

(12) PEDIDO INTERNACIONAL PUBLICADO SOB O TRATADO DE COOPERAÇÃO EM MATÉRIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organização Mundial da Propriedade Intelectual  
Secretaria Internacional



(43) Data de Publicação Internacional  
27 de Setembro de 2018 (27.09.2018) WIPO | PCT

(10) Número de Publicação Internacional  
WO 2018/170571 A1

- (51) Classificação Internacional de Patentes:  
C07K 14/45 (2006.01) G01N 33/569 (2006.01)  
C12N 15/30 (2006.01) C07K 17/08 (2006.01)  
A61K 39/002 (2006.01)
- (21) Número do Pedido Internacional: PCT/BR2018/050079
- (22) Data do Depósito Internacional: 23 de Março de 2018 (23.03.2018)
- (25) Língua de Depósito Internacional: Português
- (26) Língua de Publicação: Português
- (30) Dados Relativos à Prioridade:  
BR1020170059960  
23 de Março de 2017 (23.03.2017) BR
- (71) Requerentes: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ [BR/BR]; Av. Brasil 4365, Manguinhos, 21045-900 Rio De Janeiro, RJ (BR). INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR DO PARANÁ - IBMP [BR/BR]; Rua Professor Algacyr Munhoz Mader, 3775, Bloco C, Bairro CIC, 20090-080 Curitiba, PR (BR).

- (72) Inventores: KRIEGER, Marco Aurélio; Rua Anita Garibaldi, 31, apto 1002, Ahú, 80530-334 Curitiba, PR (BR). ZANCHIN, Nilson Ivo, Tonin; Rua Coronel Otoni Maciel, 215, Apto 206-B, Vila Izabel, 80320-000 Curitiba, PR (BR). BASCHIROTTI, Priscila, Tonon; Av. Presidente Affonso Camargo, 2625, Apt. 703, Bloco B2, Condomínio Home Space, Cristo Rei, 80050-370 Curitiba, PR (BR).
- (74) Mandatário: KASZNAR LEONARDOS PROPRIEDADE INTELLECTUAL; Rua Teófilo Otoni 63, 5th - 8th floors, 20090-080 Rio De Janeiro (BR).
- (81) Estados Designados (sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção nacional existentes): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(54) Title: IMMUNODIAGNOSTIC METHOD FOR ACUTE AND CHRONIC TOXOPLASMOSIS

(54) Título: MÉTODO PARA IMUNODIAGNÓSTICO DE TOXOPLASMOSE AGUDA E CRÔNICA

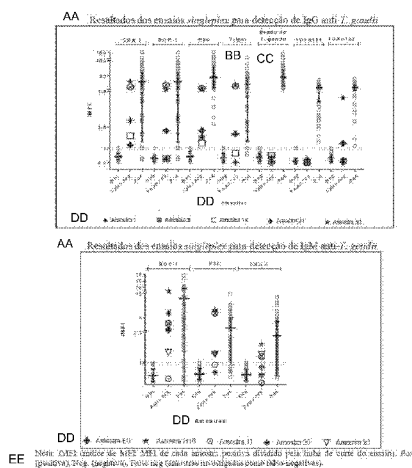


FIGURA 7

AA Results of the singleplex assays for detecting anti-T. gondii IgG  
AA Results of the singleplex assays for detecting anti-T. gondii IgM  
BB Triple  
CC T. gondii isolate  
DD Samples  
DD Sample  
EE Note: IMFI (MFI index: MFI of each positive sample divided by the cut-off line of the assay). Pos. (positive), Neg. (negative), False neg (samples investigated as false-negative).

(57) Abstract: The present patent application discloses recombinant or synthetic *T. gondii* antigens that can be used for diagnosing acute and chronic toxoplasmosis. Combinations for detecting IgG anti-*T. gondii* antibodies and IgM anti-*T. gondii* antibodies are disclosed, comprising the antigens GRA7, ROP1, p35 and GRA6, or fragments thereof. In addition, the present patent application discloses nucleotide sequences encoding the antigens of the present invention, as well as systems for recombinant expression and systems for purification of said antigens. Furthermore, stabilized compositions comprising the antigens of the invention are also provided, as well as said antigens coupled to microbeads.

(57) Resumo: O presente pedido de patente revela antígenos recombinantes ou sintéticos de *T. gondii* úteis para diagnosticar a toxoplasmose aguda e crônica. São reveladas combinações para detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* e anticorpos IgM anti-*T. gondii*, as quais compreendem os antígenos GRA7, ROP1, p35 e GRA6, ou fragmentos dos mesmos. Adicionalmente, o presente pedido de patente revela sequências nucleotídicas que codificam os antígenos da presente invenção, bem como sistemas de expressão recombinante e sistemas de purificação dos referidos antígenos. Além disso, são também providas composições estabilizadas compreendendo os antígenos da invenção, bem como os referidos antígenos acoplados a microesferas.



WO 2018/170571 A1

**(84) Estados Designados** *(sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção regional existentes):* ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiático (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), Europeu (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publicado:**

- *com relatório de pesquisa internacional (Art. 21(3))*
- *com listagem de sequências, parte da descrição (Regra 5.2(a))*
- *em preto e branco; o pedido internacional tal como depositado contém cores ou níveis de cinza e pode ser baixado no PATENTSCOPE*

## “MÉTODO PARA IMUNODIAGNÓSTICO DE TOXOPLASMOSE AGUDA E CRÔNICA”

### **Campo da Invenção**

[001] A presente invenção refere-se ao uso de antígenos recombinantes ou sintéticos para detecção de toxoplasmose aguda ou crônica. Particularmente, a presente invenção refere-se a combinações ou misturas que podem ser utilizadas na detecção de anticorpos IgG e IgM contra *Toxoplasma gondii*. Além disso, a presente invenção refere-se a sequências nucleotídicas otimizadas e a sistemas de expressão recombinante para obtenção dos referidos antígenos. Adicionalmente, a presente invenção refere-se a sistemas de purificação, estabilização e acoplamento dos referidos antígenos às microesferas.

### **Antecedentes da Invenção**

[002] A toxoplasmose é uma zoonose causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*. A principal via de contaminação dos seres humanos ocorre através da água e alimentação (1, 2). A doença em seres humanos divide-se entre as fases aguda e crônica. A fase aguda da infecção procede ao contato inicial com o *T. gondii*, e é caracterizada pela disseminação do parasita por todo organismo, seguida por destruição tecidual e manifestação patogênica da doença. A fase crônica da infecção ocorre posteriormente, e é caracterizada pelo estabelecimento da latência da infecção, que ocorre através da formação de cistos teciduais quiescentes e permanentes, juntamente com o desaparecimento dos sintomas (3).

[003] Os taquizoítos demonstram preferência pelo Sistema Nervoso Central, tecidos musculares, e tecidos e estruturas oculares (3). Na toxoplasmose ocular são observadas lesões necróticas na retina, coróide, e vítreo produzindo sintomas como visão turva, dor, fotofobia, ou perda parcial ou total da visão (4, 5). As manifestações mais comuns da encefalite toxoplásmica são as anormalidades neurológicas, tais como hemiparesia,

demência, ataxia, letargia, convulsões, e distúrbios motores ou sensoriais (3, 5).

[004] A ocorrência desta doença tem um impacto significativo em gestantes e pacientes imunodeprimidos (3). Devido à ausência de imunossupressão eficaz, a infecção aguda ou reativação da toxoplasmose em indivíduos imunocomprometidos pode levar a casos fatais. A infecção adquirida por pacientes com AIDS pode envolver múltiplos órgãos, causando uma grande variedade de sintomas (3, 5). É estimado que nos Estados Unidos e na Europa, respectivamente, cerca de 10% a 30% dos pacientes com AIDS e Toxoplasmose evoluem para óbito (2). A ocorrência de toxoplasmose em gestantes imunocompetentes pode resultar na transmissão vertical do *T. gondii*. As taxas de transmissão vertical correspondem a 10 a 25% no primeiro trimestre, 30 a 54% e 60 a 65%, durante o segundo e terceiro trimestres, respectivamente (6). Até a 13<sup>o</sup> semana de gestação, 61% dos fetos infectados desenvolvem sinais clínicos, até 26<sup>o</sup> semana, entre 18% a 33%, e até 36<sup>o</sup> semana, entre 4% a 17% (7). As consequências mais comuns da toxoplasmose congênita são a lesão ocular, principalmente a coriorretinite, a qual acomete 92% dos casos, e calcificações intracranianas e hidrocefalia, que ocorrem em aproximadamente 15% dos casos (6, 8, 9). Também são documentados outros sintomas, como convulsão, retardo mental, microcefalia, esplenomegalia, hepatomegalia, febre, anemia, linfadenopatia (10). A toxoplasmose congênita também está associada ao risco aumentado de parto prematuro após o 5<sup>o</sup> mês de gestação, aborto, natimorto, e morte neonatal (7, 8, 9). No entanto, 70% a 90% dos neonatos infectados congenitamente são assintomáticos ao nascer (6). A toxoplasmose congênita pode se manifestar tardiamente, durante a infância ou adolescência, apresentando deficiências relacionadas ao comprometimento de estruturas oculares e do SNC, como retinocoroidite, estrabismo, cegueira, deficiências neurológicas, convulsões, retardo mental (9, 10, 11).

[005] A toxoplasmose tem sido relatada em todo o mundo. No Brasil, a soroprevalência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em gestantes, indicativos de infecção prévia com o parasita, varia de acordo com a região estudada: 88% na região endêmica de Erechim no estado do Rio Grande do Sul (RS) (12), 91% no Mato Grosso do Sul (MS) (13), 64,9% na Bahia (14), 67% no Paraná (15), e de 59,8% (16) a 74,5% no RS (17). Com relação à toxoplasmose congênita, a incidência encontrada foi de 8/10.000 no RS (18), e 3,3/10.000 em Ribeirão Preto no estado de São Paulo (19) e no sul do Brasil, que possui a maior soroprevalência de toxoplasmose já registrada no mundo (20).

[006] Na maioria dos casos, os sintomas são inespecíficos e presentes em apenas 10% a 20% dos indivíduos imunocompetentes (3). Por esta razão, a triagem para toxoplasmose em gestantes é realizada rotineiramente em diferentes países. Estes programas de rastreio são inicialmente baseados em testes serológicos para a detecção de anticorpos específicos IgG e IgM (21, 22), que requerem aquisição simples e não invasiva de amostras de sangue, o que permite que esta abordagem seja amplamente adotada. Os testes sorológicos fornecem informações confiáveis sobre o perfil imunológico das gestantes e indicam se uma infecção recente ocorreu durante a gestação (22). Um indivíduo é considerado susceptível à infecção quando os anticorpos específicos estão ausentes em amostras de soro. Anticorpos IgG específicos surgem dentro de 1 a 2 semanas após a infecção com *T. gondii* e atingem níveis máximos entre 1 e 5 meses, e geralmente permanecem elevados. Anticorpos IgM específicos surgem na primeira semana de infecção, atingindo picos de concentração plasmática dentro de 2 semanas a 2 meses. Depois disto, desaparecem em taxas altamente variável e podem ser detectados até 18 meses depois (21, 23, 24). Portanto, a detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* na ausência de IgM define o padrão clássico serológico de infecção passada por pelo menos 18 meses. Neste caso,

a gestante é considerada imunologicamente protegida, e novos eventos são extremamente raros. A infecção ativa durante a gestação é classicamente identificada pela detecção de anticorpos IgM e/ou IgG anti-*T gondii*. No entanto, devido à presença de anticorpos IgM específicos até 18 meses após a contaminação, a interpretação correta do diagnóstico exige a confirmação através da observação de soroconversão e/ou de um aumento significativo do título de anticorpos, e a realização do teste de avidéz de IgG (21, 25, 26). Se a toxoplasmose aguda for confirmada, antibioticoterapia pode ser introduzida com o objetivo de reduzir a lesão fetal e neonatal e/ou minimizar o risco de transmissão vertical (10, 27, 28).

[007] Atualmente, laboratórios clínicos utilizam amplamente testes para o diagnóstico da toxoplasmose com base nas técnicas de ELFA (Enzyme Fluorescent Lynked Assay), EIA (Enzyme Immunoassay), ou CMIA (Chemiluminescent Microparticle Immunoassay) (25, 26). A maioria dos imunoensaios comerciais atuais ainda são baseados em extratos e lisados de *T. gondii*. O uso destes apresentam limitações, como a manutenção do parasita vivo, dificuldades na padronização das culturas, e reações cruzadas, os quais afetam a qualidade dos imunoensaios. Os métodos de obtenção de antígenos nativos podem variar significativamente entre laboratórios, o que gera variações entre imunoensaios decorrentes das diferenças de composição entre lisados e extratos de *T. gondii* empregados. Além disso, antígenos obtidos a partir de taquizoítos podem conter materiais remanescentes de meio de cultura e células eucarióticas hospedeiras (29, 30, 31, 32). Para superar essas limitações, o emprego de antígenos recombinantes de *T. gondii* tem sido sugerido para a substituição de extratos ou lisados do parasita, por permitirem facilmente a padronização do método, o conhecimento exato da composição de antígenos empregados nos imunoensaios (32) e custos de produção e purificação mais baixos (31). Em 2008, Sickinger et al. 2008 (33) desenvolveu o ensaio baseado na metodologia automatizada de CMIA para

detecção de anticorpos IgM (Toxo IgM, ARCHITECT system, ABBOTT Diagnostics Division), nos quais foram utilizados antígenos recombinantes SAG1 e P35 (GRA8) como moléculas de captura.

[008] Os antígenos de *T. gondii* correspondem principalmente às proteínas de superfície, e às proteínas secretadas pelas organelas de grânulos densos, pelos micronemas, e pela organela róptria. Já foram identificados e avaliados em imunoenaios mais de 20 antígenos, como SAG1, SAG2, SAG3, p35, GRA1, GRA2, GRA4, GRA5, GRA6, GRA7, ROPI, ROP2, B10, MIC1, MAG1, MIC2, MIC3 (32), M2AP, e GRA3 (34). Devido à grande variedade de antígenos presentes no processo infeccioso, e a outros fatores envolvidos na exposição destes antígenos, como a rota, a severidade, e a fase da infecção, foi observado que entre os indivíduos infectados existe um padrão notavelmente variado de intensidade da resposta humoral contra os diferentes antígenos de *T. gondii*. As fases infectivas, que são marcadas pela presença de taquizoítos (forma infectiva) e bradizoítos (forma latente), também apresentam diferenças quanto à expressão dos antígenos (35, 36, 37, 38). Alguns destes são expressos apenas em taquizoítos, exclusivamente durante a invasão celular (ROPI (39)), e/ou no processo infeccioso, em maior ou menor escala em relação aos demais antígenos, estando presentes no citoplasma e na membrana citoplasmática das células infectadas (GRA7 e ROP2 (40)). Estas diferenças podem determinar o nível de exposição e reconhecimento imune dos antígenos, influenciando inclusive na maturação e avidéz dos anticorpos IgG específicos (35, 36, 37, 38, 41). Dessa forma, alguns indivíduos produzem grandes quantidades de anticorpos contra alguns antígenos, enquanto em outros indivíduos, estes mesmos anticorpos inexistem ou são fracamente produzidos. O sucesso das combinações de antígenos é explicado pela oferta de uma gama superior de epítomos para a ligação de anticorpos anti- *T. gondii*, de forma a cobrir as diferenças individuais na resposta imune.

[0009] Por estes motivos, várias publicações científicas apresentaram diferentes combinações de antígenos, os quais demonstraram conjuntamente maior potencial de detecção de anticorpos IgG e IgM comparado aos antígenos usados isoladamente (26).

[0010] Há, portanto, uma necessidade na técnica por um imunoenensaio que permita o imunodiagnóstico da toxoplasmose aguda e crônica sem as limitações apresentadas pelos métodos e antígenos propostos pelo estado da técnica.

### **Sumário da Invenção**

[0011] Com a finalidade de solucionar o problema da técnica e de prover um método imunodiagnóstico para detecção de toxoplasmose aguda e crônica em uma amostra de teste, foram desenvolvidos antígenos que podem ser obtidos de forma recombinante ou sintética. Particularmente, foi desenvolvido um método imunodiagnóstico que permite a distinção entre a fase aguda e a fase crônica da toxoplasmose.

[0012] Em um aspecto particular, é fornecida uma composição compreendendo uma mistura ou combinação de antígenos para detecção de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* e de IgM anti-*Toxoplasma gondii*.

[0013] Em aspecto mais específico, as misturas ou combinações de antígenos da presente invenção compreendem os antígenos GRA7, ROPI, p35 (GRA 8) e GRA6.

[0014] Em um aspecto ainda mais específico, as composições compreendem uma combinação dos antígenos compreendendo os aminoácidos 19-236 de GRA7 (SEQ ID NO:2); os aminoácidos 85-378 de ROPI (SEQ ID NO:4); os aminoácidos 26 a 179 de p35 (SEQ ID NO:6).

[0015] Ainda, em um outro aspecto específico, as composições compreendem uma combinação de antígenos compreendendo os aminoácidos 85-378 de ROPI (SEQ ID NO:4); os aminoácidos 26 a 179 de p35 (SEQ ID NO:6) e os aminoácidos 26 a 179 de GRA6 (SEQ ID NO:8).



[0016] São também baseados em sequências nucleotídicas otimizadas que codificam os antígenos da presente invenção, bem como em sistemas de expressão que permitem a obtenção dos antígenos da presente invenção.

[0017] Particularmente, as sequências nucleotídicas da presente invenção estão otimizadas quanto às seguintes características: estrutura secundária do RNAm, distribuição do conteúdo de GC, sequências repetitivas longas, sítios de restrição, e taxa da utilização de códons.

[0018] É também revelado um método para purificação dos antígenos da invenção compreendendo formulações das soluções de purificação e parâmetros dos programas de purificação.

