpos IgE persistem por menos tempo do que os anticorpos IgM. Wong *et al.* (1993) avaliaram a utilidade da detecção da IgE específica para o imunodiagnóstico da toxoplasmose, usando os testes ELISA e ISAGA, em 17 pacientes com linfadenopatia toxoplásmica e em 8 mulheres que apresentaram soroconversão durante a gestação. A técnica ELISA foi positiva em 100% das gestantes e em 96% dos pacientes com linfadenopatia. A técnica ISAGA foi positiva em 63% e 88% das gestantes e dos pacientes

com linfadenopatia, respectivamente. A análise de 42 amostras sequenciais de soros das 8 gestantes mostrou que a persistência dos anticorpos IgE variou de maneira considerável com as duas técnicas, com uma tendência a um declínio mais rápido dos níveis de anticorpos com a técnica ISAGA. Ashburn *et al.* (1995), usando a técnica ISAGA, detectaram anticorpos IgE anti-*T. gondii* em 60 (92%) de 65 pacientes com linfadenopatia toxoplásmica e em 4 (44%) de 9 mulheres com toxoplasmose adquirida durante a gestação. Os autores também pesquisaram anticorpos IgE em amostras sequenciais de soros de 21 pacientes com linfadenopatia toxoplásmica. Somente quatro destes pacientes tinham amostras de soros coletadas 10 ou mais meses após o início das manifestações clínicas da infecção. Em um destes pacientes, o teste IgE-ISAGA permaneceu positivo até a última amostra de soro testada, coletada 11 meses após o início da linfadenopatia. Em nosso estudo, anticorpos IgE foram detectados em 26 (84%) de 31 pacientes com toxoplasmose aguda, e não foram encontrados em 31 (94%) dos 33 pacientes com toxoplasmose crônica. Nos dois pacientes com infecção toxoplásmica crônica em que foram detectados anticorpos IgE, as amostras de soros foram coletadas mais de um ano após o início das manifestações clínicas da infecção.

O teste AC/HS é um teste de aglutinação diferencial no qual são comparados os títulos de anticorpos obtidos com formas taquizoítas de *T. gondii* tratadas com formalina (antígeno HS) ou acetona (antígeno AC). Os antígenos AC e HS são antígenos associados à membrana do *T. gondii*, sendo o primeiro encontrado predominantemente nas formas taquizoítas e o segundo, tanto nas formas taquizoítas quanto bradizoítas (SUZUKI *et al.*, 1988). A preparação antigênica AC contém antígenos que são reconhecidos precocemente por anticorpos IgG na infecção (SUZUKI *et al.*, 1988; DANNEMANN *et al.*, 1990). A preparação antigênica HS contém antígenos que são reconhecidos por anticorpos IgG nas fases aguda e crônica da infecção. Altos títulos no teste com o antígeno AC estão associados com infecção recente, enquanto altos títulos no teste com o antígeno HS estão associados com uma infecção mais antiga (DESMONTS & REMINGTON, 1980, THULLIEZ *et al.*, 1986; SUZUKI *et al.*, 1988; DANNEMANN *et al.*, 1990). Dannemann *et al.* (1990) demonstraram que o teste AC/HS foi útil para a confirmação de toxoplasmose aguda adquirida em pacientes que apresentavam anticorpos IgM e IgG específicos. Num grupo de 33 pacientes com toxoplasmose recentemente adquirida, 19 gestantes que haviam adquirido a infecção durante a gravidez e 14 pacientes com linfadenopatia toxoplásmica, o teste

AC/HS identificou corretamente a infecção aguda em todos as gestantes e em 12 dos 14 casos de linfadenopatia toxoplásmica. Por outro lado, no grupo de pacientes com linfadenopatia toxoplásmica, o padrão agudo foi, ainda, observado em 5 de 8 pacientes avaliados 14 a 21 meses após o início da linfadenopatia e em 2 de 14 pacientes avaliados mais de 2 anos após o início dos sintomas. Em um estudo de Montoya & Remington (1995), o teste AC/HS foi utilizado para avaliar amostras sequenciais de soros de 40 pacientes com linfadenopatia toxoplásmica. O padrão agudo foi observado em pelo menos 67% de todas as amostras de soros coletadas durante os 6 primeiros meses após o início das manifestações clínicas. Em um destes pacientes, o padrão agudo persistiu por mais de 17 meses após o início dos sintomas clínicos. No nosso estudo, 29 dos 31 pacientes com infecção recente apresentaram um padrão AC/HS compatível com toxoplasmose aguda. Entretanto, dos 33 pacientes com toxoplasmose crônica, 15 apresentaram perfil AC/HS compatível com infecção aguda. Nossos resultados confirmam o que foi demonstrado nos estudos de Dannemann *et al.* (1990) e Montoya & Remington (1995); em vários casos, são necessários mais de 1 ano e 6 meses para que os resultados do teste AC/HS evoluam para um padrão não-agudo.

