

## Fase aguda da infecção por *Toxoplasma gondii*: avaliação do parasitismo sanguíneo e resposta humoral em camundongos isogênicos AS/n

*Toxoplasma gondii* acute infection: estimation of humoral response and blood parasitism in mice AS/n inbred

Thaís Alves da Costa-Silva<sup>1</sup>, Vera Lucia Pereira-Chioccola<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mestre em Ciências. Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas do Serviço de Parasitologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

<sup>2</sup>Doutora em Ciências. Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas do Serviço de Parasitologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

### RESUMO

**Objetivos:** analisar experimentalmente a evolução da resposta imune humoral nas fases aguda e crônica recente da infecção por *Toxoplasma gondii* e sua correlação com o parasitismo sanguíneo. **Métodos:** foram analisados, por 60 dias, 10 camundongos fêmeas da linhagem AS/n infectados, por via oral, com 10 cistos por animal da cepa ME-49 de *Toxoplasma gondii*. As coletas de sangue foram feitas a cada 3-4 dias. O parasitismo sanguíneo foi avaliado pela reação em cadeia da polimerase e os títulos de anticorpos por ensaio imunoenzimático e imunofluorescência indireta. **Resultados:** a reação em cadeia da polimerase foi positiva em amostras com intervalos de aproximadamente 7 dias até o 28º dia, e a seguir, negativas até o 60º dia. Os soros avaliados pela imunofluorescência indireta apresentaram anticorpos IgM após o 7º dia, com pico entre o 18º e 27º dia. Após o primeiro mês os títulos foram baixos até o 60º dia. Anticorpos IgG surgiram no 14º dia e persistiram em altos títulos até o 60º dia. A cinética dos anticorpos IgG, bem como a avididade destes, demonstrou que os níveis de anticorpos aumentaram a partir do 14º dia e as porcentagens de avididade evoluíram com pico máximo após 28 dias, estabelecendo-se então a fase crônica da infecção. **Conclusões:** os dados aqui demonstrados enfatizam que taquizoítos podem estar presentes na circulação sanguínea durante toda a fase aguda da toxoplasmose, mesmo que já se tenha instalado a resposta imune protetora.

**Descritores:** TOXOPLASMA; TOXOPLASMOSE; TOXOPLASMOSE/imunologia; DOENÇAS PARASITÁRIAS/sangue; ANTICORPOS ANTIPROTOZOÁRIOS; ANTÍGENOS DE PROTOZOÁRIOS/sangue; IMUNOGLOBULINA M; IMUNOGLOBULINA G; CAMUNDONGOS; FEMININO; REAÇÃO DE FASE AGUDA; REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.

### ABSTRACT

**Aims:** To analyze experimentally the humoral immune response in acute and recent chronic infections by *Toxoplasma gondii* and its correlation with the blood parasitism. **Methods:** Ten female mice AS/n inbred strain orally infected with 10 cysts per animal from *T. gondii* ME-49 strain were evaluated during 60 days. Blood collections were made in each 3-4 days. Blood parasitism was evaluated by polymerase chain reaction, and antibody titres by enzyme-linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescence. **Results:** Positive polymerase chain reaction was detected around seven day-intervals until the 28<sup>th</sup> day and was negative after the 30<sup>th</sup> day post-infection. Sera assayed by immunofluorescence presented IgM antibodies after the 7<sup>th</sup> day of infection and high titres were found between the 18<sup>th</sup> and 27<sup>th</sup> day. After 30 days, IgM titers were low until the 60<sup>th</sup> day. IgG antibodies were produced around the 14<sup>th</sup> day and were high until the 60<sup>th</sup> day. The avidity and kinetic exhibited by IgG antibody levels increased from the 14<sup>th</sup> day and the avidity percents increased with maximum peak after 28 days, establishing the chronic infection. **Conclusions:** These data emphasize that tachyzoites can be detected in blood during the acute phase of toxoplasmosis, even though the protective immune response was already developed.

**Keywords:** TOXOPLASMA; TOXOPLASMOSIS; TOXOPLASMOSIS/immunology; PARASITIC DISEASES/blood; ANTIBODIES, ANTIPROTOZOAN; ANTIGENS PROTOZOAN/ blood; IMMUNOGLOBULIN M; IMMUNOGLOBULIN G; MICE; FEMALE; ACUTE-PHASE REACTION; POLYMERASE CHAIN REACTION.