[0019] Em um aspecto da invenção, são também reveladas formulações de soluções de armazenamento, compreendendo os antígenos da presente invenção estabilizados.

[0020] Em um aspecto da invenção, são também reveladas formulações de soluções de acoplamento dos antígenos da presente invenção às microesferas.

[0021] Em uma modalidade, é provido um antígeno recombinante ou sintético, selecionado do grupo consistindo em GRA7, ROPI, p35 e GRA6 de *Toxoplasma gondii*, ou fragmentos antigênicos dos mesmos.

[0022] Em uma modalidade particular, é provido um antígeno recombinante ou sintético compreendendo os aminoácidos 19-236 de GRA7; os aminoácidos 85-378 de ROPI; os aminoácidos 26-179 de p35; e os aminoácidos 30-230 de GRA6.

[0023] Preferencialmente, o antígeno recombinante ou sintético compreendendo os aminoácidos 19-236 de GRA7 é representado por SEQ ID NO:2.

[0024] Preferencialmente, o antígeno recombinante ou sintético compreendendo os aminoácidos 85-378 de ROPI é representado por SEQ ID NO:4.

[0025] Preferencialmente, o antígeno recombinante ou sintético compreendendo os aminoácidos 26-179 de p35 é representado por SEQ ID NO:6.

[0026] Em uma modalidade particular, o antígeno recombinante ou sintético da presente invenção pode ser purificado.

[0027] Em uma modalidade é provida uma sequência nucleotídica que codifica os antígenos da presente invenção.

[0028] Em uma modalidade preferencial, a sequência nucleotídica compreende SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:5 ou SEQ ID NO:7.

[0029] Em uma modalidade da invenção é provida uma composição compreendendo os antígenos GRA7, ROP1 e p35 de *Toxoplasma gondii*, ou fragmentos antigênicos dos mesmos.

[0030] Em uma modalidade preferencial a composição inclui os antígenos que compreendem os aminoácidos 19-236 de GRA7; os aminoácidos 85-378 de ROP1; e os aminoácidos 26-179 de p35. Os antígenos da presente composição são, preferencialmente, representados pelas SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:6. Em uma modalidade preferencial, a composição pode ser utilizada em um método para detecção de IgG anti-*Toxoplasma gondii*.

[0031] Em uma outra modalidade da invenção, é provida uma composição compreendendo os antígenos p35, ROP1 e GRA6 de *Toxoplasma gondii*, ou fragmentos antigênicos dos mesmos.

[0032] Em uma modalidade preferencial, é provida uma composição incluindo os antígenos que compreenderem os aminoácidos 85-378 de ROP1; os aminoácidos 26-179 de p35; e os aminoácidos 30-230 de GRA6. Os antígenos da presente composição são, preferencialmente, representados pelas SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:8. Em uma modalidade preferencial, a composição pode ser utilizada em um método para detecção de IgM anti-*Toxoplasma gondii*.

[0033] Em uma modalidade particular, os antígenos incluídos nas composições da presente invenção podem ser estabilizados.

[0034] Em uma outra modalidade, as microesferas podem compreender antígenos que incluídos nas composições da presente invenção podem compreender antígenos acoplados a microesferas.

[0035] Uma modalidade adicional da presente invenção consiste em um kit para detecção de IgG anti-*Toxoplasma gondii*, compreendendo:

- (a) uma composição compreendendo os antígenos GRA7, ROP1 e p35;
- (b) um meio de detecção para detectar o complexo antígeno anticorpo; e
- (c) instruções de uso.

[0036] Em uma outra modalidade adicional da presente invenção é provido um kit para detecção de IgM anti-*Toxoplasma gondii*, compreendendo as etapas de:

- (a) uma composição compreendendo os antígenos ROP1, p35 e GRA6;
- (b) um meio de detecção para detectar o complexo antígeno anticorpo; e
- (c) instruções de uso.

[0037] Em uma modalidade é ainda provido um método para detecção de IgG anti-*Toxoplasma gondii*, compreendendo as etapas de:

- (a) prover uma composição de antígenos compreendendo os antígenos GRA7, ROP1 e p35;
- (b) contatar a composição de antígenos com a amostra a ser testada por um tempo suficiente e sob condições suficientes para formação de complexos anticorpo/antígeno; e
- (c) detectar o complexo antígeno/ anticorpo formado na

etapa (b), pela adição de um meio de detecção, capaz de gerar um sinal detectável na presença do referido complexo antígeno/ anticorpo.

[0038] Em uma outra modalidade da presente invenção é provido um método para detecção de IgM anti-*Toxoplasma gondii*, compreendendo as etapas de:

- (a) prover uma composição compreendendo os antígenos ROPI, p35 e GRA6;
- (b) contatar a composição de antígenos com a amostra a ser testada por um tempo suficiente e sob condições suficientes para formação de complexos anticorpo/ antígeno; e
- (c) detectar o complexo antígeno/ anticorpo formado na etapa (b), pela adição de um meio de detecção, capaz de gerar um sinal detectável na presença do referido complexo antígeno/ anticorpo.

### **Breve Descrição das Figuras**

[0039] A Figura 1 é um esquema das construções genéticas e região de clonagem e transcrição do vetor pET28a.

[0040] A Figura 2 apresenta o SDS-PAGE e *Western blottings* das proteínas purificadas por HPLC.

[0041] A Figura 3 demonstra os resultados dos testes de descongelamento para avaliação da estabilidade dos antígenos nas condições não agregantes de armazenamento.

[0042] A Figura 4 apresenta o gráfico de dispersão correspondente aos ensaios *singleplex* para detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii*.

[0043] Figura 5 apresenta o gráfico de dispersão correspondente aos ensaios *singleplex* para detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii*.

[0044] A Figura 6 apresenta o perfil de resposta imune relativa aos

títulos de IgG e IgM específicos com relação às fases da infecção.

[0045] A Figura 7 mostra os resultados de IMFI (MFI/linha de corte) das amostras investigadas como falso-negativas.

### **Descrição Detalhada da Invenção**

[0046] Existe na técnica uma necessidade por métodos diagnósticos que permitam a detecção precisa de anticorpos IgM e IgG para *Toxoplasma gondii* em amostras de teste. Particularmente, existe na técnica uma necessidade por métodos diagnósticos que permitam a distinção precisa da fase aguda e da fase crônica da toxoplasmose, sem a ocorrência de falsos negativos ou falsos positivos. A presente invenção proporciona tais testes imunodiagnóstico. Particularmente, são providas combinações ou misturas de antígenos recombinantes ou sintéticos os quais permitem a detecção precisa da presença de anticorpos IgM e IgG para *Toxoplasma gondii* em amostras.

[0047] Particularmente, a presente invenção inclui composições compreendendo misturas ou combinações de antígenos recombinantes ou sintéticos, compreendendo os antígenos GRA7, ROPI, p35 e GRA6.

[0048] Em uma modalidade específica, as composições incluem uma combinação dos antígenos compreendendo os aminoácidos 19-236 de GRA7 (SEQ ID NO:2); os aminoácidos 85-378 de ROPI (SEQ ID NO:4); e os aminoácidos 26 a 179 de p35 (SEQ ID NO:6). A referida combinação de antígenos é, particularmente, eficaz na detecção de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii*.

[0049] Em uma outra modalidade específica, as composições compreendem uma combinação de antígenos compreendendo os aminoácidos 85-378 de ROPI (SEQ ID NO:4); os aminoácidos 26 a 179 de p35 (SEQ ID NO:6); e os aminoácidos 26 a 179 de GRA6 (SEQ ID NO:8). A referida combinação de antígenos é, particularmente, eficaz na detecção de anticorpos IgM anti-*Toxoplasma gondii*.

[0050] Os antígenos da presente invenção podem ser obtidos de forma

recombinante ou sintética. Em uma modalidade particular, os antígenos da presente invenção são obtidos por meio de um sistema de expressão, o qual permite a obtenção dos antígenos da presente invenção. Em particular, são preferidos os sistemas de expressão os quais compreendam sequências nucleotídicas otimizadas, tais como aquelas descritas, de forma não limitativa, em SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 e SEQ ID NO:7, as quais codificam os polipeptídeos compreendendo os aminoácidos 19-236 de GRA7 (SEQ ID NO:2); os aminoácidos 85-378 de ROP1 (SEQ ID NO:4); os aminoácidos 26 a 179 de p35 (SEQ ID NO:6); e os aminoácidos 26 a 179 de GRA6 (SEQ ID NO:8), respectivamente.

[0051] Por sistema de expressão, compreende-se um sistema compreendendo as sequências nucleotídicas da presente invenção, os quais são capazes de codificar as sequências antigênicas da presente invenção. As sequências nucleotídicas podem estar inseridas em cassetes de expressão, os quais são colocados em condições que conduzam à expressão do polipeptídeo correspondente.

[0052] O cassete de expressão pode compreender, ainda, sequências de controle de expressão, tais como, promotores, sequências intensificadoras e terminadoras compatíveis com o sistema de expressão. Ademais, o cassete de expressão pode compreender sequências espaçadoras e sítios de restrição adequados. Além disso, o cassete pode compreender, ainda, uma sequência codificante para cauda de histidina.

[0053] O sistema de expressão pode compreender um cassete de expressão inserido em um vírus ou célula hospedeira, sob condições que conduzam à expressão do polipeptídeo correspondente. Em uma modalidade, o sistema de expressão pode compreender células bacterianas, células de levedura, células de fungos filamentosos, células de protozoários, células de insetos, células animais e células vegetais. Em uma modalidade específica, o sistema de expressão pode consistir em uma célula bacteriana,

preferivelmente uma célula de *Escherichia coli*.

[0054] A presente invenção também provê antígenos purificados. Os antígenos da presente invenção podem ser purificados por qualquer método conhecido na arte. Preferencialmente, podem ser utilizados métodos de cromatografia. Em certas modalidades pode-se utilizar um cromatógrafo semi-automatizado. Exemplos não limitativos incluem o método de afinidade à resina de níquel, troca iônica, outros métodos por afinidade ou adsorção, por iônico, fase reversa, e exclusão molecular.

[0055] Pode-se utilizar qualquer coluna conhecida na técnica adequada à purificação de polipeptídeos. Em certas modalidades da presente invenção pode ser empregada uma coluna de Ni-Sefarose, tal como a Histrap HP (disponível junto à GE Healthcare Life Sciences), ou ainda, uma coluna de troca iônica, tal como a Histrap Q Sepharose (disponível junto à GE Healthcare Life Sciences).

[0056] Os tampões de purificação utilizados podem ser aqueles conhecidos na técnica. Em modalidades particulares, pode ser utilizado o tampão Tris, CAPS (ácido N-ciclohexil-3-aminopropanosulfônico), MES (ácido 2-(N-morfolino) etanosulfônico), PBS (tampão de salina fosfatada), CABS (ácido 4-(Ciclohexilamino)-1-butanossulfônico), ACES (ácido *N*-(2-Acetamido)-2-aminoetanosulfônico), ADA (ácido *N*-(2-Acetamido)iminodiacético), BES (ácido *N,N*-Bis(2-hidroxietyl)-2-aminoetanosulfônico), AMP (2-amino-2-metil-1-propanol), AMPD (2-Amino-2-Metil-1,3-Propanodiol; amediol), HEPES (4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinaetanosulfônico), EPPS (ácido 3-[4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinil]propanosulfônico), TAPS (N-[tris(hidroxietyl)metil]-3-aminopropanosulfônico), MOPS (3-morfolinopropano-1-sulfônico), PIPES (ácido 1,4-Piperazinediethanesulfonic, TES (N-[tris(hidroxietyl)metil]-2-aminoetanosulfônico), Bicina (N,N-bis(2-hidroxietyl)glicina), Tricina (N-tris(hidroxietyl) metilglicina), Bis-Tris, ou tampões que contenham sais, ácidos

ou bases de fosfato, carbonato, citrato, acetato, succinato, hidróxido, fitalato, maleato, cacodilato, veronal, colidina, Tris-maleato, barbital, Tris-aminometano, borato, dimetilglutarato, maleato, amediol, glicina, imidazol, ácido hidroclicórico, ácido orto-fosfórico, trietanolamina, glicilglicina, bartibirato, e bicarbonato.

[0057] Particularmente, de acordo com a presente invenção, são obtidos antígenos com 90% de pureza, preferivelmente, 91% de pureza, com mais preferência 92% de pureza, ainda com mais preferência 93% de pureza, ainda mais preferivelmente, 94% de pureza, ainda mais preferivelmente, 95% de pureza, ainda mais preferivelmente, 96% de pureza, ainda mais preferivelmente, 97% de pureza, ainda mais preferivelmente, 98% de pureza, ainda mais preferivelmente, 99% de pureza; ainda mais preferivelmente, 99,9% de pureza, o mais preferido 100% de pureza.

[0058] Adicionalmente, são providas composições estabilizadas dos antígenos da presente invenção. As composições estabilizadas da presente invenção resultam em proteínas monoméricas, e na ausência de agregados proteicos após o descongelamento, o que garante a não interferência na interação antígeno-anticorpo, relacionada à agregação, nos imunoenaios da presente invenção.

[0059] Em uma modalidade particular da presente invenção, são providas formulações de tampões de armazenamento para estabilização dos antígenos da invenção. Os tampões utilizados na presente invenção são conhecidos na arte. Em modalidades específicas podem ser utilizados os tampões Tris-HCl, Tris, CAPS (ácido N-ciclohexil-3-aminopropanosulfônico), MES (ácido 2-(N-morfolino) etanosulfônico), PBS (tampão de salina fosfatada), CABS (ácido 4-(Ciclohexilamino)-1-butanosulfônico), ACES (ácido N-(2-Acetamido)-2-aminoetanosulfônico), ADA (ácido N-(2-Acetamido)iminodiacético), BES (ácido N,N-Bis(2-hidroxietyl)-2-aminoetanosulfônico), AMP (2-amino-2-metil-1-propanol),



AMPD (2-Amino-2-Metil-1,3-Propanodiol; amediol), HEPES (4-(2-hidroxi-*etil*)-1-piperazinaetanosulfônico), EPPS (ácido 3-[4-(2-hidroxi-*etil*)-1-piperazinil]propanosulfônico), TAPS (N-[tris(hidroxi-*etil*)metil]-3-aminopropanosulfônico), MOPS (3-morfolinopropano-1-sulfônico), PIPES (ácido 1,4-Piperazinedietanesulfônico), TES (N-[tris(hidroxi-*metil*)metil]-2-aminoetanosulfônico), Bicina (N,N-bis(2-hidroxi-*etil*)glicina), Tricina (N-tris(hidroxi-*metil*) metilglicina), Bis-Tris, ou tampões que contenham sais, ácidos ou bases de fosfato, carbonato, citrato, acetato, succinato, hidróxido, fitalato, maleato, cacodilato, veronal, colidina, Tris-maleato, barbital, Tris-aminometano, borato, dimetilglutarato, maleato, amediol, glicina, imidazol, ácido hidrocloreto, ácido orto-fosfórico, trietanolamina, glicilglicina, bartibirato, e bicarbonato.

[0060] Em uma modalidade particular da presente invenção, são providos aditivos para as formulações de tampões de armazenamento. Os aditivos utilizados na presente invenção são conhecidos na arte. Em modalidades específicas podem ser utilizados aditivos como imidazol e sais de imidazol; os crioprotetores, glicerol, acetamida, sucrose, trealose, lactose, glicose, sacarose, etilenoglicol, propilenoglicol, MPD (2-metil-2,4-pentanediol), derivados de formamida; detergentes como DDM (dodecil  $\beta$ -D-maltoside), OGP (octil  $\beta$ -D-glucoside); detergentes de sais biliares, como deoxicolato, colato, glicolato, taurideoxicolato, sal de ácido taurocólico; ácido deoxicólico, ácido cólico, ácido taurideoxicólico, ácido glicólico, sarcosil, n-laurilsarcosina, CTAB (brometo de cetil-trimetilamônio), TTAB (brometo de tetradeciltrimetilamônio), hiamina, N,N-Bis[3-(D-gluconamido)propil]deoxicolamida, digitonina, saponina, N-Decanoil-N-metilglucamina, óxido de dimetildecilfosfina, óxido de dodecildimetilfosfina, N-Nonanoil-N-metilglucamina, N-octanoil-N-metilglucamina, span, tiloxapol; detergentes glicosídicos; detergentes de poli(oxietileno), como família Tween20 a 80, Nonidet-P-40; polímeros de etilenoglicóeter, como

Triton X-100 e X-114, e IGEPAL; detergentes de sulfatos de alquil e sais de dodecilsulfatos, como SDS (dodecil sulfato de sódio); detergentes de alquil sulfonatos, sal de docusato de sódio, brometo de alquiltrimetilamônio, cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio, hidróxido de benzetônio, brometo de dimetildioctadecilamônio, brometo de dodeciltrimetilamônio, monohidrato de cloreto de hexadecilpiridínio, brometo de hexadeciltrimetilamônio, cloreto de metilbenzetônio, brometo de miristiltrimetilamônio, ASB-14, C7zBO, CHAPS, CHAPSO, SB3-10, DDAO, SB3-14, SB3-18, SB3-8, sulfobetaínas, derivados de ciclodextrinas; diversos sais como NaCl; desnaturantes como, ureia, tiourea, guanidina, DMSO (dimetilsufóxido), formamida, ácido acético, ácido tricloroacético, ácido salicílico, ácido sulfosalicílico, bicarbonato de sódio, etanol, formaldeído, paraformaldeído, glutaraldeído; redutores como DTT (ditiotreitól), DTE (ditioeritritól), 2-mercaptoetanol, cisteína, cloreto estanoso ( $\text{SnCl}_2$ ), ácido ascórbico (AA), iodoacetamida, cloroacetamida, tributilfosfina, hidrocloreto de tris(2-carboxietil)fosfina. TCEP (tris(2-carboxietil)fosfina), e TBTA (1-benzil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil]amina).