Várias técnicas de ELISA têm sido desenvolvidas ou adaptadas para a determinação da avidéz dos anticorpos IgG para várias doenças, incluindo a toxoplasmose (HEDMAN *et al.*, 1989; JOYNSON *et al.*, 1990; CAMARGO *et al.*, 1991; LAPPALAINEN *et al.*, 1993; HOLLIMAN *et al.*, 1994; JENUM *et al.*, 1997; MELO & ROSSI, 1997; COZON *et al.*, 1998; ROSSI, 1998). No estudo pioneiro, realizado por Hedman *et al.* (1989), a técnica utilizada foi baseada na titulação de cada amostra de soro e cálculo dos títulos, com e sem o tratamento com uréia, em relação a um valor de “cut-off” definido. Observou-se que as amostras de soros dos 5 pacientes com infecção primária recente apresentaram baixos índices de avidéz ($\leq 10\%$), que persistiram por alguns meses após o início das manifestações clínicas. Em contraste, nas amostras de soros dos 21 pacientes com imunidade pré-existente, os índices de avidéz variaram de 25% a 97% (índice médio = 50.1%). Utilizando técnica semelhante, Joynson *et al.* (1990) estudaram 20 pacientes com linfadenopatia toxoplásmica, com o início de manifestações clínicas bem determinado. As amostras de soros de pacientes com infecção recente apresentaram índices de avidéz $\leq 30\%$,

enquanto amostras de soros de pacientes com infecção antiga apresentaram índices $\geq 40\%$. Lappalainen *et al.* (1993) analisaram a utilidade da determinação da avidéz dos anticorpos IgG em mulheres grávidas, utilizando a técnica descrita por Hedman *et al.* (1989). Onze gestantes que apresentaram soroconversão durante a gravidez e índices de avidéz baixos ($\leq 15\%$), alcançaram índices duvidosos (16% a 25%) ou altos ($\geq 25\%$) até seis meses após a soroconversão. Setenta e cinco gestantes que já apresentavam índices altos de avidéz mantiveram esses índices nos seis meses seguintes. Estes resultados permitiram concluir que a determinação dos índices de avidéz da IgG poderia ser bastante útil para a confirmação de infecção aguda, uma vez que os anticorpos IgM podem ser encontrados tanto na fase aguda quanto na fase crônica da toxoplasmose. Em um estudo realizado por Melo & Rossi (1997), pela técnica de DOT-ELISA, amostras de soros de pacientes coletadas num intervalo de até dois meses após o início das manifestações clínicas apresentaram uma queda significativa (≥ 16 vezes) nos títulos dos anticorpos IgG após o tratamento com a uréia, indicando baixa avidéz dos anticorpos, ao passo que, em amostras de soros coletadas um ano ou mais após o início das manifestações clínicas, a avidéz dos anticorpos foi alta, pois os títulos de anticorpos permaneceram inalterados após o tratamento com uréia. Jenum *et al.* (1997) compararam os resultados obtidos, com um teste de avidéz baseado na titulação das amostras de soros, utilizando o “kit” de ELISA-Platelia Toxo-IgG, em amostras de soros de gestantes em diferentes estágios da infecção por *T. gondii*. Os índices de avidéz da IgG para 58 amostras de soros obtidas num período de até 20 semanas após o início da infecção, de gestantes com diagnóstico de toxoplasmose aguda baseado em soroconversão ou num aumento ≥ 4 vezes nos títulos do teste de Sabin-Feldman, variaram de 0.1% a 26.5% (média = 4.9%). Em 26 amostras de soros coletadas de gestantes com infecção crônica, os índices de avidéz variaram de 30.6% a 75.4% (média = 51.3%). Em outro estudo realizado com amostras de soros de gestantes, utilizando técnica semelhante à descrita por Hedman (1989), Cozon *et al.* (1998), observaram que um valor de “cut-off” $> 35\%$ estava sempre associado com infecção crônica, e poderia excluir uma infecção adquirida recentemente (< 3 meses). Holliman *et al.* (1994) desenvolveram uma técnica de determinação da avidéz dos anticorpos IgG anti-*T. gondii* empregando o “kit” Enzygnost IgG ELISA (Hoechst-Behring, Frankfurt, Alemanha), utilizando apenas uma diluição de cada amostra de soro. Todas as amostras de soros de pacientes com linfadenopatia há mais de três meses apresentaram

índices de avidéz considerados altos ($> 50\%$), ao passo que, de 14 pacientes com linfadenopatia há menos de três meses, 8 apresentaram índices baixos ($< 45\%$). Embora a maioria dos pacientes apresentassem índices de avidéz compatíveis com o estágio da infecção toxoplásmica, alguns resultados discordantes foram observados. Os autores sugeriram que estes resultados poderiam, em parte, refletir a limitação da utilização da linfadenopatia como marcador do início da infecção toxoplásmica ou, ainda, a variação da resposta imune dos pacientes frente a infecção com o *T. gondii*. Recentemente, Rossi (1998) descreveu um teste de avidéz para a toxoplasmose com o sistema F.A.S.T. - ELISA, utilizando uma única diluição das amostras de soros. Os índices de avidéz para 25 amostras obtidas durante os dois primeiros meses após o início dos sintomas clínicos, de pacientes com toxoplasmose aguda (diagnóstico baseado na detecção de anticorpos IgM por IFI e ELISA, mais soroconversão e/ou aumento ≥ 4 vezes no título de IgG por IFI) variaram de 10% a 40% (média = 25%), enquanto que para 25 amostras de soros de indivíduos com toxoplasmose crônica, os índices variaram de 58% a 94% (média = 73%).