#### Endereço para correspondência/Corresponding Author:

VERA LUCIA PEREIRA-CHIOCCOLA  
Laboratório de Parasitologia, Instituto Adolfo Lutz  
Av. Dr. Arnaldo, 351, 8º andar  
CEP 01246-902, São Paulo, SP  
Fone: 55-11-3068-2991 – Fax: 3068-2890  
E-mail: pchioccola@ial.sp.gov.br

## INTRODUÇÃO

*Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) é um parasita intracelular que infecta peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos. A maioria das infecções agudas são assintomáticas e evoluem para infecção crônica. Cerca de 10 a 20% dos casos de infecção humana adquirida são sintomáticos, como os que apresentam a doença ocular ou os pacientes imunossuprimidos que desenvolvem a doença neurológica, ocasionando sérios problemas de saúde pública.<sup>1-3</sup>

Além disso, a infecção aguda é extremamente preocupante em mulheres que se infectam durante a gravidez, pois pode resultar na transmissão vertical para o feto, com graves consequências, como anormalidades neurológicas e retinocoroidite, que podem surgir no decorrer da vida mesmo quando a infecção é subclínica ao nascimento.<sup>4,5</sup> O risco de transmissão ao feto, bem como a severidade da infecção congênita, dependem do período em que a gestante se infectou. A probabilidade de infecção fetal varia de 6% ao final do primeiro trimestre até 72% em torno de 36 semanas de gestação. Contudo, a severidade da infecção é maior em fetos infectados no início da gravidez.

Como somente 5% das mulheres que se infectam apresentam sinais clínicos, o diagnóstico materno requer testes sorológicos precisos que não detectem somente a soroconversão, mas que também estimem o período de infecção, para que se possa correlacionar o risco de transmissão mãe-filho e a severidade da infecção fetal.<sup>3-6</sup> Assim, é de extrema importância que os testes utilizados para avaliar o perfil sorológico de gestantes com suspeita de toxoplasmose aguda sejam precisos e utilizem antígenos de boa qualidade. Em paralelo, estudos que envolvem maior conhecimento do desenvolvimento da infecção por *T. gondii* podem contribuir para o melhor entendimento da infecção e correlacioná-la com os testes sorológicos que devem ser solicitados na suspeita clínica de infecção aguda.

Os modelos de evolução da infecção humana apontam três perfis sorológicos: perfil I (infecção recente, 0 a 8 meses) com alto percentual de anticorpos IgM e IgG de baixa avididade; perfil II (transição, 8 a 24 meses) com decréscimo dos anticorpos IgM e aumento de IgG de alta avididade; e perfil III (infecção latente/crônica, dos 24 meses em diante) com aumento dos anticorpos IgG de alta avididade e IgM ausente ou persistente.<sup>7,8</sup> A interpretação do diagnóstico laboratorial ainda causa controvérsia, principalmente no caso de gestantes.

Assim, com base neste modelo humano de perfis sorológicos, o presente estudo teve como objetivo

analisar experimentalmente a evolução da resposta imune na infecção aguda e crônica recente causada por *T. gondii* em camundongos e a sua correlação com o parasitismo sanguíneo. Os resultados obtidos podem favorecer o entendimento do diagnóstico sorológico da infecção nos grupos de risco.