[0061] Em modalidades específicas da invenção foram também determinadas as concentrações não agregantes de antígeno. Deste modo, as concentrações dos antígenos da presente invenção na composição variam, de um modo geral, de 0,01 a 10 mg/mL, preferencialmente, de 3,0 a 4,5 mg/mL.

[0062] Os antígenos da presente invenção podem ser também providos acoplados a microesferas. A determinação da melhor composição de aditivos de tampão, concentração de antígeno e pH de solução para o acoplamento dos antígenos às microesferas são soluções técnicas apresentadas na presente invenção. O procedimento de acoplamento dos antígenos da presente invenção resultou no aumento expressivo do desempenho dos ensaios, e na redução dos gastos com antígenos durante os acoplamentos.

[0063] Em certas modalidades da presente invenção, os antígenos são

acoplados à microesferas de látex, gel, silicone, acrílico, vidro, sílica e polímeros, tal como poliestireno, PLGA (poli (D,L-lactídio-co-glicolídio), poliacrilamida, PMMA (polimetil metacrilato), tribloco polisopropen-bloco-poli(2-cinamoiletil metacrilato)-bloco-poli(*tert*-butil acrilato), dextran e alginato, PVA (poli(vinil álcool)), PDMS (polidimetilsiloxane), copolímeros de acetoacetoxietil metacrilato e *N*-vinilcaprolactam, copolímero oleofínico cíclico, copolímeros de NIPA (*N*-isopropil acrilamida), glicidil metacrilato, PEI [poli(etileno amina)], PDADMAC [poli(cloreto de dialildimetilamônio)], PAA [poli(ácido acrílico)], PAH [poli(alilaminahidrocloreto)]. Em uma modalidade particular, podem ser utilizadas microesferas de poliestireno.

[0064] Em uma modalidade, a microesfera da presente invenção pode conter grupos na superfície para ligação covalente com grupos amino de proteínas. Em uma modalidade particular, as microesferas podem conter em sua superfície grupamentos que permitem a ligação de proteínas, como grupamentos carboxila, sulfidril, amina, hidroxila, epóxido, isotiocianato, azlactone, *p*-nitrofenil éster, tirosina, clorometil, benzofenona, glutaraldeído, amidina, amina alifática, sulfato, aldeído, epóxi, *N*-hidróxisuccinimida, éster de *N*-hidróxisuccinimida, e sulfo-*N*-hidróxisuccinimida. Em uma modalidade particular, a microesfera da presente invenção pode conter grupos carboxila para ligação covalente com grupos amino de proteínas.

[0065] Em uma modalidade, as microesferas da presente invenção podem apresentar propriedades paramagnéticas, como alumínio, ouro, cobre, cério, cobalto, cromo, disprósio, érbio, európio, gadolínio, óxido de ferro, óxido de cobre, óxido de níquel, neodímio, superóxido de potássio, praseodímio, samário, térbio, túlio, vanádio, sódio, magnésio, cálcio, estrôncio, bário, tecnécio, urânio e platina.

[0066] Ainda em outra modalidade, as microesferas da presente invenção podem conter fluoróforos, e preferivelmente podem ser adicionados dois fluoróforos, como proteínas fluorescentes: GFP (*Green Fluorescent*

*protein*) e suas derivações e mutações, YFP (*Yellow Fluorescent protein*) e suas derivações e mutações, e RFP (*Red Fluorescent protein*) e suas derivações e mutações; EBFP, EBFP2, Azurite, GFPuv, T-Safira, Cerulean, mCFP, mTurquoise2, ECFP, CyPet, mKeima-Red (empresa MBL), TagCFP (empresa Evrogen), AmCyan1 (empresa Clontech), mTFP1, Midoriishi Cyan (empresa MBL), Emerald (empresa Invitrogen), Azami Green (empresa MBL), ZsGreen1 (empresa Clontech), Topaz, Venus, mCitrine, YPet, ZsYellow1, Kusabira Orange (empresa MBL), mOrange, Alofocianina, mKO, tdTomato, DsRed (empresa Clontech), DsRed2 (empresa Clontech), mStrawberry, TurboFP602 (empresa Evrogen), AsRed2 (empresa Clontech), mRFP1 (empresa Tsien-lab), J-red, R-ficoeritrina (RPE), B-ficoeritrina (BPE), mCherry, HcRed1 (empresa Clontech), Katusha, P3, Peridinin Chlorophyll (PerCP), mKate (TagFP635) (empresa Evrogen), TurboFP635 (empresa Evrogen), mPlum, e mRaspberr; derivados de fluoróforos não proteicos das famílias: xantana, cianina, squaraine, naftalina, cumarina, oxadiazol, antraceno, pireno, oxazina, acridina, arilmetina, tetrapirrol; derivados das famílias de fluoróforos de marcas comerciais: CF dye (empresa Biotium), DRAQ and CyTRAK probes (empresa BioStatus); BODIPY (empresa Invitrogen); Alexa Fluor (Invitrogen), DyLight Fluor (empresa Thermo Scientific, Pierce), Atto and Tracy (empresa Sigma Aldrich), FluoProbes (empresa Interchim), Abberior Dyes (empresa Abberior), DY and MegaStokes Dyes (empresa Dyomics), Sulfo Cy dyes (empresa Cyandye), HiLyte Fluor (empresa AnaSpec), Seta, SeTau and Square Dyes (empresa SETA BioMedicals), Quasar and Cal Fluor dyes (Biosearch Technologies), SureLight Dyes (empresa Columbia Biosciences), APC, APCXL, RPE, e BPE (empresas Phyco-Biotech, Greensea, Prozyme, Flogen).

[0067] Em certas modalidades da presente invenção, a concentração de antígenos da presente invenção acoplados às microesferas encontra-se na faixa de 0,1 µg/ mL a 500 µg/mL, preferencialmente, de 7,5 µg/ mL a 100

µg/mL.

[0068] Em uma modalidade particular da presente invenção, são providos os tamponantes para acoplamentos dos antígenos da presente invenção às microesferas. Os tampões utilizados são conhecidos na arte. Em modalidades específicas podem ser utilizados os tampões Tris-HCl, Tris, CAPS (ácido N-ciclohexil-3-aminopropanosulfônico), MES (ácido 2-(N-morfolino) etanosulfônico), PBS (tampão de salina fosfatada), CABS (ácido 4-(Ciclohexilamino)-1-butanosulfônico), ACES (ácido N-(2-Acetamido)-2-aminoetanosulfônico), ADA (ácido N-(2-Acetamido)iminodiacético), BES (ácido N,N-Bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfônico), AMP (2-amino-2-metil-1-propanol), AMPD (2-Amino-2-Metil-1,3-Propanodiol; amediol), HEPES (4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico), EPPS (ácido 3-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]propanosulfônico), TAPS (N-[tris(hidroxietil)metil]-3-aminopropanosulfônico), MOPS (3-morfolinopropano-1-sulfônico), PIPES (ácido 1,4-Piperazinedietanesulfônico), TES (N-[tris(hidroximetil)metil]-2-aminoetanosulfônico), Bicina (N,N-bis(2-hidroxietil)glicina), Tricina (N-tris(hidroximetil) metilglicina), Bis-Tris, ou tampões que contenham sais, ácidos ou bases de fosfato, carbonato, citrato, acetato, succinato, hidróxido, fitalato, maleato, cacodilato, veronal, colidina, Tris-maleato, barbital, Tris-aminometano, borato, dimetilglutarato, maleato, amediol, glicina, imidazol, ácido hidrolórico, ácido orto-fosfórico, trietanolamina, glicilglicina, bartibirato, e bicarbonato.

[0069] Em uma modalidade particular da presente invenção, são providos os aditivos das soluções de acoplamento dos antígenos da presente invenção às microesferas. Os aditivos são conhecidos na arte. Em modalidades específicas podem ser utilizados aditivos como imidazol e sais de imidazol; os crioprotetores, glicerol, acetamida, sucrose, trealose, lactose, glicose, sacarose, etilenoglicol, propilenoglicol, MPD (2-metil-2,4-pentanediol), derivados de formamida; detergentes como DDM (dodecil β-D-

maltoside), OGP (octil  $\beta$ -D-glucoside); detergentes de sais biliares, como deoxicolato, colato, glicolato, taurideoxicolato, sal de ácido taurocólico; ácido deoxicólico, ácido cólico, ácido taurideoxicólico, ácido glicólico, sarcosil, n-laurilsarcosina, CTAB (brometo de cetil-trimetilamônio), TTAB (brometo de tetradeciltrimetilamônio), hiamina, N,N-Bis[3-(D-gluconamido)propil]deoxicolamida, digitonina, saponina, N-Decanoil-N-metilglucamina, óxido de dimetildecilfosfina, óxido de dodecildimetilfosfina, N-Nonanoil-N-metilglucamina, N-octanoil-N-metilglucamina, span, tiloxapol; detergentes glicosídicos; detergentes de poli(oxietileno), como família Tween20 a 80, Nonidet-P-40; polímeros de etilenoglicóeter, como Triton X-100 e X-114, e IGEPAL; detergentes de sulfatos de alquil e sais de dodecilsulfatos, como SDS (dodecil sulfato de sódio); detergentes de alquil sulfonatos, sal de docusato de sódio, brometo de alquiltrimetilamônio, cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio, hidróxido de benzetônio, brometo de dimetildiocetadecilamônio, brometo de dodeciltrimetilamônio, monohidrato de cloreto de hexadecilpiridínio, brometo de hexadeciltrimetilamônio, cloreto de metilbenzetônio, brometo de miristiltrimetilamônio, ASB-14, C7zBO, CHAPS, CHAPSO, SB3-10, DDAO, SB3-14, SB3-18, SB3-8, sulfobetaínas, derivados de ciclodextrinas; diversos sais como NaCl; desnaturantes como, ureia, tioureia, guanidina, DMSO (dimetilsufóxido), formamida, ácido acético, ácido tricloroacético, ácido salicílico, ácido sulfosalicílico, bicarbonato de sódio, etanol, formaldeído, paraformaldeído, glutaraldeído; redutores como DTT (ditiotreitól), DTE (ditioeritritól), 2-mercaptoetanol, cisteína, cloreto estanoso (SnCl<sub>2</sub>), ácido ascórbico (AA), iodoacetamida, cloroacetamida, tributilfosfina, hidrocloreto de tris(2-carboxietil)fosfina. TCEP (tris(2-carboxietil)fosfina), e TBTA (1-benzil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil]amina).

[0070] Métodos de detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* são também providos pela presente invenção. Particularmente, são providos

métodos para detecção de anticorpos IgM e IgG para *Toxoplasma gondii* em amostras.

[0071] O método da presente invenção, inclui, em geral, as seguintes etapas:

- (a) prover uma composição de antígenos, compreendendo um dois ou três antígenos de acordo com a presente invenção;
- (b) contatar a composição de antígenos com a amostra a ser testada por um tempo suficiente e sob condições suficientes para formação de complexos anticorpo/ antígeno;
- (c) detectar o complexo antígeno/ anticorpo formado na etapa (b), pela adição de um meio de detecção, capaz de gerar um sinal detectável na presença do referido complexo antígeno/ anticorpo.

[0072] De acordo com um aspecto da presente invenção, as amostras podem ser amostras de sangue total, soro, plasma, urina, saliva, ou outros fluidos biológicos suspeitos de conterem IgG ou IgM para *Toxoplasma gondii*.

[0073] Os meios de detecção podem ser aqueles conhecidos na técnica. Um exemplo não limitativo do meio de detecção pode ser um conjugado compreendido por um anticorpo acoplado a um composto gerador de sinal, capaz de gerar um sinal detectável. Em uma modalidade particular, o referido meio de detecção pode compreender anticorpos anti-IgG ou anti-IgM conjugados a uma molécula geradora de sinal detectável, tal como a molécula de R-ficoeritrina.

[0074] São também providos kits para o imunodiagnóstico de toxoplasmose aguda e crônica. Os kits compreendem composições compreendendo os antígenos da presente invenção, separados ou em uma combinação, e um meio de detecção do complexo antígeno/ anticorpo, o qual pode compreender um conjugado compreendido por um anticorpo acoplado a

um composto gerador de sinal, capaz de gerar um sinal detectável. Em uma modalidade particular, o referido meio de detecção pode compreender anticorpos anti-IgG ou anti-IgM conjugados a uma molécula geradora de sinal detectável, tal como a molécula de R-ficoeritrina.

[0075] A presente invenção será doravante ilustrada por meio de exemplos, os quais não pretendem, de forma alguma, serem limitativos quando ao escopo e a abrangência da presente invenção.

## **Exemplos**

### Exemplo 1- Construção dos Genes Sintéticos

[0076] A construção dos genes sintéticos da presente invenção é uma das soluções técnicas estabelecidas pelos presentes inventores. Os antígenos de *T. gondii* foram selecionados com base no desempenho em imunoenaios publicados, presença de epítomos de células B, presença nas fases infectivas e nas diferentes cepas, e nos níveis de expressão solúvel. A escolha dos fragmentos antigênicos foi também realizada com base na análise de características específicas das sequências proteicas, similaridade entre cepas de *T. gondii*, com outros patógenos, e proteínas humanas. Foram utilizadas informações disponíveis na literatura científica e nas bases de dados Genbank, ToxoDB e IEDB. As sequências de aminoácidos dos antígenos selecionados foram indicadas por publicações científicas de referência, e obtidas a partir de bancos de dados públicos (Genbank). Foram selecionadas sequências da cepa RH da linhagem do tipo I. A partir de sequências de aminoácidos foram geradas as sequências nucleotídicas. As sequências nucleotídicas dos genes sintéticos foram otimizadas sob vários aspectos genéticos visando obter altos níveis expressão em sistemas de expressão bacterianos. As sequências foram projetadas visando a sua clonagem no vetor pET28a, incluindo a possibilidade de expressão da cauda de hexa-histidina N-terminal ou C-terminal. O esquema das construções genéticas pode ser verificado na Figura 1.

[0077] O desenho das sequências nucleotídicas incluiu na



extremidade 5' sítios de restrição para as enzimas de restrição NcoI e BamHI, e na extremidade 3', sítios para as enzimas EcoRI e HindIII. Entre os sítios de restrição na região 5' foram inclusos nucleotídeos espaçadores com o objetivo de colocar a sequência codificante da proteína em fase de leitura, caso a subclonagem seja realizada por digestão com NcoI e EcoRI. Entre os sítios das enzimas EcoRI e HindIII, foram inclusos os códons de terminação TGA e TAA, que se encontram em fase de leitura com a sequência quando subclonada com BamHI e HindIII. Estes sítios de restrição foram inseridos com o objetivo de proporcionar duas alternativas de subclonagem. No caso da subclonagem da sequência utilizando as enzimas BamHI e HindIII, há apenas a transcrição da cauda de hexa-histidina N-terminal, sendo que os dois códons de terminação adicionados entre EcoRI e HindIII determinam a finalização da transcrição. A subclonagem com as enzimas NcoI e EcoRI acarreta na expressão C-terminal da cauda de hexa-histidina. O término de transcrição da sequência é determinado por um códon de terminação presente no pET28a, após a sequência da cauda de histidina na região 3'.

[0078] As sequências foram enviadas para otimização e síntese química. Em seguida, cada sequência foi subclonada separadamente em vetores de expressão contendo o promotor T7 polimerase e sequência codificante para cauda de histidina. As sequências nucleotídicas foram otimizadas para as seguintes características: estrutura secundária do RNAm, distribuição do conteúdo de GC, sequências repetitivas longas, sítios de restrição, e *codon usage*. A similaridade entre sequências proteicas de diferentes linhagens ou cepas de *T. gondii* foi avaliada. Para isto, foi utilizada a ferramenta BLASTp para coleta das sequências depositadas e foram incluídas todas as sequências proteicas não redundantes de *T. gondii*. A análise de similaridade revelou 92%, 90%, 97%, e 92% de similaridade entre os fragmentos proteicos de GRA7, ROPI, p35, e GRA6, e as sequências proteicas das demais cepas. A similaridade de ROPI (aa 85-378) corresponde

a 75%, caso um fragmento de 36 aminoácidos encontrado em cepas atípicas e inexistente no fragmento utilizado nesta invenção seja considerado na análise.

Os resultados desta análise podem ser conferidos na Tabela 1, a seguir.