Variações nos índices que indicam baixa e alta avidéz de anticorpos IgG são esperadas e estão provavelmente relacionadas com diversos fatores, incluindo a heterogeneidade dos pacientes estudados; a condição do sistema imune dos pacientes na época em que houve a coleta de sangue; a época da coleta em relação à infecção com o parasita; as propriedades intrínsecas das técnicas; a preparação antigênica usada no teste; o tipo e concentração do agente empregado para romper as ligações de hidrogênio e o método utilizado para o cálculo da avidéz dos anticorpos. Em nosso estudo, foram utilizados dois testes com diferentes metodologias para avaliar a avidéz da IgG anti-*T.gondii*. Um dos testes foi baseado na titulação de cada amostra de soro e cálculo dos títulos, com e sem o tratamento com uréia, em relação a um valor de “cut-off” definido, tal qual proposto por Jenum *et al.* (1997), utilizando o “kit” Platelia Toxo-IgG. No outro teste, foi utilizada uma única diluição da amostra de soro e as absorbâncias das reações determinadas na ausência e na presença de uréia foram comparadas, de acordo com a técnica FAST-ELISA proposta por Rossi (1998). Todos os pacientes com toxoplasmose aguda apresentaram índices compatíveis com fase aguda, com a técnica utilizando o “kit” Platelia. Quatro pacientes apresentaram índices de avidéz situados na faixa duvidosa, com a técnica FAST-ELISA. Com relação aos pacientes com toxoplasmose crônica, apenas um paciente apresentou índice

de avidéz não compatível com fase crônica, com a técnica de titulação das amostras de soros. Tais resultados concordam com a maioria dos estudos anteriores, demonstrando que as técnicas baseadas na determinação da avidéz da IgG podem ser bastante úteis no diagnóstico da toxoplasmose, tanto da infecção aguda quanto da infecção crônica. O método baseado na titulação das amostras de soros demonstrou ser mais sensível para o diagnóstico da infecção recente.

Os nossos resultados, em conjunto com resultados de estudos anteriores, mostraram que todos os marcadores sorológicos da toxoplasmose aguda, aqui analisados, possuem limitações significativas, pois demonstrou-se que os anticorpos específicos IgA e IgE podem, em alguns casos, persistir por um ano ou mais após a infecção com o parasita, bem como o padrão agudo no teste AC/HS. Nosso estudo sugere que a determinação da avidéz dos anticorpos IgG anti-*T. gondii*, principalmente pelo método de titulação das amostras de soros, pode ser bastante útil para um diagnóstico mais confiável do estágio em que se encontra a infecção, em pacientes apresentando níveis significativos de anticorpos IgM.

5. CONCLUSÕES

A persistência dos anticorpos IgM por longo tempo após a infecção com o parasita e a elevada ocorrência de altos títulos de anticorpos IgG anti-*T.gondii* em pessoas saudáveis têm dificultado a interpretação dos resultados dos testes sorológicos para o diagnóstico da toxoplasmose aguda. Em consequência, nos últimos anos, diversos trabalhos têm estudado a importância de outros possíveis marcadores sorológicos para o diagnóstico da toxoplasmose aguda adquirida, tais como anticorpos específicos das classes IgA e IgE, o teste de aglutinação diferencial AC/HS e a determinação da avididade de anticorpos IgG. Nosso estudo teve como objetivo avaliar esses novos marcadores.

Nosso estudo nos permite chegar às seguintes conclusões:

- Todos os marcadores aqui analisados possuem limitações significativas, devido à persistência de anticorpos específicos IgA e IgE anti-*T. gondii* por um ano ou mais, bem como o padrão agudo no teste de aglutinação diferencial AC/HS, comprovados em vários pacientes com toxoplasmose crônica.
- A determinação da avididade de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, principalmente através do método de titulação das amostras de soros, pode permitir um diagnóstico mais confiável do estágio em que se encontra a infecção, nos pacientes que apresentam níveis significativos de anticorpos IgM.

6. SUMMARY

The diagnosis of acute acquired toxoplasmosis has been frequently based on the detection of specific IgM antibodies and on the demonstration of a significant increase in specific IgG antibodies titers. However, the prevalence of high *Toxoplasma* IgG antibody titers among normal subjects and the sustained persistence, in some persons, of specific IgM antibodies have complicated the interpretation of serological tests when acute toxoplasmosis is suspected. In our first study, we report the detection of specific IgA antibodies and the determination of the avidity of *Toxoplasma*-specific IgG in sequential serum samples from a patient exhibiting significant levels of specific IgM antibodies for seven years after the onset of the clinical symptoms of toxoplasmosis. Anti-*T.gondii* IgA was quantified by an antibody capture ELISA (ETI-TOXOK-A). The patient still had a positive IgA result (> 10 AU/ml) in a serum sample taken two years after the beginning of the clinical manifestations. The IgG avidity was determined by a single serum dilution method, using the Falcon assay screening test (F.A.S.T.[®]) – ELISA system. Avidity indices compatible with an acute infection were found only in serum samples taken during the first five months after the onset of the clinical symptoms. The purpose of the second study was to assess the usefulness of newer serological markers, such as the detection of specific IgA and IgE antibodies, the differential agglutination (AC/HS) test using formalin and acetone-fixed tachyzoites of *T. gondii* and the determination of the avidity of *Toxoplasma*-specific IgG, in the diagnosis of acute acquired toxoplasmosis. Sixty-four serum samples, 31 from patients with a recently acquired *Toxoplasma* infection and 33 from patients with chronic toxoplasmosis, were tested. Anti-*T. gondii* IgA was measured by two antibody capture ELISA tests (ETI-TOXOK-A and Platelia[®] Toxo IgA) and an automated direct ELISA (IMx[®] Toxo IgA). The three kits detected antibody levels compatible with a recent infection in serum samples of all patients with acute toxoplasmosis. On the other hand, the analysis of serum samples from 33 patients with chronic toxoplasmosis revealed that significant levels of IgA may be detected with a high frequency by the three kits during the chronic phase of infection. IgE antibodies detected by ISAGA were present in 26 (84%) of 31 patients with acute toxoplasmosis and in serum samples from two subjects with chronic infection taken more than one year after the beginning of the clinical symptoms of infection. Twenty-nine (94%) of 31 patients with a recent *Toxoplasma* infection and 15 (45%) of 33 subjects with chronic toxoplasmosis had an AC/HS pattern compatible with acute toxoplasmosis. The avidity of *Toxoplasma* IgG was