## MÉTODOS

### Animais experimentais, *Toxoplasma gondii* e antígenos

As cepas RH e ME-49 de *T. gondii* foram mantidas por passagens sucessivas em camundongos da linhagem Swiss. A resposta imune e dos níveis parasitêmicos sanguíneos foram analisadas experimentalmente infectando-se dez camundongos fêmeas da linhagem isogênica AS/n. Taquizoítos da cepa RH foram mantidos em passagens sucessivas por via intraperitoneal com cerca de  $1 \times 10^5$  parasitas por animal. Após quatro dias os animais foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub> e feitas lavagens intraperitoneais com 5 ml de solução estéril de NaCl 0,85% com pH 7,2 em cada animal, para a retirada dos taquizoítos. Os antígenos foram produzidos a partir de taquizoítos coletados do líquido peritoneal, lavados e centrifugados por duas vezes a 1000g (força centrífuga relativa) por 10 min em solução salina tamponada fosfatada (PBS - *phosphate-buffered saline*), pH 7,2. Para ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), o extrato bruto de taquizoítos foi obtido como previamente descrito.<sup>9</sup> Os parasitas foram sonicados (10 ciclos de 1.0 A/min, por 5 min com intervalos de 2 min), dissolvidos em 0,3M de NaCl e determinada a concentração proteica em NanoDrop. Para a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), a concentração de parasitas foi ajustada para  $2 \times 10^7$  células por ml, incubados em formalina tamponada a 2% por 30 min a 37°C, lavados duas vezes em NaCl 0,85% com pH 7,2, centrifugados a 1000g por 10 min e fixados em lâminas de imunofluorescência. Os soros padrões crônicos (controle positivo) foram obtidos de camundongos Swiss previamente infectados por via oral, com 10 cistos por animal da cepa ME-49. Os cistos foram obtidos a partir de macerado de cérebro em 3ml de solução estéril de NaCl 0,85% pH 7,2, obtidos de animais previamente infectados. Os soros padrões normais (controle negativo) foram obtidos de camundongos Swiss normais.

Este estudo foi realizado de acordo com as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto Adolfo Lutz.

## Coleta das amostras e reações sorológicas

O acompanhamento da evolução da resposta imune e dos níveis parasitêmicos dos animais foi realizada por coletas com intervalos de 3 a 4 dias, por secção leve da extremidade da cauda com auxílio de uma pipeta automática<sup>10</sup> do 4º ao 60º dia pós-infecção. Foram coletados cerca de 50µl por animal para obtenção de soro, e outra alíquota em igual volume, mas com anticoagulante EDTA, foi obtida para extração de DNA.

A RIFI foi realizada como descrito anteriormente<sup>11</sup> e determinou a presença ou ausência de anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii*. Os soros foram diluídos de 1:16 a 1: 4096 e ensaiados em duplicata. Na técnica de ELISA, as reações foram realizadas como descrito previamente<sup>9</sup> em microplacas de poliestireno (*flat bottom, low binding*, Corning). Cada orifício foi sensibilizado com o antígeno e incubado com os soros diluídos a 1:50. A revelação da reação ocorreu após a segunda incubação com o anticorpo de cabra anti-IgG murina conjugado a peroxidase (Sigma) e a revelação com o-fenilenodiamina. As absorbâncias foram determinadas em um leitor de ELISA a 492nm. Cada amostra foi testada em duplicata e calculada a média aritmética dos valores após a subtração das absorbâncias da reação controle (branco). A avides de IgG anti-*T. gondii* foi ensaiada como descrito anteriormente<sup>9, 11</sup> usando o teste básico de ELISA. As diferenças foram (1) cada soro foi analisado em quadruplicata, e (2) após uma hora de incubação a 37°C, a primeira fileira foi lavada três vezes com 250µl de uréia 6M em PBS contendo 0,05% Tween 20 para remover os anticorpos de baixa avides. As fileiras controles foram lavadas três vezes com o mesmo tampão sem uréia. Os índices de avides de IgG foram calculados pela fórmula: (valores de densidade óptica em condições dissociativas)/ (valores de densidade óptica do controle, sem uréia) x 100. Em todas as reações foram incluídos dois soros positivos (de camundongos cronicamente infectados com a cepa ME-49) como controle positivo e dois soros negativos como controle negativo. Os valores apresentados no texto dos Resultados e nas legendas das Figuras representam as médias das absorbâncias (em ELISA) ou porcentagens (teste de avides) dos soros de 10 camundongos.

## Extração de DNA e reação em cadeia da polimerase

As extrações de DNA foram realizadas em taquizoítos peritoneais (controle positivo) e em amostras de sangue, a fim de se determinar os níveis parasitêmicos. As amostras foram lisadas 30 minutos