Tabela 1 – Alinhamentos dos fragmentos antigênicos com cepas de *T. gondii*

Antígeno	Resultados para sequências não redundantes				Localização	Hospedeiros
	Nº de acesso	Cepa	Linhagem	Similaridade		
(aa 19-236)	AAC48314.1	Wiktor		100%	Europa - França	humanos
	AFO54982.1	RH	I	99%	América do Norte - EUA	humanos
	ABV82478.1	GUY-2004-JAG	atípica	98%	Guiana Francesa	Jaguar
	AFO55004.1	WTD3	atípica/II	97%	América do Norte	veado
	ABV82446.1	TgCkBr3	atípica	97%	América do Sul - Brasil	galinha
	AFO55006.1	COUG	atípica	97%	América do Norte - Canadá	puma
	ABV82448.1	TgCkbr6	outra	97%	América do Sul - Brasil	galinha
	ABV82445.1	IPB-2003-COG	atípica	97%	Europa - Bélgica	humanos
	XP_002367613.1	ME49	II	97%	América do Norte - EUA	ovelha
	AFO54992.1	ME49	II	97%	América do Norte - EUA	ovelha
	ABE77385.1	RMS-2001-MAU	atípica/II	97%	Europa (França)	x
	AFO55013.1	TgSoUs9	atípica	96%	América do Norte	lontra-marinha
	AFO55008.1	GUYKOE	atípica	96%	América do Sul - Guiana Francesa	humanos
	ABE69200.1	RUB	atípica	96%	América do Sul - Guiana Francesa	humanos
	ABF13219.1	GUY-2004-LAB	atípica	96%	América do Sul - Guiana Francesa	humanos
	ABV82451.1	IPP-2002-URB	atípica	92%	Europa - França	humanos
	ABE69202.1	RMS-1994-LEF	atípica	93%	Europa - França	humanos
	ABV82473.1	P89	atípica	92%	América do Norte	porco
	ABV82444.1	ENVL-2002-MAC	atípica/III	92%	América Central - Caribe	macaco
	AFO55037.1	TgCatBr9	atípica	92%	América do Sul - Brasil	gato
AFO55023.1	CASTELLS	atípica	92%	América do Sul - Uruguai	ovelha	
AFO55022.1	CAST	atípica	92%	América do Norte	humanos	
(aa 85-378)	AAA69859.1	RH	I	100%	América do Norte	humanos
	AAV80418.1	KI-1	I	99%	Ásia - Coreia do sul	
	KFH112987.1	MAS	atípica	94%	Europa - França	humano
	EPR60808.1	GT1	I	90%	América do Norte	cabra
	KFG40652.1	P89	atípica	93%	América do Norte - EUA	porco
	KFG44710.1	GAB2-2007-GAL-OOM2	Sub. direta	91%	África - Gabão	galinha
	KFH02463.1	VAND	atípica	77%	América do Sul - Guiana Francesa	humanos
	KFG57805.1	RUB	atípica	75%	América do Sul - Guiana Francesa	humanos
P35	AAD55381.1	RH	I	100%	América do Norte	humanos
	ESS30443.1	VEG	III	100%	América do Norte	humanos
	ABH03637.1	RH	I	100%	América do Norte	humanos
	AAG32058.1	RH	I	100%	América do Norte	humanos
	XP_002369526.1	ME49	II	99%	América do Norte - EUA	ovelha
	KFG46645.1	P89	atípica	99%	América do Norte - EUA	porco
	KFH15086.1	MAS	atípica	97%	Europa - França	humanos
	AAV96749.1	Não publicado		100%	x	x
(aa 30-230)	AAC37235.1	RH	I	100%	América do Norte e Europa	humanos
	Q27003.2	RH	I	99%	América do Norte e Europa	humanos
	AER12184.1	RH	I	99%	América do Norte e Europa	humanos
	BAE86889.1	x	x	99%	Ásia - Japão	porco
	BAE86895.1	x	x	98%	Ásia - Japão	porco
	BAE86892.1	x	x	98%	Ásia - Japão	porco
	AAF60338.1	M7741	III	98%	América do Norte (EUA) e Europa	ovelha
	CAG25736.1	SH	x	98%	Ásia - China	humanos
	ABP01630.1	TgCkBr3	atípica	96%	América do Sul - Brasil	galinha
	ABP01613.1	GUY-2004-LAB	atípica	96%	América do Sul - Guiana Francesa	humanos
	AER12185.1	Izatnagar	III	96%	Ásia - Índia	galinha
	AAF60337.1	NED	III	96%	x	x
	ABP01615.1	GUY-2001-DOS	atípica	96%	América do Sul - Guiana Francesa	humanos
	BAE86893.1	x	x	96%	Ásia - Japão	porco
	EPR60010.1	GT1	I	96%	América do Norte	cabra
	AUX11010.1	Tgshir2	x	94%	Ásia - Iran	ovelha
	AAV33105.1	CSL5531	x	94%	x	Lontra-marinha

ABA26699.1	GUY-2004-JAG	atípica	94%	América do Sul - Guiana Francesa	Jaguar
AFO54799.1	TgCgCa1	atípica	94%	América do Sul e do Norte	puma
ABV82700.1	TgSoUs7	atípica	92%	América do Norte	Lontra-marinha
AFO54790.1	WTD1	atípica/I	92%	América do Norte - EUA	veado

Nota: Informações referentes à linhagem, origem geográfica e hospedeiro do isolado podem ser encontrados no Genbank, no estudo publicado indicado na página de acesso, ou em Khan et al. (2007) e (2011), Souza et al. (2008), e Su et al. (2012). Linhagem atípica/I, II ou III: indica que a linhagem atípica está relacionada a um dos tipos. EUA (Estados Unidos da América).

### Exemplo 2 - Processos de Purificação dos Antígenos

[0080] Todos os clones de pET28a contendo os insertos foram transformados por choque térmico em bactérias *E. coli* da cepa BL21-star (DE3), as quais foram cultivadas em meio LB. Foi realizado o pré-inóculo de uma colônia de cada clone em 100 ml de meio LB contendo 50 µg/ml de canamicina em frasco de erlenmeyer de 1 L. Após 16 h, 20 ml desta cultura foram inoculados em 5 frascos erlenmeyer de 2 L para volume final de LB de 400 ml contendo 50 µg/ml de canamicina. Os inóculos foram mantidos a 37°C sob agitação de 200 rpm até atingir a DO (Densidade Óptica) a 600 nm de 0.6 a 0.8 no espectrofotômetro. Então, os cultivos receberam 1 mM do indutor de expressão IPTG (isopropil-β-D-tiogalactpiranosídeo). Os frascos foram incubados a 37°C por 4h sob a agitação de 200 rpm. O volume total de indução foi centrifugado por 15 minutos a 8000 rpm e as células sedimentadas foram imediatamente congeladas a -20 °C. Os pellets foram descongelados com tampão A de purificação sob ação de vórtex. O extrato foi obtido após 20 passagens em microfluidificador. Em seguida, o lisado foi centrifugado em ultracentrífuga por 1 hora a 4 °C e 30000g. O sobrenadante da centrifugação, correspondente ao extrato, foi separado e filtrado em membrana de 0,45 µm. Imediatamente, o extrato foi aplicado no reservatório de injeção da amostra no cromatógrafo.

[0079] A composição dos tampões e parâmetros de purificação foram estabelecidos pelos presentes inventores, e resultaram em maiores rendimentos e na obtenção de proteínas mais puras. Estas condições permitem agora a purificação rápida e eficiente dos antígenos.

[0080] As purificações dos antígenos recombinantes foram realizadas em cromatógrafo semi-automatizado. A Tabela 2 apresenta todos os

parâmetros de indução de expressão e purificação já otimizados utilizados para cada proteína.

Tabela 2 – Parâmetros de expressão e purificação das proteínas recombinantes

Vetor Ag	Ag Expressão	Purificação				
	Vol. Cultura Temperatura Tempo Concentração IPTG	Etapa	Método Cromatográfico	Coluna e Volume	Tampões de purificação	
pET28a- GRA7	400 mL 37°C 4h 1 mM	1ª	Afinidade à resina de níquel	Hisrap HP 1mL	1ª	Tris-HCl 50 mM pH 9, NaCl 300 mM, glicerol 5%, PMSF 0,5 mM, DOC 0,5%, imidazol 40 mM
					1B	Tris-HCl 50 mM pH 9,0, NaCl 300 mM, glicerol 5%, PMSF 0,5 mM, DOC 0,5%, imidazol 500 mM
pET28a-p35	400 mL 37°C 4h 1 mM	1ª	Afinidade à resina de níquel	Hisrap HP 1mL	1A	50 mM CAPS pH 10,7, NaCl 300 mM, glicerol 5%, PMSF 0,5 mM, DOC 0,5%, imidazol 20 mM
					1B	50 mM CAPS pH 10,7, NaCl 300 mM, glicerol 5%, PMSF 0,5 mM, DOC 0,5%, imidazol 500 mM
pET28-a- GRA6	400 mL 37°C 4h 1 mM	1ª	Afinidade à resina de níquel	Hisrap HP 1mL	1A	Tris-HCl 50 mM pH 9,0, NaCl 300 mM, glicerol 5%, PMSF 0,5 mM, DOC 0,5%, imidazol 40 mM
					1B	Tris-HCl 50 mM pH 9,0, NaCl 300 mM, glicerol 5%, PMSF 0,5 mM, DOC 0,5%, imidazol 500 mM
pET28a- ROP1	400 mL 37°C 4h 1 mM	1ª	Afinidade à resina de níquel	Hisrap HP 1mL	1A	Tris-HCl 50 mM pH 9,0, NaCl 300 mM, glicerol 5%, PMSF 0,5 mM, DOC 0,5%, imidazol 20 mM
					1B	Tris-HCl 50 mM pH 9,0, NaCl 300 mM, glicerol 5%, PMSF 0,5 mM, DOC 0,5%, imidazol 500 mM
		2ª	Troca iônica	Hitrap Q sepharose 1 mL	2A	Tris-HCl 50 mM pH 9,0, NaCl 0,1 M, glicerol 10%, 2-mercaptoetanol 7 mM, DOC 1%, PMSF 0,5 mM
					2B	Tris-HCl 50 mM pH 9,0, NaCl 1 M, glicerol 10%, 2-mercaptoetanol 7 mM, DOC 1%, PMSF 0,5 mM

Nota: PMSF, Fluoreto de Fenil Metano Sulfonila; DOC, detergente Deoxicolato de sódio.

[0081] Após as purificações, todas as proteínas foram obtidas solúveis e com altos níveis de pureza, como pode ser verificado na Figura 2. Os SDS-PAGEs e *Western blottings* apresentados na Figura 2 foram realizados com frações purificadas dos antígenos. M. marcador de peso molecular Benchmarck Invitrogen. *Western blottings* para detecção da cauda de hexa-histidina dos antígenos purificados. Pesos moleculares de GRA7, GRA6, P35 e ROP1 correspondem à 27,5, 35, 18 e 35 kDa, respectivamente.

[0082] Os sistemas de expressão e purificação desenvolvidos nesta invenção permitiram a obtenção dos antígenos recombinantes da presente invenção de forma abundante e solúvel. Os sistemas de purificação desenvolvidos resultaram em antígenos altamente purificados. Esta característica é especialmente relevante no que se refere à qualidade dos imunoenaios que incluem estes antígenos na sua elaboração, pois anticorpos anti-*E. coli*, presentes no soro humano, podem interagir com proteínas de *E. coli*, gerando resultados falso-positivos. Além disso, essas proteínas contaminantes podem competir com antígenos pelos sítios de ligação nas fases sólidas dos imunoenaios, o que pode acarretar na perda de desempenho do ensaio. Altos níveis de pureza são também importantes para a estabilidade dos antígenos, pois entre os contaminantes de *E. coli* existem muitas enzimas proteolíticas que causam a degradação dos antígenos expressos.

#### Exemplo 3 - Composição dos tampões de armazenamento para estabilização dos antígenos

[0083] As condições de armazenamento são soluções técnicas desenvolvidas pelos presentes inventores, e resultaram na obtenção de proteínas monoméricas pelo menos até o 1º descongelamento. A ausência de agregados de proteínas após o descongelamento previne perdas por precipitação, e garante a não interferência na interação antígeno-anticorpo nos imunoenaios relacionada à agregação. Estas informações são críticas para posterior utilização dos antígenos em imunoenaios.

[0084] Para atingir este objetivo, foram determinadas quais são as composições químicas das soluções de armazenamento e concentrações não agregantes de antígeno, os quais foram avaliados através de dados de agregação obtidos por meio da técnica de DLS (*Dynamic Light Scattering*). Após a definição destes quesitos, foram realizadas as análises de estabilidade pós-descongelamentos. Estes testes consistiram de ciclos de congelamento e descongelamento de alíquotas dos antígenos purificados nas condições não

agregantes, seguidos de centrifugação e análise por DLS e SDS-PAGE. As concentrações foram determinadas através do kit Qubit (Qiagen) e absorvância a 280 nm em tampão ureia 8 M.

[0085] Conforme dados da Tabela 3, todos os antígenos armazenados nas condições não agregantes definidas por DLS apresentaram-se monoméricos pelo menos até o 1º descongelamento.

TABELA 3 – Dados de DLS referentes ao 1º descongelamento dos antígenos nas condições não agregantes de armazenamento

Ag	Tampão de Estoque	Conc. (mg/mL)	Raio	%Pd	Massa (kDa)	Massa Teórica	%Intensidade
GRA7	Tampão 1A de eluição, 275 mM imidazol	4,5	2,5 ± 0,6	8,9 ± 3,1	30,8 ± 15,6	27,5	2,0 ± 0,7
ROPI	Tampão 2A de eluição, 450 mM NaCl	3,0	2,81 ± 0,3	10 ± 3	38 ± 8,2	35,4	2 ± 0,7
p35	Tampão 1A de eluição, 95 mM imidazol	4,0	3 ± 0,1	10,2 ± 6,5	26 ± 4,2	18	5,55 ± 0,8
GRA6	Tampão 1º de eluição, 20 mM imidazol	3,0	4,7 ± 0,58	12,8 ± 3,3	33,5 ± 7,5	24	14,5 ± 4,98

NOTA: Conc. (Concentração), Pd (polidispersividade)

[0086] Estes dados são suportados pelas imagens dos antígenos nos SDS-PAGEs da Figura 3, assim como pelas medidas das concentrações proteicas anteriores e posteriores aos descongelamentos e centrifugações.

#### Exemplo 4- Acoplamentos a microesferas

[0087] Na metodologia de microarranjo líquido, microesferas, ou *beads*, servem como suporte sólido para a captura de diferentes moléculas-alvo, que são detectadas por uma ou mais moléculas de captura acopladas à superfície das microesferas, como anticorpos, antígenos, peptídeos ou ácidos nucléicos. Na fabricação das microesferas, são adicionados internamente dois fluoróforos. Quando excitados, os fluoróforos emitem luz com picos de fluorescência com comprimentos de onda distintos formando uma fluorescência peculiar, que é associada a um número de identificação da microesfera, permitindo assim, a criação códigos de cor e a realização de ensaios singleplex ou multiplex. A ligação da molécula-alvo à molécula de captura é detectada por fluorescência utilizando-se, por exemplo, um

anticorpo ou sonda marcada com a molécula fluorescente de ficoeritrina (PE), os quais se ligam à molécula-alvo. A ficoeritrina é excitada por lasers, e a fluorescência emitida é proporcional à concentração da molécula-alvo na amostra. As microesferas são analisadas por citometria de fluxo. O sistema Luminex® consiste de um processador de sinal digital acoplado a um citômetro de fluxo compacto equipado com dois lasers de diodo, um laser verde de 532 nm para excitar a ficoeritrina conjugada, utilizada como repórter, e outro laser vermelho de 635 nm, para excitar os fluorocromos internos da microesfera. Os fluoróforos internos emitem fluorescência no comprimento de onda entre 658 nm e 712 nm, portanto não apresentam sobreposição espectral com o repórter de R-ficoeritrina, que emite a 578 nm. As microesferas desenvolvidas para o sistema medem 5,6 µm de diâmetro e são partículas de poliestireno extremamente uniformes que foram ligadas de forma cruzada durante a polimerização para efeitos de estabilidade física e térmica. A microesfera utilizada contém grupos carboxila na superfície para ligação covalente com grupos amino de proteínas, e apresentam propriedades paramagnéticas, suscetíveis à influência de um campo magnético, acionado com o objetivo de atrair as microesferas para o fundo de um poço, permitindo a realização de lavagens (site oficial da LUMINEX). Todos os acoplamentos dos antígenos às microesferas foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante (Luminex Corp, Austin-Texas, EUA). Para o acoplamento dos antígenos ou combinação desses, foi escolhido um código de microesfera para cada ligante. A solução-estoque de microesferas paramagnéticas MagPlex™-C 1, 25.107 beads/ml foi homogeneizada com o auxílio do vórtex Genie-2® e banho-sonicador Ultrasonic®, se realizando 3 ciclos seguidos de agitação no vórtex por 30 segundos, seguida de sonicação por 30 segundos. Foram transferidos 80 µl da solução-estoque (12.500.000 microesferas/ml) para tubos de baixa ligação, correspondendo a 1.000.000 de microesferas a serem acopladas. As microesferas foram lavadas 2 vezes com

200 µl de tampão fosfato de sódio 100 mM pH 6.2 em estante magnética de tubos e posteriormente suspensas em 80 µl do mesmo tampão. A fim de ativar as carboxilas das microesferas tornando-as receptivas à ligação com os grupos amino livres das proteínas, adicionou-se ao poço 10 µl da solução de Sulfo-NHS 50 mg/ml seguida da adição de 10 µl da solução de EDC 50 mg/ml, ambos dissolvidos em água 18,2 mΩ no momento do uso.. Os tubos seguiram para incubação em ambiente escuro por 20 minutos a 25°C sob agitação de 600 rpm. Em seguida, os tubos foram colocados no suporte magnético, e o conteúdo foi aspirado. Foram adicionados 100 µl do tampão de acoplamento escolhido ao tubo. Após 3 lavagens das microesferas em tampão de acoplamento, transferiu-se ao poço 100 µl da diluição do(s) antígeno(s) em concentração definida no tampão de acoplamento eleito. Incubou-se em ambiente escuro por 2 horas a 37°C sob a agitação de 1000 rpm. Concluída a incubação, os tubos foram colocados no suporte magnético e o poço foi lavado três vezes com 100 µl de tampão de bloqueio/estoque. O volume de 200 µl de tampão de bloqueio foi adicionado após as lavagens para ressuspensão final das microesferas.

[0088] A determinação da melhor composição de aditivos de tampão, concentração de antígeno e pH de solução para o acoplamento dos antígenos às microesferas são soluções técnicas reveladas na presente invenção. Este procedimento acarretou no aumento expressivo do desempenho dos ensaios, e na redução dos gastos com antígenos durante os acoplamentos.

[0089] As condições de acoplamento dos antígenos purificados às microesferas podem ser conferidas na Tabela 4.