evaluated by two methods. One method was based on titration of each serum sample and calculation of the titers, in the absence and presence of urea, in relation to a defined cut-off value. In the other method, a single serum dilution was used and the absorbances of the reactions in the presence and absence of urea were compared. The titration method was more sensitive for diagnosing a recent primary *Toxoplasma* infection: All 31 serum samples from patients with acute toxoplasmosis had avidity indices compatible with acute toxoplasmosis by the titration method whereas with the single dilution method serum samples from four patients had equivocal results. In the 33 patients with chronic toxoplasmosis, similar results were obtained with the two avidity methods; only one serum sample had a non compatible avidity value with the titration method.

The results obtained in the present study show that the current serological markers used for diagnosing acute acquired toxoplasmosis have significant limitations. Our data suggest that the determination of the avidity of *Toxoplasma*-specific IgG, mainly by the titration method, in patients with detectable IgM antibodies could permit a more efficient diagnosis of the stage of infection by *T. gondii*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.M.A. - Comparative study of methods for the isolation of *Toxoplasma gondii*. **Bull WHO**, **36**: 344-6, 1967.
- AMBROISE-THOMAS, P.; SIMON, J.; BAYARD, M. - Indirect hemagglutination using whole mixed antigen for checking toxoplasmosis immunity and for serodiagnosis of human toxoplasmosis compared to immunofluorescence. **Biomedicine**, **29**: 245-8, 1978.
- ARAUJO, F.G.; BARNETT, E.V.; GENTRY, L.O.; REMINGTON, J.S. - False-positive anti-toxoplasma-fluorescent antibody tests in patients with antinuclear antibodies. **Appl. Microbiol.**, **22**: 270-5, 1971.
- ARAUJO, F.G. & REMINGTON, J.S. - Antigenemia in recently acquired acute toxoplasmosis. **J. Infect. Dis.**, **141**:144-50, 1980.
- ASHBURN, D.; EVANS, R.; SKINNER, L.J.; CHATTERTON, M.W.; JOSS, A.W.L.; HO-YEN, D.O. - Comparison of relative uses of commercial assays for *Toxoplasma gondii* IgM antibodies. **J. Clin. Pathol.**, **45**: 483-6, 1992.
- ASHBURN, D.; JOSS, A.W.L.; PENNINGTON, T.H.; HO-YEN, D. O. - Specificity and usefulness of an IgE immunosorbent agglutination assay for toxoplasmosis. **J. Clin. Pathol.**, **48**: 64-9, 1995.
- ASHFORD, D.A., BADARÓ, R.; EULALIO, C.; FREIRE, M.; MIRANDA, C.; ZALLIS, M.G.; DAVID, J.R. - Studies on the control of visceral leishmaniasis: validation of the Falcon assay screening test-enzyme-linked immunosorbent assay (FAST-ELISA) for field diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **48**: 1-8, 1993.
- BERTOZZI, L.C.; SUZUKI, L.A.; ROSSI, C.L. - Serological diagnosis of toxoplasmosis: usefulness of IgA detection and IgG avidity determination in a patient with a persistent IgM antibody response to *Toxoplasma gondii*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.**, **41**: 175-7, 1999.

- BESSIÈRES, M.H.; ROQUES, C.; BERREBI, A.; BARRE, V.; CAZAUX, M.; SÉGUELA, J.P. - IgA antibody response during acquired and congenital toxoplasmosis. **J. Clin. Pathol.**, **45**: 605-8, 1992.
- BHOPALE, G.M.; NAIK, S.R.; BHAVE, G.G.; NAIK, S.S.; GOGATE, A. - Assessment of enzyme-linked immunosorbent assay based diagnostic kits (Toxokit-G and Toxokit-M) for the detection of IgG and IgM antibodies to *Toxoplasma gondii* in human serum. **Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.**, **20**: 309-14, 1997.
- BLACKBURN, N.K.; BESSELAAR, T.G.; SHOUB, B.D.; O'CONNELL, K.F. - Differentiation of primary cytomegalovirus infection from reactivation using the urea denaturation test for measuring antibody avidity. **J. Med. Virol.**, **33**: 6-9, 1991.
- BOBIC, B.; SIBALIC, D.; DJURKOVIC-DJAKOVIC, O. - High levels of IgM antibodies specific for *Toxoplasma gondii* in pregnancy 12 years after primary *Toxoplasma* infection. **Gynecol. Obstet. Invest.**, **31**: 182-4, 1991.
- BROOKS, R.G.; McCABE, R.E.; REMINGTON, J.S. - Role of serology in the diagnosis of toxoplasmic lymphadenopathy. **Rev. Infect. Dis.**, **9**: 1055-62, 1987.
- CAMARGO, M.E.; da SILVA, S.M.; LESER, P.G. ; GRANATO, C.H. - Avidéz de anticorpos IgG específicos como marcadores de infecção primária recente pelo *Toxoplasma gondii*. **Rev. Inst. Trop. São Paulo**, **33**: 213-8, 1991.
- CAMARGO, M.E.; FERREIRA, A.W.; MINEO, J.R.; TAKIGUTI, C.K.; NAKAHARA, O. S. - Immunoglobulin G and immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays and defined toxoplasmosis serological patterns. **Infect. Immun.**, **21**: 55-8, 1978.
- CAMARGO, M.E. & LESER, P.G. - Diagnostic information from serological tests in human toxoplasmosis. II Evolutive study of antibodies and serological patterns in acquired toxoplasmosis, as detected by hemagglutination, complement fixation, IgG and IgM immunofluorescence tests. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **18**: 227-38, 1976.