a 56°C na presença de um tampão contendo 100µg/ml de Proteinase K; 50mM de Tris-HCl pH 8,0; 25mM de EDTA; 2% de SDS. As extrações foram realizadas pelo método fenol-clorofórmio-isopropanol<sup>12</sup> e, ao final, o DNA purificado foi dissolvido em água ultra pura. O grau de pureza das amostras foi determinado pela correlação entre as DO 260 e 280nm em NanoDrop.<sup>12</sup> As reações de amplificação foram realizadas com um kit GoTaq Green Master Mix (Promega) contendo 2x GoTaq Green, em tampão (pH 8,5), 400µM de dATP, 400 de µM dGTP, 400µM de CTP, 400µM de dTTP e 3mM de MgCl<sub>2</sub>. Em cada teste contendo 25µl foram adicionados 5µl de DNA, 50pmols de cada iniciador, 12,5µl do GoTaq Green num volume final completado com água Milli-Q autoclavada. Os iniciadores utilizados foram B22 e B23 que amplificam uma sequência de 115 pares de bases de uma região repetitiva do gene B1 de *T. gondii*.<sup>13</sup> As amplificações foram realizadas em um termociclador (LongGene) e consistiram de um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 5 min, uma segunda etapa com 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento a 62°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min. Após essa etapa, o processo foi finalizado por um ciclo final de extensão a 72°C por 5 min.<sup>11</sup> Em cada procedimento foram adicionados um controle positivo a partir de DNA extraído de taquizoítos e um controle negativo (água).

## RESULTADOS

A evolução da resposta imune e do parasitismo sanguíneo foram avaliados analisando-se por 60 dias camundongos AS/n infectados com da cepa ME-49. A presença de taquizoítos no sangue durante as fases aguda e crônica recente da infecção foi avaliada por reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostras coletadas com intervalos de 3-4 dias. Como ilustração, na Figura 1A observa-se a cinética de dois camundongos do grupo. No primeiro animal, taquizoítos foram detectados nos 7º, 14º, 21º e 28º dia pós-infecção. No segundo, no 11º, 18º, 25º e 28º dias. Resultados similares foram observados nos outros animais do grupo. Normalmente, os parasitas foram detectados somente em amostras com intervalos de aproximadamente 3-7 dias. Amostras a partir do 29º foram sempre negativas (dados não mostrados).

Paralelamente, a evolução da resposta imune também foi avaliada. Os soros obtidos foram inicialmente testados pela RIFI para determinar os níveis de anticorpos IgM e IgG. Como mostra a Figura 1B, a produção dos anticorpos IgM iniciou-se em torno do 7º dia pós-infecção (1: 16) com pico entre o 18º ao 27º dia (1:1024). A partir do 1º mês os títulos

caíram (1:256) e se mantiveram presentes até o final do experimento (1:16). A produção de anticorpos IgG iniciou-se em torno do 14º dia (1:16) e evoluiu até o final da análise (1:4096).

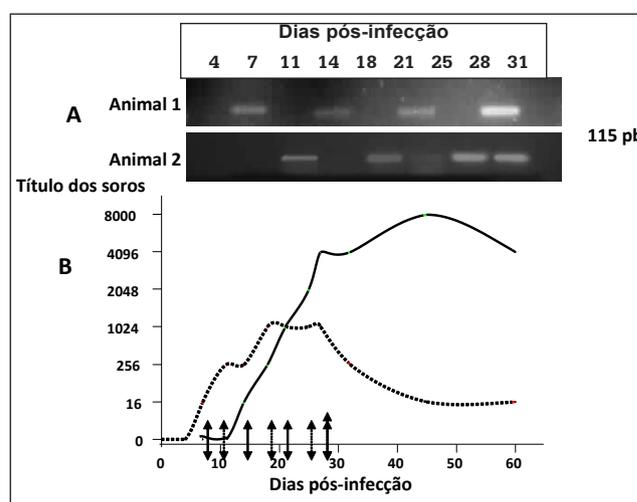
A cinética de avides dos anticorpos IgG foi avaliada por ELISA e pelo teste de avides. Anticorpos IgG produzidos durante o 14º e 21º dia foram de baixa avides (até 25%). A seguir, as porcentagens de avides evoluíram com pico máximo após 28 dias, quando a capacidade de avides ao antígeno foi de 75%, estabelecendo-se então a fase crônica da infecção (Figura 2).