TABELA 4 – Composição dos tampões e concentrações de acoplamento para detecção de IgG e IgM anti-*T. gondii*

Ag	Para Detecção de:	Composição do Tampão de acoplamento às microesferas	Concentração de Ag (µg/ml.)
GRA7	IgG	PBS 100 mM pH 7.2, Glicerol 1%, Tween 20 0.1%	7,5
ROP1	IgG	Acetato de sódio 100 mM pH 5.0, Glicerol 1%, Tween 20 0.1%	50
	IgM	Fosfato 100 mM pH 8.0, Glicerol 1%, Tween 20 0.1%	50
p35	IgG	PBS 100 mM pH 7.0, Glicerol 1%, Tween 20 0.1%	50
	IgM	MÊS 10 mM pH 5,5, Glicerol 1%, Tween 20 0,1%	100
GRA6	IgM	Acetato de sódio 10 mM pH5,0, Glicerol 1%, Tween 20 0,1%	50



Exemplo 5 -Ensaio para detecção de IgG e IgM anti-*T. gondii*

[0090] Os ensaios para avaliação do potencial dos antígenos foram realizados em formato *singleplex*, ou seja, cada poço de amostra recebeu 2500 microesferas contendo apenas um antígeno acoplado. Os ensaios incluíram uma primeira incubação das microesferas com a amostra diluída 1:200 por 15 minutos a 37°C sob agitação de 300 rpm, seguida de lavagens. A interação dos antígenos acoplados com anticorpos específicos presentes em amostras de sangue ocorreu através da interação de anticorpos anti-IgG humano (Moss, GTIG001) na diluição 1:1000 ou anti-IgM humano na diluição de 1:750 (Moss, GTIM001), ambos conjugados à molécula fluorescente de R-ficoeritrina. Foi realizada segunda incubação por 15 minutos a 37°C sob agitação de 300 rpm. Após lavagens, as microesferas seguiram para leitura do MFI (Intensidade Mediana de Fluorescência) no equipamento Luminex 200®.

[0091] Com relação aos ensaios realizados com amostras de soro, o painel utilizado para avaliar os ensaios de detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* incluiu 83 amostras IgG anti-*T. gondii* positivas e 30 amostras negativas. O painel utilizado para avaliar os ensaios de detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii* incluiu 78 amostras IgM anti-*T. gondii* positivas e 32 amostras negativas. As amostras foram previamente caracterizadas quanto à avidéz e à presença de IgG e IgM anti-*T. gondii* através de ensaios imunoenzimáticos fluorescentes (ELFA) do sistema VIDAS®, bioMérieux - TOXO IgG avidity, TOXO IgG, e TOXO IgM.

[0092] A avaliação do desempenho dos ensaios foi realizada com base nos valores de sensibilidade e especificidade, área sobre a curva ROC, média de MFI das amostras positivas dividido pela linha de corte, e gráficos de dispersão.

[0093] Os valores de MFI (Intensidade Mediana de Fluorescência) foram obtidos subtraindo o valor de background (poço sem soro adicionado) da mediana de MFI de cada amostra. A linha de corte foi ajustada para cada

antígeno, e foi definida pelo valor mais alto de MFI das amostras negativas, o que ofereceu a maior sensibilidade quando à especificidade atingiu 100%. As amostras foram classificadas como "positivas" ou "negativas" de acordo com os valores da linha de corte para cada antígeno específico.

[0094] A Figura 4 apresenta o gráfico de dispersão correspondente aos ensaios *singleplex* para detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii*.

[0095] A Figura 5 apresenta o gráfico de dispersão correspondente aos ensaios *singleplex* para detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii*.

#### Exemplo 6- Análise Combinada dos Antígenos

[0096] Esta solução técnica proveu ensaios mais sensíveis. Dentre 8 antígenos avaliados neste trabalho, foram selecionados os 3 antígenos que forneceram ensaios para a detecção de IgG e IgM com melhor desempenho geral e específico para a detecção de amostras com perfil agudo de infecção. O valor de sensibilidade geral (combinada) foi calculado considerando que todas as amostras foram analisadas pelos três antígenos, e o resultado final para cada amostra corresponde à combinação dos resultados dos antígenos. Dessa forma, as amostras verdadeiramente positivas foram consideradas positivas, caso tenham apresentado resultados positivos para pelo menos um antígeno. Para ambos cálculos de sensibilidade individual e geral, a especificidade foi ajustada para 100%.

[0097] Conforme a Tabela 5, os 3 antígenos da presente invenção, GRA7, ROPI e p35, em conjunto, foram capazes de detectar 100% das amostras IgG positivas. Com exceção de 2 amostras, todas as amostras apresentaram resultados positivos para os 3 antígenos. As amostras apresentaram valores variados de MFI/linha de corte entre os antígenos, indicando que o uso combinado oferece ensaios com maior desempenho. Como pode ser observado na Tabela 5, os 3 antígenos da presente invenção, p35, GRA6 e ROPI, em conjunto, foram capazes de detectar 95% das amostras IgM positivas. Porém, 100% das amostras agudas e intermediárias

(avidez entre 0 e 0,3), as quais apresentam prioridade diagnóstica, apresentaram resultados positivos para o antígeno ROP1 ou P35.

TABELA 5

Ensaio <i>singleplex</i> - IgG				Ensaio <i>singleplex</i> - IgM			
Antígenos	GRA-7	ROP-1	P35	Antígenos	P35	GRA-6	ROP-1
Sensib. individual*	100%	98%	100%	Sensib. individual*	90%	72%	82.5%
Linha de corte do ensaio	74	35	41	Linha de corte do ensaio	194	79	146
Sensib. combinada*	100%			Sensib. combinada* - agudas e interm.	100%		
				Sensib. combinada* - todas amostras	95%		
Identificação amostras IgG +	MFI das amostras positivas			Identificação amostras IgM +	MFI das amostras positivas		
LPR_20110228	396	472	605	1	343	151	497
LPR_20110210	243	161	12	30	1642	661	2311
LPR_20110113	57	635	107	<b>LPR_20110228</b>	<b>396</b>	1772	315
LPR_20110131	178	254	8	<b>LPR_20110224</b>	<b>360</b>	1187	162
LPR_20110210	244	166	268	<b>LPR_20110224</b>	<b>358</b>	1484	372
LPR_20110217	307	165	71	<b>LPR_20110201</b>	<b>180</b>	2078	731
LPR_20110217	312	264	115	<b>LPR_20110218</b>	<b>323</b>	708	179
LPR_20110228	399	2116	286	<b>LPR_20110114</b>	<b>69</b>	1643	382
LPR_20110201	180	816	674	<b>LPR_20110225</b>	<b>367</b>	1219	372
LPR_20110114	69	2100	37	<b>LPR_20110125</b>	<b>126</b>	858	169
LPR_20110225	367	345	195	<b>LPR_20110210</b>	<b>240</b>	1957	419
LPR_20110107	22	301	114	<b>LPR_20110210</b>	<b>237</b>	1620	327
LPR_20110203	192	1384	489	<b>LPR_20110215</b>	<b>285</b>	959	204
LPR_20110224	358	736	891	<b>LPR_20110225</b>	<b>394</b>	391	120
LPR_20110107	40	988	660	<b>LPR_20110217</b>	<b>319</b>	1091	288
LPR_20110107	33	2067	261	<b>LPR_20110225</b>	<b>366</b>	404	103
LPR_20110110	45	843	167	<b>LPR_20110131</b>	<b>164</b>	871	193
LPR_20110202	191	1642	257	<b>LPR_20110106</b>	<b>06</b>	2661	596
LPR_20110225	366	422	101	<b>LPR_20110215</b>	<b>278</b>	178	42
LPR_20110203	206	1803	385	<b>LPR_20110202</b>	<b>189</b>	409	78
LPR_20110202	233	1237	515	<b>LPR_20110225</b>	<b>368</b>	796	211
LPR_20110114	81	1951	557	<b>LPR_20110225</b>	<b>388</b>	1547	312
LPR_20110203	201	1340	348	LPR_20110114	70	1761	506
LPR_20110106	06	659	550	LPR_20110223	346	679	152
LPR_20110203	200	3179	567	LPR_20110225	363	1329	292
LPR_20110225	370	2593	207	LPR_20110121	113	1290	344
LPR_20110209	230	1894	564	LPR_20110203	204	749	102
LPR_20110217	316	1009	418	LPR_20110211	274	1810	635
LPR_20110107	18	1027	334	LPR_20110127	143	482	105
LPR_20110107	19	1719	694	LPR_20110107	23	901	253
LPR_20110225	373	2676	337	LPR_20110301	416	347	73
LPR_20110125	125	2315	539	LPR_20110113	67	324	111
LPR_20110224	360	2906	703	LPR_20110209	230	608	126
LPR_20110216	293	2124	35	LPR_20110225	391	380	52
LPR_20110211	259	790	545	LPR_20110127	145	344	70
LPR_20110131	165	2181	802	LPR_20110107	40	1252	213
LPR_20110217	311	2126	592	LPR_20110210	238	177	54
LPR_20110210	238	4446	374	LPR_20110107	17	896	281
LPR_20110225	391	6184	824	LPR_20110211	260	291	93
LPR_20110126	138	2239	490	LPR_20110107	18	293	55
LPR_20110225	365	830	156	LPR_20110120	95	479	72
LPR_20110127	148	174	3307	LPR_20110216	302	1008	219
LPR_20110208	226	4796	813	LPR_20110222	334	400	67
LPR_20110127	147	2187	482	LPR_20110107	22	1025	197
LPR_20110217	308	1653	1290	LPR_20110303	426	530	87

Nota: Sensib. (sensibilidade). Para o cálculo de sensibilidade geral (combinada), as amostras foram consideradas positivas, caso tenham apresentado resultados positivos para pelo menos um antígeno. Para ambos cálculos de sensibilidade individual e geral, a especificidade foi ajustada para 100%. MFI (Intensidade Mediana de Fluorescência). Os valores de fluorescência das amostras IgG e IgM positivas (de acordo com ensaios do sistema VIDAS Toxo utilizados na caracterização do painel) acima da linha de corte do respectivo ensaio foram marcados e correspondem a resultados positivos.

[0098] A margem de erro intrínseca do ensaio corresponde à relação entre a área da curva Gaussiana formada pelas amostras negativas pela área

formada pela sobreposição das curvas Gaussianas positivas e negativas. O valor foi expresso como uma porcentagem e indica a probabilidade estatística de um resultado positivo estar errado.

[0099] Foi observada uma redução significativa da margem de erro geral calculada para os ensaios combinados para detecção de anticorpos IgG (0,000079%) e IgM (0,038%) em comparação com as margens de erro isoladas para a detecção de anticorpos IgG por GRA7, ROP1, e para a detecção de IgM por p35, e ROP1, GRA6 e p35, que corresponderam a 0,9%, 0,8% e 1,1% e 2,3%, 15% e 11%, respectivamente. Esse valor foi obtido através da multiplicação das margens de erro isoladas, refletindo a probabilidade de uma amostra tornar-se negativo para três antígenos simultaneamente.

[00100] Os antígenos foram também avaliados com relação ao perfil de resposta imune nas fases da infecção. As amostras foram divididas em três grupos de avidéz de IgG: infecção recente (avidéz 0-0,3), infecção pós-aguda (avidéz 0,31-0,5) e infecção crônica (0,51-0,72). Para tornar possível a comparação de ensaios com diferentes linhas de corte, a MFI de cada amostra foi dividida pelo valor da linha de corte do respectivo ensaio. A Figura 6 apresenta o perfil de resposta imune relativa aos títulos de IgG e IgM específicos de acordo com os grupos de infecção.

[00101] De acordo com os gráficos da Figura 6, os antígenos empregados na detecção de anticorpos IgM específicos geraram valores maiores de MFI/linha de corte para amostras agudas IgM positivas, e sofreram decaimento com o decorrer da infecção. O mesmo perfil é encontrado para o antígeno p35 quando utilizado na detecção de IgG, enquanto que os antígenos ROP1 e GRA7 apresentam um aumento desses valores até a fase pós-aguda, seguido de decaimento, indicando a importância destes na evolução da infecção.

[00102] O diagnóstico preciso da infecção aguda é fundamental para o

manejo clínico dos indivíduos infectados. Por esta razão, é de vital importância obter antígenos que detectem com alta sensibilidade anticorpos de fase aguda. Esta invenção satisfaz este requisito diagnóstico ao empregar marcadores de infecção aguda, podendo inclusive gerar testes com um limite de detecção inferior, proporcionando o diagnóstico mais precoce da toxoplasmose.

[00103] Dentre as amostras classificadas como IgG negativas pelos ensaios de ELFA (VIDAs, Biomèrriex), cinco (1, 8, 14, 21 e 30) apresentaram sinal muito elevado de fluorescência para um ou mais antígenos utilizados nesta invenção. O mesmo foi observado para cinco amostras IgM negativas (8, 11, 20, E5 e H10) de acordo com os ensaios de ELFA/IgM do sistema Vidas. A amostra 8 apresentou MFIs relativos à captura de IgG e IgM anti-*T. gondii* muito intensos para os antígenos utilizados nesta invenção. As amostras E5 e H10, classificadas como IgM negativas, apresentaram alta avidéz de IgG de acordo com o sistema VIDAS. Isto indica que são amostras de indivíduos crônicos, previamente infectados pelo parasita, portanto, seus títulos de IgM decaíram até valores abaixo da linha de corte deste ensaio. Entretanto, estas amostras apresentaram resultados IgM positivos para os antígenos utilizados nesta invenção. O sinal de IgG da amostra 30 corresponde à linha de corte do ensaio de ELFA do Sistema VIDAS TOXO IgG, sendo tecnicamente qualificada como IgG negativa. Contudo, essa amostra apresenta baixa avidéz de IgG e IgM positivo, o que a caracteriza como amostra de infecção recente. Neste caso, pode se inferir que os títulos de IgG estão aumentando, porém ainda não foram detectadas pelo ensaio do sistema VIDAS.

[00104] O estágio de captura dos ensaios do sistema VIDAS – IgG e IgM, correspondem a um extrato de *T. gondii*, que contém um *pool* de antígenos. Atualmente, é amplamente reconhecido que devido à uma série de fatores, os indivíduos infectados pelo *T. gondii* exibem diferentes

padrões de produção de anticorpos contra uma grande variedade de antígenos. Dessa forma, tem sido demonstrado em ensaios de ELISA (Enzyme Linked Immunoassay) que alguns indivíduos apresentam títulos de anticorpos muito elevados contra determinados antígenos de *T. gondii* e fracos para outros. Nos ensaios apresentados no presente documento, apenas um antígeno foi empregado como molécula de captura, oferecendo uma quantidade maior de sítios para a ligação de anticorpos específicos quando comparada àquelas oferecidas em lisados ou extratos de *T. gondii*. Por isso, caso a amostra em questão contenha altos títulos de anticorpos específicos contra um ou mais antígenos em detrimento dos demais, é possível que sejam tecnicamente qualificadas como negativas em ensaios que utilizam extratos ou lisados de *T. gondii*, enquanto apresentam sinais elevados em ensaios contendo apenas um antígeno.

[00105] Para confirmar esta hipótese, foram realizados ensaios *singleplex* para detecção de IgG utilizando separadamente como molécula de captura um lisado de *T. gondii* (Fitzgerald, nº 30-AT56) e dois extratos: TOXII e TOXIII (Meridian Life Science, # 8122 e # 8131). O lisado e os extratos de *T. gondii* foram acoplados usando a maior concentração não saturante dentre as avaliadas, de forma a obter o melhor desempenho possível. Além disso, foi realizado um acoplamento triplo simultâneo dos antígenos GRA7, ROPI e p35 utilizados na detecção de anticorpos IgG. A fim de evitar a saturação das microesferas que causa a perda de MFI, as concentrações de acoplamento de cada antígeno corresponderam à 1/3 da melhor concentração padronizada para cada antígeno isoladamente. Estas microesferas contendo os 3 antígenos foram também ensaiadas em formato *singleplex*. A Figura 7 mostra os resultados de IgG e IgM das amostras investigadas.

[00106] As amostras investigadas apresentaram resultados negativos para o lisado e extrato, com exceção da amostra 30. Esta amostra foi

confirmada como positiva para IgG no ensaio com TOXII, contudo apresentou resultados negativos nos ensaios com TOXIII e lisado.

[00107] Essas diferenças podem ser explicadas pelas variações quantitativas e qualitativas quanto à composição de antígenos entre o lisado, TOXIII e TOXII. A redução da quantidade ofertada de sítios de ligação de anticorpos em GRA7 nos ensaios com microesferas acopladas com os 3 antígenos simultaneamente causou a negatificação da amostra 14, que dentre as avaliadas, apresentou menor valor de MFI/cutoff. Este efeito, causado pela redução dos sítios ofertados, simula aquele encontrado em ensaios com lisados ou extratos de *T. gondii*.

[00108] As amostras discrepantes negativas foram analisadas quanto ao valor p considerando uma hipótese nula. Para garantir a qualidade desta análise, os resultados de ensaios foram avaliados pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk considerando linha de corte correspondente a valor de p acima de 0,05. Se necessário, os valores de MFI foram convertidos em valores logarítmicos, a fim de obter histogramas normais. As médias e desvios-padrões de cada grupo foram calculados, os quais foram utilizadas nos cálculos das distribuições normais para cada grupo de amostras. A partir destes dados, foram definidos os valores de probabilidade de um determinado resultado ser negativo.

[00109] Paralelamente, as amostras investigadas foram analisadas quanto à presença de anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii* e Fator reumatóide por um segundo ensaio comercial distinto do ensaio do sistema Vidas (bioMèrriex), baseado no método de ELFA, previamente utilizado na caracterização do painel das amostras. Para isso, foram utilizados os ensaios comerciais do sistema Architect (Abbott Diagnostics Division), o qual se baseia no método de CMIA. Apenas as amostras com volume suficiente foram enviadas para estas análises. Os resultados das análises podem ser conferidos na Tabela 6.