- CAMARGO, M.E.; LESER, P.G.; ROCCA, A. - Rheumatoid factor as cause for false-positive IgM anti-*Toxoplasma*-fluorescent tests. A technique for specific results. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **33**: 310-3, 1972.
- CHANG, C.; STULBERG, C.; BOLLINGER, R.O.; WALKER, R.; BROUGH, A.J. - Isolation of *Toxoplasma gondii* in tissue culture. **J. Pediatr.**, **81**: 790-7, 1972.
- COUVREUR, J. & DESMONTS, G. - Toxoplasmosis. In: MACLEAD, C., ed. - **Parasitic infections of pregnancy and the newborn**. Oxford University Press, New York, 1988, p. 112-42.
- COZON, G.J.N.; FERRANDIZ, J.; NEBHI, H.; WALLON, M.; PEYRON, F. - Estimation of the avidity of immunoglobulin G for routine diagnosis of chronic *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, **17**: 32-6, 1998.
- DANNEMANN, B.R.; VAUGHAN, W.C.; THULLIEZ, P.; REMINGTON, J.S. - Differential agglutination test for diagnosis of recently acquired infection with *Toxoplasma gondii*. **J. Clin. Microbiol.**, **28**: 1928-33, 1990.
- DECOSTER, A.; DARCY, F.; CARON, A.; CAPRON, A. - IgA antibodies against P30 as markers of congenital and acute toxoplasmosis. **Lancet**, **2**: 1104-7, 1988.
- DECOSTER, A.; GONTIER, P.; DEHECQ, E.; DEMORY, J.L.; DUHAMEL, M. - Detection of anti-*Toxoplasma* immunoglobulin A antibodies by Platelia-Toxo IgA directed against P30 and by IMx Toxo IgA for diagnosis of acquired and congenital toxoplasmosis. **J. Clin. Microbiol.**, **33**: 2206-8, 1995.
- DEL BONO, V.; CANESSA, A.; BRUZZI, P.; FIORELLI, M.A.; TERRAGNA, A. - Significance of specific immunoglobulin M in the chronological diagnosis of 38 cases of toxoplasmic lymphadenopathy. **J. Clin. Microbiol.**, **27**: 2133-5, 1989.
- DEROUIN, F.; MAZERON, M.C.; GARIN, Y.J.F. - Comparative study of tissue culture and mouse inoculation methods for demonstration of *Toxoplasma gondii*. **J. Clin. Microbiol.**, **25**: 1597-600, 1987.

- DESMONTS, G. & COUVREUR, J. - Congenital toxoplasmosis: A prospective study of 378 pregnancies. **N. Engl. J. Med.**, **290**: 1110-6, 1974a.
- DESMONTS, G. & COUVREUR, J. - L'isolament du parasite dans la toxoplasmose congénitale: Interêt pratique et théorique. **Arch. Franç. Péd.**, **31**: 157-66, 1974b.
- DESMONTS, G. & COUVREUR, J. - Toxoplasmosis in pregnancy and its transmission to the fetus. **Bull. N.Y. Acad. Med.**, **50**: 146-59, 1974c.
- DESMONTS, G.; NAOT, Y.; REMINGTON, J.S. - Immunoglobulin M immunosorbent agglutination assay for diagnosis of infectious diseases: diagnosis of acute congenital and acquired *Toxoplasma* infections. **J. Clin. Microbiol.**, **14**: 486-91, 1981.
- DESMONTS, G. & REMINGTON, J.S. - Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. **J. Clin. Microbiol.**, **11**: 562-8, 1980.
- DUERMEYER, W.; WIELAARD, F.; VAN DER VEEN, J. - A new principle for the detection of specific IgM antibodies applied in an ELISA for hepatitis A. **J. Med. Virol.**, **4**: 25-32, 1979.
- EISEN, H.N. & SISKIND, G.W. - Variations in affinity of antibodies during the immune response. **Biochemistry**, **3**: 996-1008, 1964.
- FRENKEL, J.K. - Toxoplasmose. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R.; DIETZE, R., ed. - **Doenças infecciosas e parasitárias**. Gaunabara-Koogan, Rio de Janeiro, 1991, p. 734-49.
- FULTON, J.D. & TURK, J.K. - Direct agglutination test for *Toxoplasma gondii*. **Lancet**, **2**: 1068-9, 1959.
- GORGIEVSKI-HRISOHO, M.; GERMANN, D.; MATTER, L. - Diagnostic implications of kinetics of immunoglobulin M and A antibody responses to *Toxoplasma gondii*. **J. Clin. Microbiol.**, **34**: 1506-11, 1996.