## DISCUSSÃO

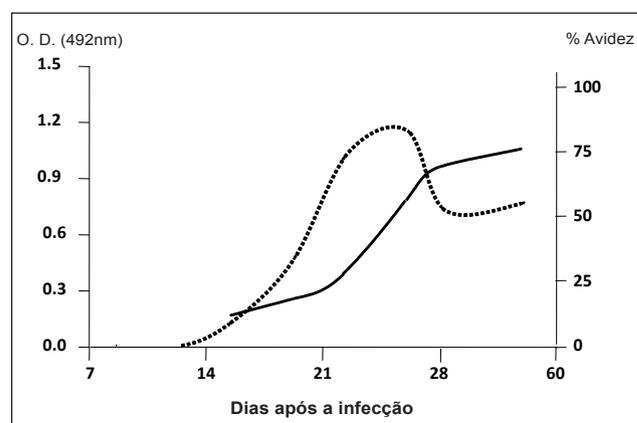
A característica da infecção por *T. gondii* é o desenvolvimento de resposta imune que propicia a proteção do hospedeiro, evitando, assim, o rápido desenvolvimento de taquizoítos e, conseqüentemente, prevenindo a infecção severa. Dessa forma, a resposta imune anti-*T. gondii* é normalmente branda, pois não desencadeia significantes mudanças imunopatológicas em indivíduos normais, resultando em sintomas leves, como febre e linfadenopatia<sup>14-16</sup>. Assim, a infecção aguda nos grupos de risco, como nas gestantes, geralmente é inócua, mas pode causar sérios danos ao feto. Estudos que esclareçam alguns pontos da infecção por *T. gondii* no modelo experimental podem cooperar com os estudos envolvendo antígenos e com os diagnósticos clínico e laboratorial.

A detecção de taquizoítos na corrente sanguínea por métodos parasitológicos convencionais, como o exame microscópico direto ou cultura, é inviável, pelas características do ciclo biológico de *T. gondii*, dificultando o conhecimento da sua cinética na corrente sanguínea “*in vivo*”. O desenvolvimento dos métodos moleculares, como a PCR, facilitou a demonstração do parasitismo tissular em diferentes órgãos durante a fase aguda da infecção.<sup>17,18</sup> Em um estudo prévio verificou-se que taquizoítos são observados diariamente no sangue de camundongos AS/n infectados com a cepa RH, altamente virulenta, do genótipo I.<sup>17</sup> Assim, elegemos esta linhagem de camundongos por ser suscetível, o que facilitaria a análise dos dados. Os animais foram infectados com a cepa ME-49, genótipo II,<sup>19</sup> por ser menos virulenta, facilitando a instalação da fase crônica da infecção, pois os parasitas são facilmente encistados no cérebro dos animais.

Os resultados obtidos por PCR sugeriram que os parasitas foram liberados na circulação sanguínea em intervalos médios de 5 a 7 dias, até que se instalasse completamente a resposta imune protetora. Taquizoítos foram detectados até o 28º dia pós infecção, quando os



**Figura 1.** Cinética de taquizoítos sanguíneos e a evolução dos níveis de IgM e IgG específicas durante a infecção por *Toxoplasma gondii*. Um grupo de 10 camundongos fêmeas AS/n foi infectado, por via oral, com 10 cistos da cepa ME-49. Amostras de sangue foram coletadas a cada 3-4 dias durante 60 dias pós-infecção. O Painel A mostra os níveis parasitêmicos em dois camundongos do grupo (Animal 1 e Animal 2), que foi estimada por PCR. Os produtos amplificados de 115 pb foram submetidos à eletroforese em gel 2% agarose. O Painel B mostra os níveis de anticorpos IgM (linha pontilhada) e IgG (linha contínua). Os títulos de anticorpos foram determinados pela RIFI durante a evolução da infecção. As flechas solidas (Animal 1) e pontilhadas (Animal 2) indicadas no eixo X representam os dias em que foram detectados parasitas no sangue pela PCR.



**Figura 2.** Evolução dos níveis de avides dos anticorpos IgG. Soros de 10 camundongos fêmeas AS/n infectados por via oral com 10 cistos de *Toxoplasma gondii* da cepa ME-49 foram analisados para determinar níveis de anticorpos IgG (linha pontilhada) por ELISA (antígeno: lisado bruto de taquizoítos). Concomitantemente foram analisados os índices de avides dos anticorpos produzidos (linha contínua). Os resultados estão expressos em média das absorvâncias (ELISA) ou porcentagens (teste de avides) de 10 soros.

animais já produziam altos títulos de anticorpos IgM e IgG (Vide Figuras 1A e 1B). Estudos prévios que utilizaram como modelos experimentais camundongos de diferentes linhagens e outras cepas de *T. gondii* mostram pequenas alterações. Taquizoítos foram detectados no sangue, entre o 5º e o 15º dia pós-infecção em camundongos C57BL/6 infectados com a cepa virulenta 76K.<sup>18</sup>

Em relação à análise da cinética de anticorpos IgM e IgG, os resultados corroboraram com outros que demonstraram que anticorpos IgM podem estar presentes por longos períodos após a infecção.<sup>4,20-22</sup> Títulos baixos de IgM foram detectados até o 60º pós-infecção, juntamente com a presença de altos títulos de anticorpos IgG e com alta avidéz. Assim, presença de IgM não significa, necessariamente, uma infecção ativa, podendo significar apenas uma marca de uma infecção recente.