TABELA 6 - Resultados das amostras investigadas nos testes Vidas e Architect e valores de p dos resultados dos ensaios *singleplex*

Amostras	Vidas bioMérieux ELFA		Architect Abbott, CMIA		Tox 8121	GRA7	ROP1	p35	ROP1	p35	GRA6
	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgG			IgM		
1	Neg.	Pos.	---	---	0.025	<0.001	0.022	<0.001	0.001	<0.001	0.001
30	Neg.; baixa av.	Pos.	---	---	<0.001	<0.001	0.013	<0.001	0.001	<0.001	0.001
8	Neg.	Neg.	Neg.	Neg; FR(-)	0.990	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.037
14	Neg.	Neg.	Neg.	Neg; FR(-)	0.985	<0.001	0.901	0.827	0.966	0.959	0.92
21	Neg.	Neg.	---	---	0.984	0.957	0.935	0.200	0.957	0.863	0.589
11	Neg.	Neg.	---	---	0.999	0.993	0.992	0.995	0.944	0.860	0.852
20	Neg.	Neg.	Neg.	Neg; FR(-)	0.999	0.993	0.992	0.995	0.045	0.956	0.919
29	Neg.	Neg.	Neg.	Neg; FR(-)	0.805	0.990	0.991	0.993	0.139	0.063	0.017
E5	Pos.; av. alta	Neg.	Pos.	Neg; FR(-)	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.173	0.022	0.798
H10	Pos.; av. alta	Neg.	---	---	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.018	<0.001	<0.001

Nota: Neg. (resultado negativo); Pos. (resultado positivo). Av. (avidez). Os valores de p dos resultados investigados estão marcados em três categorias: cinza escuro, médio e claro correspondem a valores de p inferiores a 0.05, 0.15 e 0.3, respectivamente. FR (Fator reumatóide).

[00110] As amostras investigadas apresentaram valor de p confiável (inferior a 0,05) para pelo menos um antígeno, indicando que há baixa probabilidade de que sejam amostras negativas.

[00111] Devido aos grandes volumes de amostra requeridos para a realização dos ensaios de CMIA, não foi possível analisar as amostras 1, 30, 21, 11 e H10. A avaliação das amostras pelo sistema Architect permitiu a confirmação da amostra E5 como IgM positiva. Apesar da existência de variações entre lisados e extratos utilizados entre diferentes ensaios, resultados negativos para os testes do sistema Architect/IgG eram aguardados, já que um lisado de *T. gondii* é utilizado como fase de captura de anticorpos, assim como no teste do sistema VIDAS/IgG e IgM. Contudo, o teste de detecção de IgM do sistema Architect utiliza os antígenos recombinantes p35 e SAG1 de *T. gondii* como moléculas de captura.

[00112] Com base nestes dados, as amostras suspeitas como falso-negativas foram excluídas do painel de amostras utilizado nos ensaios das Figuras 4 e 5. As amostras 21 e 11 foram excluídas do painel de amostras dos ensaios, pois foram encontrados valores de p bastante significativo (inferior a 0,001 e 0,05, respectivamente) para outros antígenos de *T. gondii* também avaliados em ensaios não mostrados no presente documento, indicando possível contato prévio com o *T. gondii*.



[00113] Estes resultados em conjunto indicam que o uso combinado de antígenos de *T. gondii* marcadores de fase aguda podem gerar ensaios com maior desempenho, e reduzir o limite de detecção dos ensaios para diagnóstico da toxoplasmose.

[00114] Além do desenvolvimento de sistemas de expressão solúvel de alto rendimento e de altos níveis de purificação, as soluções técnicas desenvolvidas pelos presentes inventores resultaram em antígenos com altos níveis de purificação e estáveis quanto à degradação e agregação após descongelamento, e na substituição de extratos e lisados de *T. gondii* usados em imunoenaios para detecção de anticorpos IgG e IgM específicos por antígenos recombinantes sensíveis e específicos para o rastreio da toxoplasmose.

[00115] As reivindicações a seguir não pretendem, de modo algum, serem limitadoras do escopo da presente invenção. Várias modificações podem ser feitas sem se afastar do espírito e do escopo da presente invenção.

## REFERÊNCIAS

1. COOK, A., J., C.; GILBERT, R., E.; BUFFOLANO, W.; ZUFFEREY, J.; PETERSEN, E.; JENUM, P., A.; FOULON, W.; SEMPRINI, A., E.; DUNN, D., T. Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. *British Medical Journal*, v. 321, n. 7254, p. 142–147, July 2000.

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

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

4. COMMODARO, A., G.; BELFORT, L., N.; RIZZO, L., V.; MUCCIOLI, C.; SILVEIRA, C.; BURNIER JR, M., N.; BELFORT, R., JR.

Ocular toxoplasmosis - an update and review of the literature. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.104, n. 2, mar 2009.

5. FURTADO, J., M.; SMITH, J., R.; BELFORT, R.; GATTEY, J., D.; WINTHROP, K., L. Toxoplasmosis: A Global Threat. Journal of Global Infectious Diseases, v. 3, n. 3, p. 281–284, july 2011.

6. RORMAN, E.; ZAMIR, C., S.; RILKIS, I.; BEN-DAVID, H. Congenital toxoplasmosis prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. Reproductive Toxicology, v. 21, n. 4, p. 458–472, 2006.

7. DUNN, D.; WALLON, M.; PEYRON, F.; PETERSEN, E.; PECKHAM, C.; GILBERT, R. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counseling. The Lancet, v. 353, n. 9167, p. 1829-1833, may 1999.

8. FREEMAN, K.; OAKLEY, L.; POLLAK, A.; BUFFOLANO, W.; PETERSEN, E.; SEMPRINI, A., E.; SALT, A.; GILBERT, R. Association between congenital toxoplasmosis and preterm birth, low birthweight and small for gestational age birth. BJOG: an International Journal of Obstetrics and Gynaecology, v. 112, n. 1, p. 31–37, january 2005.

9. HAVELAAR, A., H.; KEMMEREN, J., M.; KORTBEEK, L., M. Disease Burden of Congenital Toxoplasmosis. Clinical Infectious Diseases, v. 44, n. 11, p. 1467-1474, jun. 2007.

10. MCLEOD, R.; KIEFFER, F.; SAUTTER, M.; HOSTEN, T.; PELLOUX, H. Why prevent, diagnose and treat congenital toxoplasmosis? Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.104, n. 2, jan 2009

11. WALLON, M.; KODJIKIAN, L.; BINQUET, C.; GARWEG, J.; FLEURY, J.; QUANTIN, C.; PEYRON, F. Long-Term Ocular Prognosis in 327 Children With Congenital Toxoplasmosis. Pediatrics, v. 113, n. 6, p. 1567–1572, june 2004.

12. GLASNER, P., D.; SILVEIRA, C.; KRUSZON-MORAN, D.; MARTINS, M., C.; BURNIER, JR., M.; SILVEIRA, S.; CAMARGO, M., E.;

NUSSENBLATT, R., B.; KASLOW, R., A.; BELFORT, JR., R. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. *American Journal of Ophthalmology*, v. 114, n. 2, p. 136-44, august 1992.

13. FIGUEIRÓ-FILHO, E., A.; LOPES, A., H., A.; SENE FONTE, F., R., A.; SOUZA, JR., V., G.; BOTELHO, C., A.; FIGUEIREDO, M., S.; DUARTE, G. Acute toxoplasmosis: study of the frequency, vertical transmission rate and the relationship between maternal-fetal diagnostic tests during pregnancy in a Central-Western state of Brazil. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 27, n. 8, aug. 2005.

14. NASCIMENTO, I., L., O.; CARVALHO, S.; ASFORA, S.; FREIRE, S., M.; SIMÕES, J., M.; SCHAER, R., E.; ROBERTO, M. Estudo da prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em mulheres grávidas no Estado da Bahia. *Rev. Cienc. Med. Biol.*, v. 1, p. 12-15, 2002.

15. REICHE, E., M., V.; MORIMOTO, H., K.; FARIAS, G., N.; HISATSUGU, K., R.; GELLER, L.; GOMES, A., C., L., F.; INOUE, H., Y.; RODRIGUES, G.; TIEMI, M. Prevalence of American trypanosomiasis, syphilis, toxoplasmosis, rubella, hepatitis B, hepatitis C, human immunodeficiency virus infection, assayed through serological tests among pregnant patients, from 1996 to 1998, at the Regional University Hospital Norte do Paraná. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 33, p. 519-527, 2000.

16. SPALDING, S., M.; AMENDOEIRA, M., R., R.; KLEIN, C., H.; RIBEIRO, L., C. Serological screening and toxoplasmosis exposure factors among pregnant women in South of Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 38, n. 2, 2005.

17. VARELLA, I., S.; WAGNER, M., B.; DARELA, A., C.; NUNES, L., M.; MÜLLER, R., W. Prevalência de soropositividade para toxoplasmose em gestantes. *Jornal de Pediatria*, Rio de Janeiro, v. 79, n. 1, p. 69-74, jan 2003.

18. MOZZATTO, L., G.; PROCIANOY, R., S. Incidence of congenital toxoplasmosis in southern Brazil: a prospective study. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 45, n. 3, p. 147-151, may 2003.
19. CARVALHEIRO, C., G.; MUSSI-PINHATA, M., M.; YAMAMOTO, A., Y.; DE SOUZA, C., B., S.; MACIEL, L., M., Z. Incidence of congenital toxoplasmosis estimated by neonatal screening: relevance of diagnostic confirmation in asymptomatic newborn infants. *Epidemiology and Infection*, v. 133, n. 3, p. 485–491, 2005.
20. NETO, E., C.; ANELE, E., RUBIM, R.; BRITES, SCHULTE, J.; BECKER, D.; TUUMINEN, T. High prevalence of congenital toxoplasmosis in Brazil estimated in 3-year prospective neonatal screening study. *International Journal of Epidemiology*, v. 29, n. 5, p. 941-947, 2000.
21. MONTOYA, J., G.; REMINGTON, J., S. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin. Infectious Disease*, v. 47, p. 554–566, 2008.
22. MONTOYA, J., G.; ROSSO, F. Diagnosis and Management of Toxoplasmosis. *Clinics in Perinatology*, v. 32, n. 3, p. 705– 726, 2005.
23. JENUM, A., P.; STRAY-PEDERSEN, B. Development of Specific Immunoglobulins G, M, and A Following Primary *Toxoplasma gondii* Infection in Pregnant Women. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, n. 10, p. 2907-2913, October 1998.
24. KARIM, K., A.; LUDLAM, G., B. The relationship and significance of antibody titres as determined by various serological methods in glandular and ocular toxoplasmosis. *Journal of Clinical Pathology*, v. 28, n. 1, p. 42-49, 1975.
25. VILLARD O., L. BREIT, B. CIMON, J. FRANCK, H. FRICKER-HIDALGO, N. GODINEAU, S. HOUZE, L. PARIS, H. PELLOUX, I. VILLENA, AND E. CANDOLFI. Comparison of four commercially available avidity tests for *Toxoplasma gondii*-specific IgG antibodies. *Clin.*

Vaccine Immunol., v. 20, p. 197–204, 2013.

26. GAY-ANDRIEU F.; FRICKER-HIDALGO, H.; SICKINGER, E.; ESPERN, A.; Brenier-Pinchart, M-P.; Braun, H-B.; Pelloux, H. Comparative evaluation of the ARCHITECT Toxo IgG, IgM, and IgG Avidity assays for anti-Toxoplasma antibodies detection in pregnant women sera. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 65, p. 279–287, 2009.

27. HOTOP A., HLOBIL, H.; GROSS, U. Efficacy of rapid treatment initiation following primary *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin. Infect. Dis.*, v. 54, p. 1545–1552, 2012.

28. FOULON, W.; VILLENA, I.; STRAY-PEDERSEN, B.; DECOSTER A.; LAPPALAINEN, M.; PINON, J., M.; JENUM, P., A.; HEDMAN, K.; NAESSENS, A. Treatment of toxoplasmosis during pregnancy: a multicenter study of impact on fetal transmission and children's sequelae at age 1 year. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, v. 180, n. 2, p. 410-415, february 1999.

29. BEGHETTO, E.; PUCCIA, A.; MINENKOVA, O.; SPADONI, A.; BRUNO, L.; BUFFOLANO, W.; SOLDATI, D.; FELICI, F.; GARGANO, N. Identification of a human immunodominant B-cell epitope within the GRA1 antigen of *Toxoplasma gondii* by phage display of cDNA libraries. *Internal Journal for Parasitology*, v. 31, n. 14, p. 1659-1668, december 2001.

30. CÓCERES, V., M.; BECHER, M., L.; DE NAPOLI, M., G.; CORVI, M., M.; CLEMENTE, M.; ANGEL, S., O. Evaluation of the antigenic value of recombinant *Toxoplasma gondii* HSP20 to detect specific immunoglobulin G antibodies in *Toxoplasma* infected humans. *Experimental Parasitology*, 28 April 2010. V. 126, n. 2, p. 263-266, october 2010.

31. HOLEC-GAŞIOR, L.; KUR, J. *Toxoplasma gondii*: Recombinant GRA5 antigen for detection of immunoglobulin G antibodies using enzyme-linked immunosorbent assay. *Experimental Parasitology*, v. 124, n. 3, p. 272-278, march 2010.

32. HOLEC-GAŚIOR L. *Toxoplasma gondii* Recombinant Antigens as Tools for Serodiagnosis of Human Toxoplasmosis: Current Status of Studies. Clin. Vaccine Immunol. V. 20, n. 9, p. 1343–1351, 2013.

33. SICKINGER E., GAY-ANDRIEU, F., JONAS, G., SCHULTESS, J., STIELER, M., SMITH, D., HAUSMANN, M., STRICKER, R., STRICKER, R., DHEIN, J., BRAUN. H., B. Performance characteristics of the new ARCHITECT Toxo IgG and Toxo IgG Avidity assays. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., v. 62, n. 3, p. 235-44, 2008.

34. BEGHETTO, E.; SPADONI, A.; BRUNO, L.; BUFFOLANO, W.; GARGANO, N. Chimeric Antigens of *Toxoplasma gondii*: Toward Standardization of Toxoplasmosis Serodiagnosis Using Recombinant Products. Journal of Clinical Microbiology, v. 44, n. 6, p. 2133–2140, june 2006.

35. LI, S., GALVAN, G., ARAUJO, F., G., SUZUKI, Y., REMINGTON, J., S., PARMLEY, S. Serodiagnosis of Recently Acquired *Toxoplasma gondii* Infection Using an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with a Combination of Recombinant Antigens. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, v. 7, n. 5, September 2000, p. 781-787.

36. FERRANDIZ, J.; MERCIER, C. ; WALLON, M. ; PICOT, S. ; CESBRON-DELAUW, M. ; PEYRON, F. Limited Value of Assays Using Detection of Immunoglobulin G Antibodies to the Two Recombinant Dense Granule Antigens, GRA1 and GRA6 Nt of *Toxoplasma gondii*, for Distinguishing between Acute and Chronic Infections in Pregnant Women. . Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, v. 11, n. 6, p. 1016–1021, november 2004.

37. HOLEC, L.; GASIOR, A.; BRILLOWSKA-DABROWSKA, A.; KUR, J. *Toxoplasma gondii*: enzyme-linked immunosorbent assay using different fragments of recombinant microneme protein 1 (MIC1) for detection of immunoglobulin G antibodies. Experimental Parasitology, v. 119, n. 1, p.

1-6, may 2008.

38. PFREPPER, K.; ENDERS, G.; GOHL, M.; KRCZAL, D.; HLOBIL, H.; WASSENBERG, D.; SOUTSCHEK, E. Seroreactivity to and Avidity for Recombinant Antigens in Toxoplasmosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 12, n. 8, p. 977– 982, august 2005.

39. SAFFER, L., D.; MERCEREAU-PUIJALON, O.; DUBREMETZ, J., F.; SCHWARTZMAN, J., D. Localization of a *Toxoplasma gondii* rhoptry protein by immunoelectron micro-scropy during and after host cell penetration. *J Protozool.* v. 39, n. 4, p. 526–530, 1992.

40. ARAÚJO P., R., FERREIRA, A., W. High diagnostic efficiency of IgM-ELISA with the use of multiple antigen peptides (MAP1) from *T. gondii* ESA (SAG-1, GRA-1 and GRA-7), in acute toxoplasmosis. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, V. 52, N. 2, Apr. 2010.

41. ARAÚJO P., R., FERREIRA, A., W. Avidity of IgG antibodies against excreted/secreted antigens of *Toxoplasma gondii*: immunological marker for acute recent toxoplasmosis. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, v. 41, n. 2, p. 142-7, 2008.

42. TENTER, A., M., JOHNSON, A., M. 1991. Recognition of recombinant *Toxoplasma gondii* antigens by human sera in an ELISA. *Parasitol. Res.*, v. 77, p. 197–203.

43. JACOBS, D.; VERCAMMEN, M.; SAMAN, E. Evaluation of Recombinant Dense Granule Antigen 7 (GRA7) of *Toxoplasma gondii* for Detection of Immunoglobulin G Antibodies and Analysis of a Major Antigenic Domain. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 6, n. 1, p. 24-29, january 1999.

44. LECORDIER, L. ; FOURMAUX, M. ; MERCIER, C. ; DEHECQ, E. ; MASY, E. ; CESBRON-DELAUW, M. Enzyme-Linked Immunosorbent Assays Using the Recombinant Dense Granule Antigens GRA6 and GRA1 of *Toxoplasma gondii* for Detection of Immunoglobulin G Antibodies. *Clinical*

and Diagnostic Laboratory Immunology, v. 7, n. 4, p. 607-611, July 2000.