- GRAY, J.J. - Avidity of EBV VCA-specific antibodies: distinction between recent primary infection, past infection and reactivation. **J. Virol. Methods**, **52**: 95-104, 1995.
- HANCOCK, K. & TSANG, V.C.W. - Development and optimization of the FAST-ELISA for detecting antibodies to *Schistosoma mansoni*. **Immunol. Methods**, **92**: 167-76, 1986.
- HASHIDO, M.; INOUE, S.; KAWANA, T. - Differentiation of primary from nonprimary genital herpes infections by a herpes simplex virus-specific immunoglobulin G avidity assay. **J. Clin. Microbiol.**, **35**: 1766-8, 1997.
- HEDMAN, K.; LAPPALAINEN, M.; SEPÄLÄ, I.; MÄKELÄ, O. - Recent primary toxoplasma infection indicated by low avidity of specific IgG. **J. Infect. Dis.**, **159**: 736-40, 1989.
- HEDMAN, K. & ROUSSEAU, S.A. - Measurement of avidity of specific IgG for verification of recent primary rubella. **J. Med. Virol.**, **27**: 288-92, 1989.
- HEDMAN, K. & SEPPALA, I. - Recent rubella virus infection indicated by a low avidity of specific IgG. **J. Clin. Immunol.**, **8**: 214-21, 1988.
- HILLYER, G.V.M. & SOLER DES GALANES, M. - Initial feasibility studies of the FAST-ELISA for the immunodiagnosis of fascioliasis. **J. Parasitol.**, **77**: 362-5, 1991.
- HOLLIMAN, R.E.; RAYMOND, R.; RENTON, N.; JOHNSON, J.D. - The diagnosis of toxoplasmosis using IgG avidity. **Epidemiol. Infect.**, **112**: 399-408, 1994.
- HUSKINSON, J.; THULLIEZ, P.; REMINGTON, J.S. - *Toxoplasma* antigens recognized by human immunoglobulin A antibodies. **J. Clin. Microbiol.**, **28**: 2632-6, 1990.
- HYDE, B.; BARNET, E.V.; REMINGTON, J.S. - Method for differentiation of non-specific from specific toxoplasma IgM immunofluorescent antibodies in patients with rheumatoid factor. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, **148**: 1184-8, 1975.
- JACOBS, L. & LUNDE, M. - A hemagglutination test for toxoplasmosis. **J. Parasitol.**, **43**: 308-14, 1957.

- JENUM, P.A.; STRAY-PEDERSEN, B.; GUNDERSEN, A. - Improved diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in early pregnancy by determination of antitoxoplasma immunoglobulin G avidity. **J. Clin. Microbiol.**, **35**: 1972-7, 1997.
- JONES, J.L.; HANSON, D.L.; CHU, S.Y.; CIESIELSKI, C.A.; KAPLAN, J.E.; WARD, J.W.; NAVIN, T.R. & THE ADULT/ADOLESCENT SPECTRUM OF DISEASE GROUP. - Toxoplasmic encephalitis in HIV-infected persons: risk factors and trends. **AIDS**, **10**: 1393-9, 1996.
- JONES, T.C.; KEAN, B.H.; KIMBALL, A.C. - Acquired toxoplasmosis. **NY State J. Med.**, **69**: 2237-42, 1969.
- JOYSON, D.H.; PAYNE, R.A.; RAWAL, B.K. - Potential role of IgG avidity for diagnosing toxoplasmosis. **J. Clin. Pathol.**, **43**: 375-9, 1990.
- KANGRO, H.O.; MANZOOR, S.; HARPER, D.R. - Antibody avidity following varicella-zoster virus infections. **J. Med. Virol.**, **33**: 100-5, 1991.
- KEAN, B.H. - Clinical toxoplasmosis -50 years. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **66**: 549-71, 1972.
- KRICK, J.A. & REMINGTON, J.S. - Toxoplasmosis in the adult- an overview. **N. Engl. J. Med.**, **298**: 550-3, 1978.
- LAPPALAINEN, M.; KOSKELA, P.; MARJALEENA, K.; ÄMMÄLÄ, P.; HIILESMAA, V.; TERAMO, K.; RAIVIO, K.O. ; REMINGTON, J.S.; HEDMAN, K. - Toxoplasmosis acquired during pregnancy: improved serodiagnosis based on avidity of IgG. **J. Infect. Dis.**, **167**: 691-7, 1993.
- LE FICHOUX, Y.; MARTY, P. ; CHAN, H. - Les IgA sériques spécifiques dans le diagnostic de la toxoplasmose. **Ann. Pédiatr. (Paris)**, **34**: 375-9, 1987.
- LEINIKKI, P.O.; SHEKARCHI, I.; DORSETT, P.; SEVER, J.L. - Determination of virus-specific IgM antibodies by using ELISA. Elimination of false-positive results with protein-A-Sepharose adsorption and subsequent IgM antibody assay. **J. Lab. Clin. Med.**, **92**: 849-57, 1978.