Os dados aqui demonstrados enfatizam o fato de que taquizoítos podem estar presentes na circulação sanguínea durante toda a fase aguda da infecção, mesmo que já se tenha instalado a resposta imune protetora. Assim, o conhecimento das condições epidemiológicas de cada caso, aliado ao diagnóstico sorológico e molecular, são fatores primordiais para estabelecer o diagnóstico definitivo da toxoplasmose.

## AGRADECIMENTOS

Este estudo teve os seguintes apoios financeiros: FAPESP – Proc. 08/09311-0; CNPq – Proc. 301531/2009-9; e CAPES.

## REFERÊNCIAS

- Dubey JP. *Toxoplasma gondii*. In: Baron SR, Peake C, James DA, Susman M, Kennedy CA, Singleton MJD, et al., editors. Medical microbiology [Internet]. 4<sup>th</sup>ed. Galveston: The University of Texas; c1996. [citado 2009 23 dez]. [cap. 84]; [13 p.] Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mmed&part=miscinfo>
- Dubey JP. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*. 1998;7:1019-24.
- Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet*. 2004;363:1965-76.
- Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect*. 2002;8:634-40.
- Remington JS, McLeod R, Thulliez P, Desmonts G. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein JO, editors. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. 5<sup>th</sup>ed. Philadelphia: Saunders; 2001. p.205-346.
- Boyer KM, Holfels E, Roizen N, et al. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in mothers of infants with congenital toxoplasmosis: implications for prenatal management and screening. *Am J Obstet Gynecol*. 2005;192:564-71.
- Montoya JG. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. *J Infect Dis* 2002; 185(Suppl 1): s73-82.
- Montoya JG, Remington JS. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin Infect Dis*. 2008;47:554-66.
- Meira CS, Costa-Silva TA, Vidal JE, et al. Use of the serum reactivity against *Toxoplasma gondii* excreted-secreted antigens in cerebral toxoplasmosis diagnosis in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Med Microbiol*. 2008;57:845-50.
- Costa-Silva TA, Meira CS, Ferreira IM, et al. Evaluation of immunization with tachyzoite excreted-secreted proteins in a novel susceptible mouse model (A/Sn) for *Toxoplasma gondii*. *Exp Parasitol*. 2008;120:227-34.
- Colombo FA, Vidal JE, Penalva de Oliveira AC, et al. Diagnosis of cerebral toxoplasmosis in AIDS patients in Brazil: importance of molecular and immunological methods using peripheral blood samples. *J Clin Microbiol*. 2005;43:5044-7.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory; 1989. (3 v.)
- Burg JL, Grover CM, Pouletty P, et al. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1989;27:1787-92.
- Denkers EY, Gazzinelli RT. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11:569-88.
- Denkers EY. From cells to signaling cascades: manipulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2003;39:193-203.
- Yap G, Pesin M, Sher A. IL-12 is required for the maintenance of IFN- $\gamma$  production in T cells mediating chronic resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*. 2000;165:628-31.
- Courret N, Darche S, Sonigo P, et al. CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain blood. *Blood*. 2006;107:309-16.
- Howe DK, Sibley LD. *T. gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis*. 1995;172:1561-6.
- Liesenfeld O, Press C, Montoya JG, et al. False-positive results in immunoglobulin M (IgM) *toxoplasma* antibody tests and importance of confirmatory testing: the Platelia Toxo IgM test. *J Clin Microbiol*. 1997;35:174-8.
- Lappalainen M, Hedman K. Serodiagnosis of toxoplasmosis: the impact of measurement of IgG avidity. *Ann Ist Super Sanità*. 2004;40:81-8.
- Handman E, Remington JS. Antibody responses to toxoplasma antigens in mice infected with strains of different virulence. *Infect Immun*. 1980;29:215-20.