45. AUBERT, D.; MAINE, G., T.; VILLENA, I.; HUNT, J., C.; HOWARD, L.; SHEU, M.; BROJANAC, S.; CHOVAN, L., E.; NOWLAN, S., F.; PINON, J., M. Recombinant Antigens To Detect *Toxoplasma gondii*-Specific Immunoglobulin G and Immunoglobulin M in Human Sera by Enzyme Immunoassay. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, n. 3, p. 1144-1150, March 2000.

46. NIGRO, M.; GUTIERREZ, A.; HOFFER, A., M.; CLEMENTE, M.; KAUFER, F.; CARRAL, L.; MARTIN, V.; GUARNERA, E., A.; ANGELA, S., O. Evaluation of *Toxoplasma gondii* recombinant proteins for the diagnosis of recently acquired toxoplasmosis by an immunoglobulin G analysis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 47, n. 4, p. 609-613, 2003.

47. PIETKIEWICZ, H.; HISZCZYŃSKA-SAWICKA, E.; KUR, J.; PETERSEN, E.; NIELSEN, H., V.; STANKIEWICZ, M.; ANDRZEJEWSKA, I.; MYJAK, P. Usefulness of *Toxoplasma gondii*-Specific Recombinant Antigens in Serodiagnosis of Human Toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 4, p. 1779-1781, April 2004.

48. CÓCERES, V., M.; BECHER, M., L.; DE NAPOLI, M., G.; CORVI, M., M.; CLEMENTE, M.; ANGEL, S., O. Evaluation of the antigenic value of recombinant *Toxoplasma gondii* HSP20 to detect specific immunoglobulin G antibodies in *Toxoplasma* infected humans. *Experimental Parasitology*, 28 April 2010. V. 126, n. 2, p. 263-266, October 2010.

49. HOLEC-GĄSIOR, L.; FERRA, B.; DRAPAŁA, D.; LAUTENBACH, D.; KUR, J. A New MIC1-MAG1 Recombinant Chimeric Antigen Can Be Used Instead of the *Toxoplasma gondii* Lysate Antigen in Serodiagnosis of Human Toxoplasmosis. *Clinical Vaccine Immunol.*, v. 19, n. 1, p. 57-63, January 2012.

50. YAN, H.; YAN, H.; TAO, Y.; CHEN, H.; LI, G.; GONG, W.; JIAO, H.; TIAN, F.; JI, M. Application and expression of *Toxoplasma gondii*



surface antigen 2 (SAG2) and rhoptry protein 2 (ROP2) from recombinant *Escherichia coli* strain. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 106, n. 6, p. 356-362, 2012.

51. HOLEC-GAŚSIOR, L.; FERRA, B.; HISZCZYŃSKA-SAWICKA, E.; KUR, J. The optimal mixture of *Toxoplasma gondii* recombinant antigens (GRA1, P22, ROP1) for diagnosis of ovine toxoplasmosis. *Vet Parasitol.* v. 206, n. 3–4, p. 146–152, 2014.

52. HOLEC-GAŚSIOR, L.; FERRA, B.; DRAPAŁA, D. MIC1-MAG1-SAG-1 chimeric protein, a most effective antigen for detection of human toxoplasmosis. *Clin. Vaccine Immunol.*, v. 19, p. 1977–1979, 2012.

53. HOLEC-GAŚSIOR, L.; KUR, J.; HISZCZYŃSKA-SAWICKA, E. GRA2 and ROP1 Recombinant Antigens as Potential Markers for Detection of *Toxoplasma gondii*-Specific Immunoglobulin G in Humans with Acute Toxoplasmosis. *Clinical and Vaccine Immunology*, p. 510-514, v. 16, n. 4, 2009.

54. VALLOCHI, A., L.; MUCCIOLI, C.; MARTINS, M., C.; SILVEIRA, C.; BELFORT, R.; RIZZO, L., V. The genotype of *Toxoplasma gondii* strains causing ocular toxoplasmosis in humans in Brazil. *American Journal of Ophthalmology*, v. 139, n. 2, p. 350-351, 2005.

55. PENA, H., F., J.; GENNARI, S., M.; DUBEY, J., P.; SU, C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *International Journal for Parasitology*, v. 38, n. 5, p. 561-569, 2008.

56. KHAN, A.; JORDAN, C.; MUCCIOLI, C.; VALLOCHI, A., L.; RIZZO, L., V.; BELFORT J., R., R.; VITOR, R., W., A.; SILVEIRA, C.; SIBLEY, L., D. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis. *Brazil Emerging Infectious Disease*, v. 12, n. 6, p. 942–949, 2006.

57. FERREIRA, A., M.; VITOR, R., W., A.; GAZZINELLI, R., T.; MELO, M., N. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma*

*gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 6, n. 1, p. 22-31, 2006.

58. FERREIRA, I., M., R.; VIDAL, J., E.; COSTA-SILVA, T., A.; MEIRA, C., S.;HIRAMOTO, R., M.; OLIVEIRA, A., C., P.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V., L. *Toxoplasma gondii*: Genotyping of strains from Brazilian AIDS patients with cerebral toxoplasmosis by multilocus PCR-RFLP markers. *Experimental Parasitology*, v. 118, n. 2, p. 221-227, 2008.

## REIVINDICAÇÕES

1. Antígeno recombinante ou sintético, caracterizado pelo fato de ser selecionado do grupo consistindo em GRA7, ROPI, p35 e GRA6 de *Toxoplasma gondii*, ou fragmentos antigênicos dos mesmos.

2. Antígeno recombinante ou sintético de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende os aminoácidos 19-236 de GRA7; os aminoácidos 85-378 de ROPI; os aminoácidos 26-179 de p35; e os aminoácidos 30-230 de GRA6.

3. Antígeno recombinante ou sintético de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que os aminoácidos 19-236 de GRA7 são representados por SEQ ID NO:2.

4. Antígeno recombinante ou sintético de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que os aminoácidos 85-378 de ROPI são representados por SEQ ID NO:4.

5. Antígeno recombinante ou sintético de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que os aminoácidos 26-179 de p35 são representados por SEQ ID NO:6.

6. Antígeno recombinante ou sintético de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de ser purificado.

7. Sequência nucleotídica, caracterizada pelo fato de que codifica os antígenos como definidos na reivindicação 1.

8. Sequência nucleotídica, caracterizada pelo fato de que codifica os antígenos como definidos na reivindicação 2.

9. Sequência nucleotídica de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que compreende SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:5 ou SEQ ID NO:7.

10. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende os antígenos GRA7, ROPI e p35 de *Toxoplasma gondii*, ou fragmentos antigênicos dos mesmos.

11. Composição de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que os antígenos compreendem os aminoácidos 19-236 de GRA7; os aminoácidos 85-378 de ROPI; e os aminoácidos 26-179 de p35.

12. Composição de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que os aminoácidos 19-236 de GRA7 são representados por SEQ ID NO:2.

13. Composição de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que os aminoácidos 85-378 de ROPI são representados por SEQ ID NO:4.

14. Composição de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que os aminoácidos 26-179 de p35 são representados por SEQ ID NO:6.

15. Composição de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de ser utilizada em um método para detecção de IgG anti-*Toxoplasma gondii*.

16. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende os antígenos GRA7, ROPI e GRA6 de *Toxoplasma gondii*, ou fragmentos antigênicos dos mesmos.

17. Composição de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que os antígenos compreendem os aminoácidos 19-236 de GRA7; os aminoácidos 85-378 de ROPI; e os aminoácidos 30-230 de GRA6.

18. Composição de acordo com a reivindicação 17, caracterizada pelo fato de que os aminoácidos 19-236 de GRA7 são representados por SEQ ID NO:2.

19. Composição de acordo com a reivindicação 17, caracterizada pelo fato de que os aminoácidos 85-378 de ROPI são representados por SEQ ID NO:4.

20. Composição de acordo com a reivindicação 17, caracterizada pelo fato de que os aminoácidos 30-230 de GRA6 são representados por SEQ ID NO:8.

21. Composição de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelo fato de ser utilizada em um método para detecção de IgM.

22. Composição de acordo com a reivindicação 10 ou 16, caracterizada por ser estabilizada.

23. Composição de acordo com a reivindicação 10 ou 16, caracterizada pelo fato dos antígenos estarem acoplados às microesferas.

24. Kit para detecção de IgG anti-*Toxoplasma gondii*, caracterizado pelo fato de compreender:

- (A) uma composição conforme definida em qualquer uma das reivindicações de 10 a 15 e 23 a 24;
- (B) um meio de detecção para detectar o complexo antígeno anticorpo; e
- (C) instruções de uso.

25. Kit para detecção de IgM anti-*Toxoplasma gondii*, caracterizado pelo fato de compreender:

- (A) uma composição conforme definida em qualquer uma das reivindicações de 16 a 24;
- (B) um meio de detecção para detectar o complexo antígeno anticorpo; e
- (C) instruções de uso.

26. Método para detecção de IgG anti-*Toxoplasma gondii*, caracterizado pelo fato de compreender as etapas de:

- (a) prover uma composição de antígenos conforme definida em qualquer uma das reivindicações de 10 a 15 e 23 a 24;
- (b) contatar a composição de antígenos com a amostra a ser testada por um tempo suficiente e sob condições suficientes

para formação de complexos anticorpo/ antígeno; e

- (c) detectar o complexo antígeno/ anticorpo formado na etapa (b), pela adição de um meio de detecção, capaz de gerar um sinal detectável na presença do referido complexo antígeno/ anticorpo.

27. Método para detecção de IgM anti-*Toxoplasma gondii*, caracterizado pelo fato de compreender as etapas de:

- (d) prover uma composição de antígenos conforme definida em qualquer uma das reivindicações de 16 a 24;
- (e) contatar a composição de antígenos com a amostra a ser testada por um tempo suficiente e sob condições suficientes para formação de complexos anticorpo/ antígeno; e
- (f) detectar o complexo antígeno/ anticorpo formado na etapa (b), pela adição de um meio de detecção, capaz de gerar um sinal detectável na presença do referido complexo antígeno/ anticorpo.