- LIESENFELD, O.; PRESS, C.; MONTOYA, J.G.; GILL, R.; ISAAC-RENTON, J.L.; HEDMAN, K.; REMINGTON, J.S. - False-positive results in immunoglobulin M (IgM) *Toxoplasma* antibody tests and importance of confirmatory testing: the Platelia Toxo IgM test. **J. Clin. Microbiol.**, **35**: 174-8, 1997.
- LIESENFELD, O.; PRESS, C.; FLANDERS, R.; RAMIREZ, R.; REMINGTON, J.S. - Study of Abbott Toxo IMx System for detection of immunoglobulin G and immunoglobulin M *Toxoplasma* antibodies: value of confirmatory testing for diagnosis of acute toxoplasmosis. **J. Clin. Microbiol.**, **34**: 2526-30, 1996.
- LUFT, B.J. & REMINGTON, J.S. - Toxoplasmosis of the central nervous system. In: REMINGTON, J.S. & SWARTZ, M.N., ed. - **Curr. Clin. Top. Infect. Dis.**, New York, 1985, p. 315-58.
- MACÊDO, V. - Toxoplasmose. In: CASTRO, L.P.; CUNHA, A.S.; REZENDE, J.F., ed. - **Protozooses humanas**. Fundação BYK, São Paulo, 1994, p. 153-170.
- McCABE, R.E.; BROOKS, R.G.; DORFMAN, R.F. & REMINGTON, J.S. - Clinical spectrum in 107 cases of toxoplasmic lymphadenopathy. **Rev. Infect. Dis.**, **6**: 754-74, 1987.
- MELO, F.G. & ROSSI, C.L. - Dot enzyme-linked immunosorbent assay (DOT-ELISA) for evaluating IgG antibody avidity in toxoplasmosis. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **39**: 235-6, 1997.
- MONTOYA, J.G. & REMINGTON, J.S. - Studies on serodiagnosis of toxoplasmic lymphadenitis. **Clin. Infect. Dis.**, **20**: 781-9, 1995.
- NAOT, Y. & REMINGTON, J.S. - An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of IgM antibodies to *Toxoplasma gondii*: use for diagnosis of acute acquired toxoplasmosis. **J. Infect. Dis.**, **142**: 757-66, 1980.
- PARTANEN, P.; TURUNEN, H.J.; PAASIVUO, R.T.A.; LEINIKKI, P.O. - Immunoblot analysis of *Toxoplasma gondii* antigens by human immunoglobulins G, M and A antibodies at different stages of infection. **J. Clin. Microbiol.**, **20**: 133-5, 1984.

- PARTEL, C.D. & ROSSI, C.L. - A rapid, quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of Chagas' disease. **Immunol. Invest.**, **27**: 89-96, 1998.
- PATEL, B.; YOUNG, Y.; DUFFY, K.; TANNER, R.P.; JOHNSON, J.; HOLLIMAN, R.E. - Immunoglobulin A detection and the investigation of clinical toxoplasmosis. **J. Med. Microbiol.**, **38**: 286-92, 1993.
- PINON, J.M.; TOUBAS, D.; MARX, C.; MOUGEOT, G.; BONNIN, A.; BONHOMME, A.; VILLAUME, M.; FOUDRINIER, F.; LEPAN, H. - Detection of specific immunoglobulin E in patients with toxoplasmosis. **J. Clin. Microbiol.**, **28**: 1739-43, 1990.
- PUJOL, M.; MOREL, C. & MALBRUNY, B. - Intérêt de la recherche des IgA dans le diagnostic de la toxoplasmose. **Path. Biol.**, **37**: 893-6, 1989.
- RAFATY, F.M. - Cervical adenopathy secondary to toxoplasmosis. **Arch. Otolaryngol.**, **103** : 547-9, 1977.
- RAMÍREZ, M.L.G.O.; ALVARADO, V.V.O.; GUTIERREZ, G.V.O.; GONZÁLEZ, O.J.O.; COSIO, C.G.O.; SANDOVAL, M.V. - Prevalence of IgG and IgM anti-*Toxoplasma* antibodies in patients with HIV and acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **30** : 465-7, 1997.
- REMYNGTON, J.S. & DESMONTES, G. - Toxoplasmosis. In: REMINGTON, J.S. & KLEIN, J. O., ed. - **Infectious diseases of the fetus and newborn infant**. WB Saunders Company. Philadelphia, 1990, p. 89-195.
- REMYNGTON, J.S. & McLEOD, R. - Toxoplasmosis. In: BRAUDE, A.I., DAVIS, C.E.; FIERES, J., ed. - **Infectious diseases and medical microbiology**. WB Saunders Company, Philadelphia, 1986, p. 1521-35.
- REMYNGTON, J.S.; McLEOD, R.; DESMONTES, G. - Toxoplasmosis. In: REMINGTON, J.S.; KLEIN, J. O., ed. - **Infectious diseases of the fetus and newborn infant**. WB Saunders Company. Philadelphia, 1995, p. 140-243.

- REMYINGTON, J.S.; MILLER, M.J.; BROWNLEE, I. - IgM antibodies in acute toxoplasmosis. II. Prevalence and significance in acquired cases. **J. Lab. Clin. Med.**, 71: 855-66, 1968.
- ROSSI, C.L. - A simple, rapid enzyme-linked immunosorbent assay for evaluating immunoglobulin G antibody avidity in toxoplasmosis. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, 30: 25-30, 1998.
- SABIN, A.B. & FELDMAN, H.A. - Dyes as microchemical indicator of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). **Science**, 108: 660-3, 1948.
- SCHEINBERG, D.A.; PAN, X.; WILSNACK, R.; STRAND, M. - Rapid screening of monoclonal antibodies: new "Microstick" radioimmunoassay. **J. Immunol. Methods**, 58: 285-92, 1983.
- SENET, J.P.; ROBERT, R.; MAURAS, G. - Diagnostic de lá toxoplasmose par hemagglutination indirecte. II. Intérêt de lá fixation de l'antigène mixte en présence de glutaraldéhyde dans le diagnostic précoce de l'affection. **Biomedicine**, 25: 212-4, 1976.
- STEPICK-BIEK, P.; THULLIEZ, P.; ARAUJO, F.G.; REMINGTON, J.S. - IgA antibodies for diagnosis of acute congenital and acquired toxoplasmosis. **J. Infect. Dis.**, 162: 270-3, 1990.
- SUZUKI, Y.; THULLIEZ, P.; DESMONTS, G.; REMINGTON, J.S. - Antigen(s) responsible for immunoglobulin G responses specific for the acute stage of *Toxoplasma* infection in humans. **J. Clin. Microbiol.**, 26: 901-5, 1988.
- TAKAHASHI, E.E.H. & ROSSI, C.L. - IgM and IgA antibodies responses in 12 cases of human acquired toxoplasmosis. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 39: 327-31, 1997.
- TAKAHASHI, E.E.H. & ROSSI, C.L. - Use of three immunological techniques for the detection of *Toxoplasma* sp IgA antibodies in acute toxoplasmosis. **J. Clin. Pathol.**, 47: 1101-4, 1994.

- THOMAS, H.I.J. - Relative functional affinity of specific anti-core IgG in different categories of hepatitis B virus infection. **J. Med. Virol.**, **51**: 189-97, 1997.
- THOMAS, H.I.J. & MORGAN-CAPNER, P. - Rubella-specific IgG subclass avidity and its role in differentiation between primary rubella and rubella reinfection. **Epidemiol. Infect.**, **101**: 501-8, 1988.
- THULLIEZ, P.; REMINGTON, J.S.; SANTORO, F.; OVLAQUE, G.; SHARMA, S.O.; DESMONTS, G. - Une nouvelle réaction d'agglutination pour le diagnostic du stade évolutif de la toxoplasmose acquise. **Path. Biol.**, **34**: 173-7, 1986.
- TURUNEN, H.J.; VUORIO, K.A.; LEINIKKI, P.O. - Determination of IgG, IgM and IgA antibody responses in human toxoplasmosis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Scand. J. Infect. Dis.**, **15**: 307-11, 1983.
- VAN KNAPPEN, F. & PANGGABEAN, S. O. - Detection of circulating antigen during acute infections with *Toxoplasma gondii* by enzyme-linked immunosorbent assay. **J. Clin. Microbiol.**, **6**: 545-7, 1977.
- VAN LOON, A.M.; VAN DER LOGT, J.T.M.; HEESSEN, F.W.A.; VAN DER VEEN, J. - Enzyme-linked immunosorbent assay that uses labeled antigen for detection of immunoglobulin M and A antibodies in toxoplasmosis: comparison with indirect immunofluorescence and double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. **J. Clin. Microbiol.**, **17**: 997-1004, 1983.
- VERHOFSTEDÉ, C.; VAN RENTERGHEM, L.; PLUM, J. - Comparison of six commercial enzyme linked immunosorbent assays for detecting IgM antibodies against *Toxoplasma gondii*. **J. Clin. Pathol.**, **42**: 1285-90, 1989.
- VOLLER, A.; BIDWELL, D.E.; BARTLETT, A.; FLECK, D.G.; PERKINS, M.; OLADEHIN, B. - A microplate enzyme-immunoassay for toxoplasma antibody. **J. Clin. Pathol.**, **29**: 150-3, 1976.
- WALLS, K.W. - Toxoplasmosis. In: BARLOWS, A.; HAUSLER, Jr, W.J.; OHASHI, M.; TURANO, A., ed. - **Laboratory diagnosis of infectious diseases: principles and practice, vol.1 : Bacterial, mycotic and parasitic diseases**. Springer-Verlag, New York, 1988, p. 998-1017.

- WALTON, B.C.; BENCHOFF, B.M.; BROOKS, W.H. - Comparison of the indirect fluorescent antibody test and methylene blue dye test for detecting antibodies to *Toxoplasma gondii*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **15**: 149-52, 1966.
- WARD, K.N.; DHALIWAL, W.; ASHWORTH, K.L.; CLUTTERBUCK, E.J.; TEO, C.G. - Measurement of antibody avidity for hepatitis C virus distinguishes primary antibody responses from passively acquired antibody. **J. Med. Virol.**, **43**: 367-72, 1994.
- WARD, K.N.; GRAY, J.J.; JOSLIN, M.E.; SHELDON, M.J. - Avidity of IgG antibodies to human herpesvirus-6 distinguishes primary from recurrent infection in organ transplant recipients and excludes cross-reactivity with other herpesviruses. **J. Med. Virol.**, **39**: 44-9, 1993.
- WAREN, J. & SABIN, A.B. - Complement fixation in toxoplasmic infection. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, **51**: 11-4, 1942.
- WELCH, P.C.; MASUR, H.; JONES, T.C.; REMINGTON, J.S. - Serologic diagnosis of acute lymphadenopathic toxoplasmosis. **J. Infect. Dis.**, **142**: 256-64, 1980.
- WERBLIN, T.P.; KIM, Y.T.; QUAGLIATA, F.; SISKIND, G.W. - Studies on the control of antibody synthesis. III. Changes in heterogeneity of antibody affinity during the course of the immune response. **Immunology**, **24**: 477-92, 1973.
- WILSON, C.B.; REMINGTON, J.S.; STAGNO, S.; REYNOLDS, D.W. -Development of adverse sequelae in children born with subclinical congenital *Toxoplasma* infection. **Pediatric**, **66**: 764-74, 1980.
- WONG, S.Y.; HAJDU, M.P.; RAMIREZ, R.; THULLIEZ, P.; McLEOD, R.; REMINGTON, J.S. - Role of specific immunoglobulin E in diagnosis of acute *Toxoplasma* infection and toxoplasmosis. **J. Clin. Microbiol.**, **31**: 2952-9, 1993.
- WREGHITT, T.G.; GRAY, J.J.; ALOYISUS, S.; CONTRERAS, M.; BARBARA J.A.J. - Antibody avidity test for recent infection with hepatitis C virus. **Lancet**, **335**: 789, 1990.