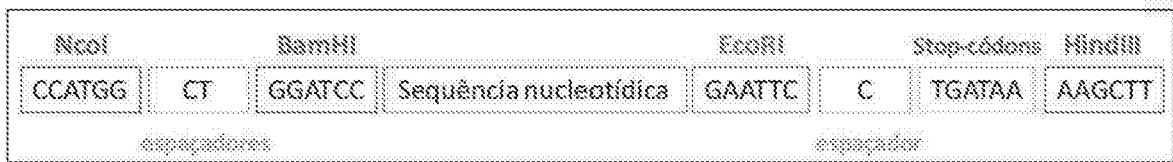


FIGURA 1

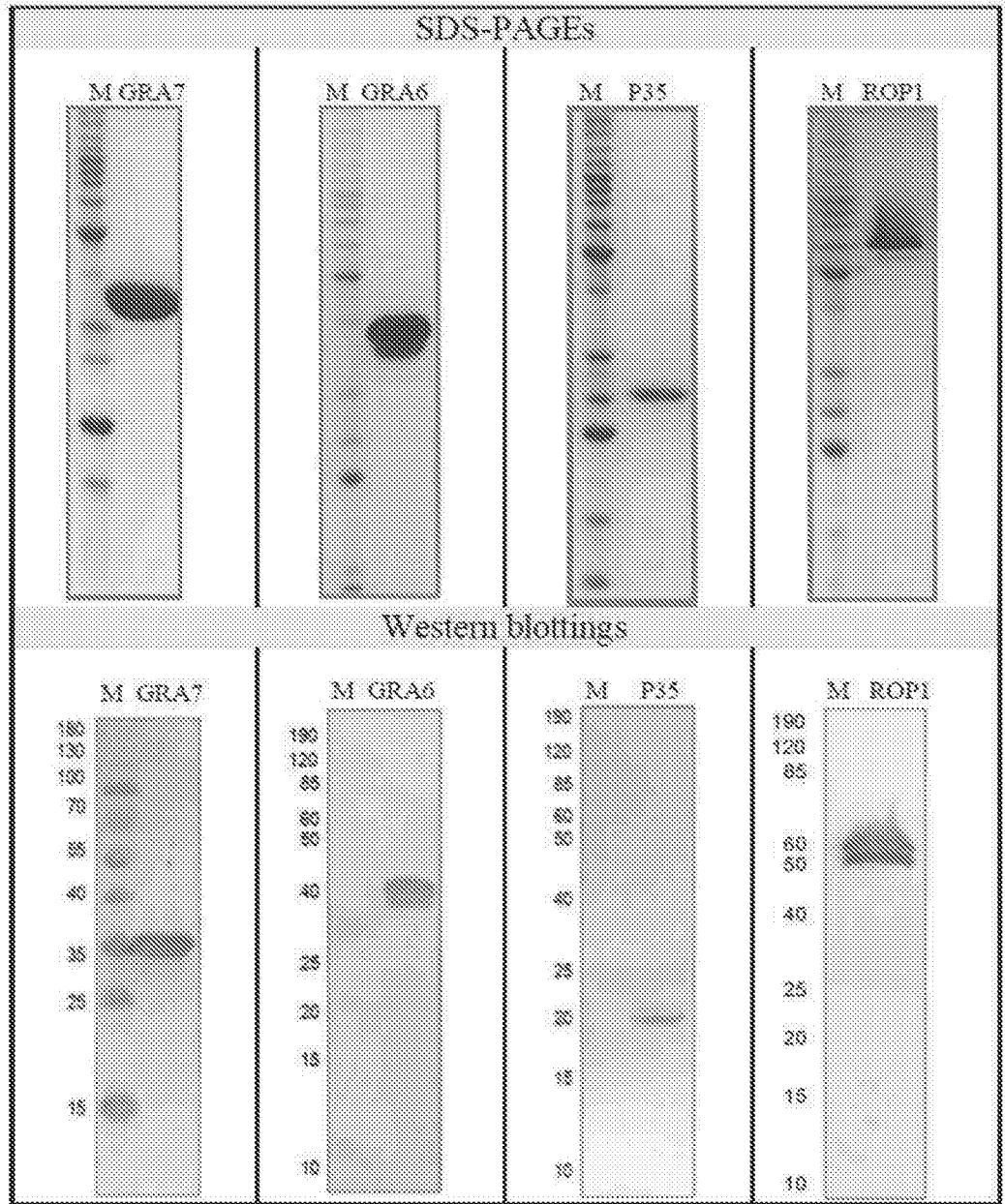


FIGURA 2



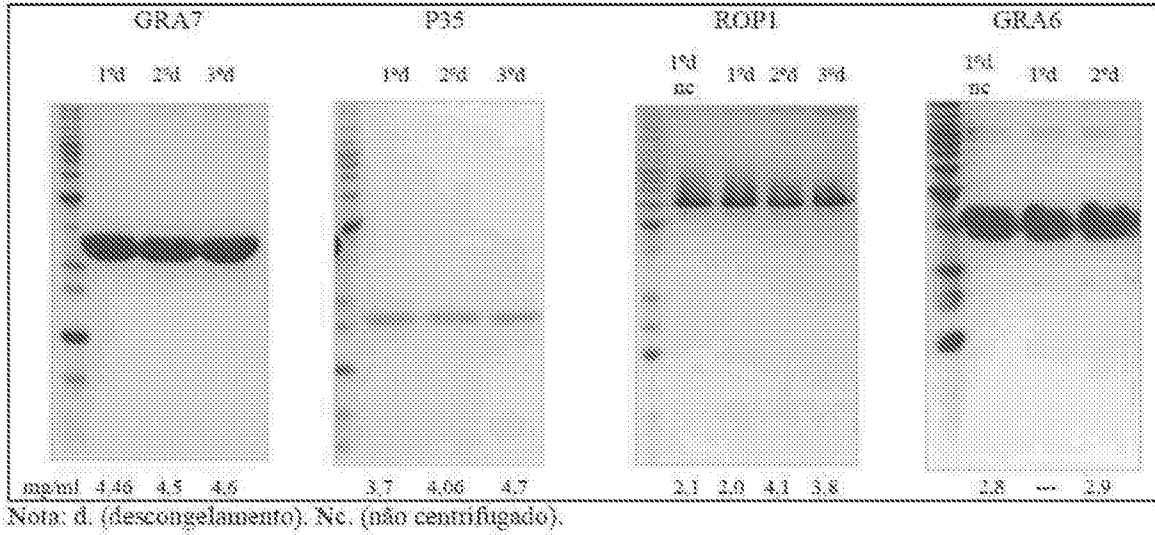
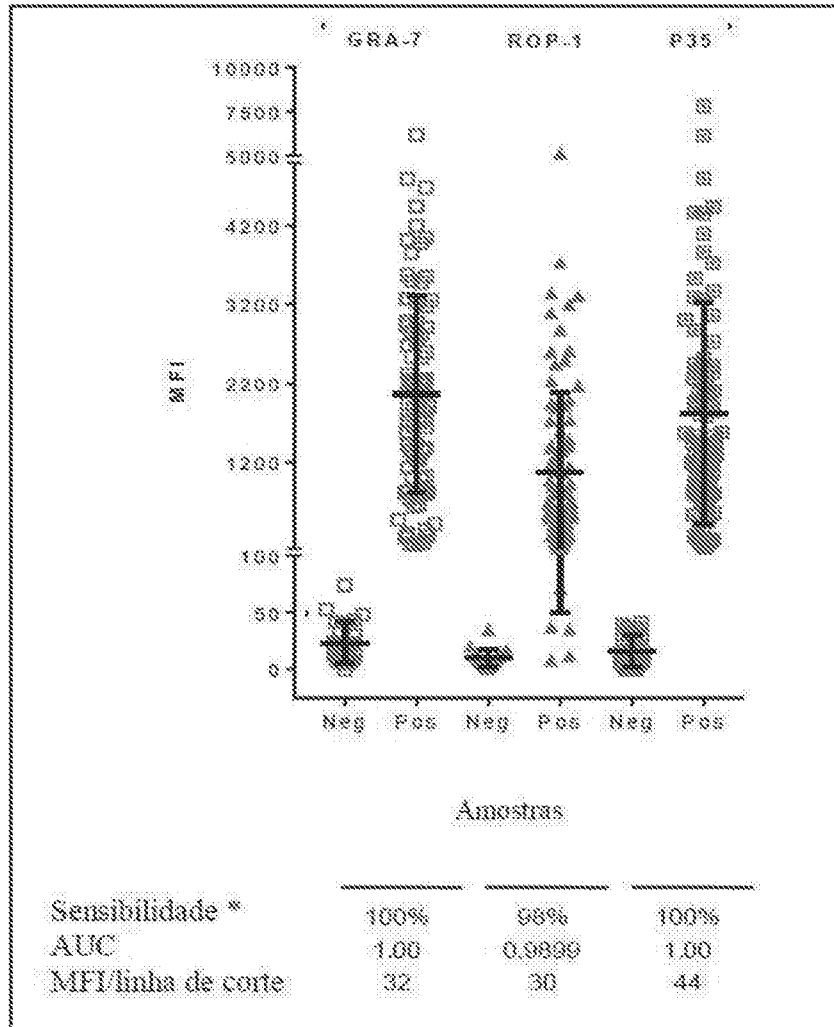
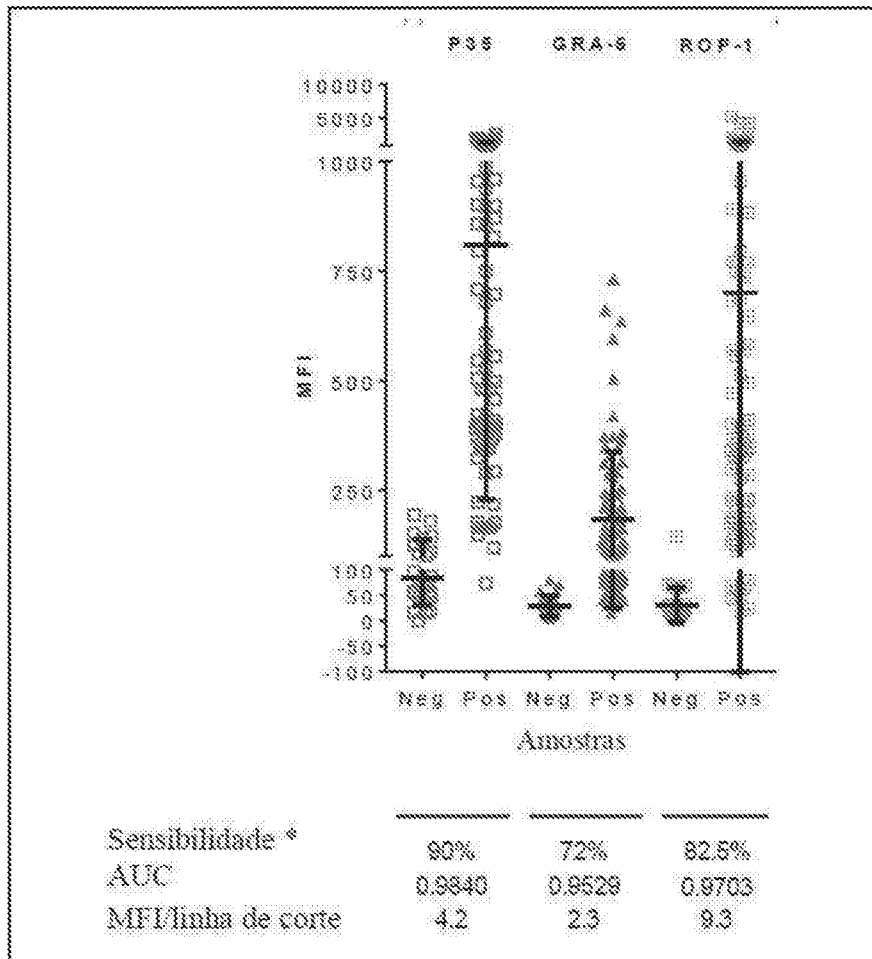


FIGURA 3



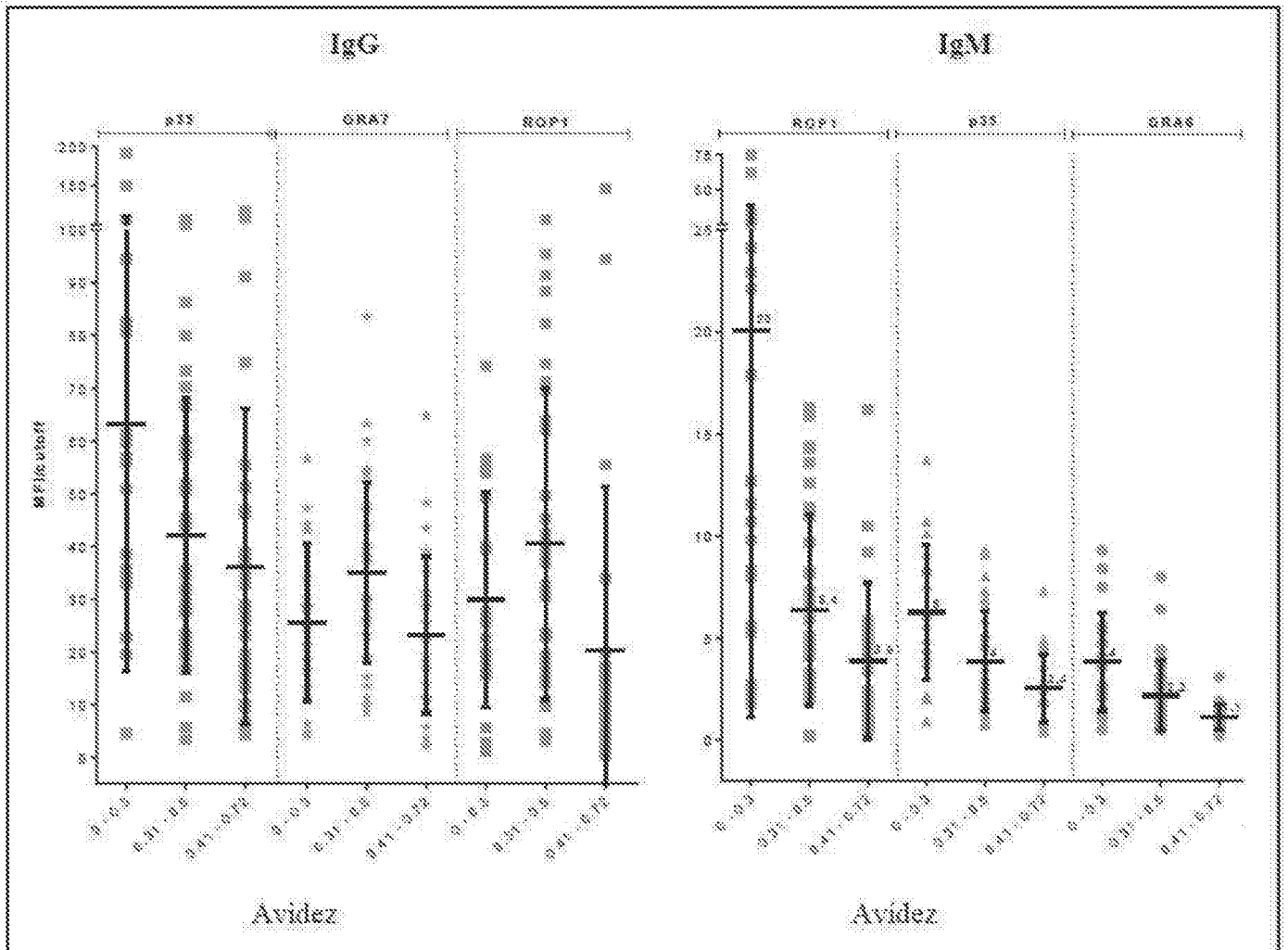
Nota: AUC (área sobre a curva ROC). \* especificidade de 100% para todos os ensaios.  
 Neg. e Pos. (amostras IgG anti-*T. gondii* positivas e negativas, respectivamente).

FIGURA 4



Nota: AUC (área sobre a curva ROC). \* especificidade de 100% para todos os ensaios.  
 Neg. e Pos. (amostras IgM anti-*T. gondii* positivas e negativas, respectivamente).

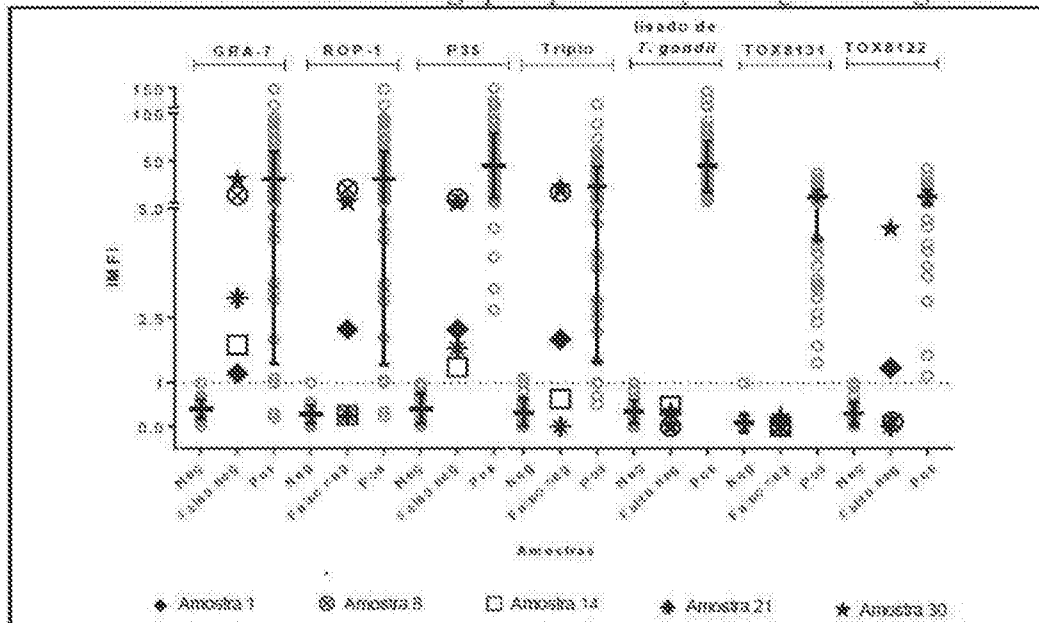
FIGURA 5



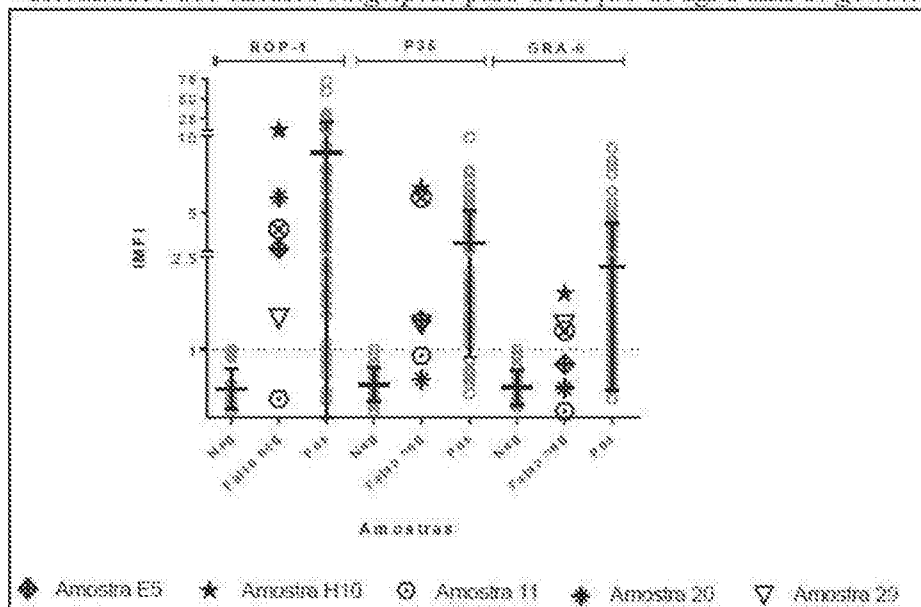
Nota: IMFI (índice de MFI, que corresponde ao valor do MFI das amostras positivas pela linha de corte definida para cada antígeno).

FIGURA 6

Resultados dos ensaios *singleplex* para detecção de IgG anti-*T. gondii*



Resultados dos ensaios *singleplex* para detecção de IgM anti-*T. gondii*



Nota: MFI (índice de MFI MFI de cada amostra positiva dividido pela linha de corte do ensaio). Pos. (positiva), Neg. (negativa), False neg (amostras investigadas como falso-negativas).

FIGURA 7

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2018/050079

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**C07K 14/45 (2006.01), C12N 15/30 (2006.01), A61K 39/002 (2006.01), G01N 33/569 (2006.01), C07K 17/08 (2006.01)**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

**Base de patentes do INPI-BR (SINPI), Plataforma Lattes (<http://lattes.cnpq.br/>)**

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

**GENESEQ, USGENE, WOGENE, GenBank, EPODOC**

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FISCHER, H. G. et al. GRA7, an excretory 29 kDa Toxoplasma gondii dense granule antigen released by infected host cells. Molecular and Biochemical Parasitology. 1998. Vol. 91, No. 2, pages: 251-262. <a href="https://doi.org/10.1016/S0166-6851(97)00227-2">https://doi.org/10.1016/S0166-6851(97)00227-2</a> . Abstract, Figure 2. -----	1 e 2 (parcialmente), 3, 6 a 9 (parcialmente).
X	US6329157 BI (ABBOTT LAB [US]) 11 december 2001 (2001-12-11) Abstract, line 60 in col. 2 line 10 in col. 3, Exemples 9 and 12, Figure 3, SEQ ID n°s 26 e 27. -----	1 e 2 (parcialmente), 3, 6 a 9 (parcialmente).
X	US6172192 BI (INNOGENETICS NV [US]) 09 january 2001 (2001-01-09) Abstract, Exemple 2, claim 1, SEQ ID ri -----	1 e 2 (parcialmente), 3, 6 a 9 (parcialmente).

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10/05/2018

Date of mailing of the international search report

28/06/2018

Name and mailing address of the ISA/BR

Rua Sao Bento nº 1, 17º andar  
cep: 20090-010, Centro - Rio de Janeiro/RJ

Facsimile No. fax:

+55 21 3037-3663

Authorized officer

Flávia Riso Rocha

+55 21 3037-3493/3742

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2018/050079

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>HOLEC-GASIOR, L. Toxoplasma gondii recombinant antigens as tools for serodiagnosis of human toxoplasmosis: current status of studies. Clin Vaccine Immunol. 2013. Vol. 20, No. 9, pages: 1343-51. doi: 10.1128/CVI.00117-13. Cited in the description. Abstract, last paragraph in page 1343, Tables 1 to 3.</p> <p>-----</p>	<p>1 e 2 (parcialmente), 3, 6 a 9 (parcialmente).</p>
X	<p>ARAÚJO, P. R. B. &amp; FERREIRA, A. W. High diagnostic efficiency of IgM-ELISA with the use of multiple antigen peptides (MAPI) from T. gondii ESA (SAG-1, GRA-1 and GRA-7), in acute toxoplasmosis. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo. 2010. Vol. 52, No. 2. <a href="http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652010000200001">http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652010000200001</a>. Cited in the description. Abstract, seção "Materiais e Métodos", Tabela 1.</p> <p>-----</p>	<p>1 e 2 (parcialmente), 3, 6 a 9 (parcialmente).</p>
X	<p>AUBERT, D. et al. Recombinant Antigens To Detect Toxoplasma gondii-Specific Immunoglobulin G and Immunoglobulin M in Human Sera by Enzyme Immunoassay J Clin Microbiol. 2000. Vol. 38, No. 3, pages: 1144-1150. PMID: 10699010. Cited in the description. Abstract, seção "Materiais e Métodos", segunda col. in page 1148, Tables I, 2 and 4.</p> <p>-----</p>	<p>1 e 2 (parcialmente), 3, 6 a 9 (parcialmente).</p>
P, A	<p>BASCHIROTTI, P. T. et al. Preliminary multiplex microarray IgG immunoassay for the diagnosis of toxoplasmosis and rubella. Mem Inst Oswaldo Cruz. Junho de 2017. Vol. 112, No. 6, pages: 428-436 doi: 10.1590/0074-02760160509. Abstract, seção "Materiais e Métodos".</p> <p>-----</p>	<p>1 e 2 (parcialmente), 3, 6 a 9 (parcialmente).</p>

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The present invention relates to the development of combinations of antigens (comprising the antigens GRA7, ROP1, p35 and GRA6, or portions thereof) produced recombinantly or synthetically, for use in a method of immunodiagnosis which makes it possible to distinguish between the acute phase and the chronic phase of toxoplasmosis.

The claimed subject matter includes a recombinant antigen selected from GRA7, ROP1, p35 and GRA6 or their antigen fragments, a nucleotide sequence which codes for the antigen, a composition comprising a combination of the antigens GRA7, ROP1 and p35 (or their antigen fragments), a composition comprising a combination of the antigens GRA7, ROP1 and GRA6 (or their antigen fragments), a kit comprising said compositions, and a method for detecting *Toxoplasma gondii* IgG or IgM.

**(See extra sheet)**

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1 and 2 (in part), 6 to 9 (in part).

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.



The antigens GRA7, ROP1, p35 and GRA6 were selected on the basis of different criteria, such as performance in published immunoassays, presence of B-cell epitopes, and presence in the infectious phases and in different strains (description, paragraph [0076]). However, these antigens merely issue from the same selection process, and it is not possible to identify any structural similarity between these sequences, or groups of these sequences.

The sequences relating to the above antigens could be regarded as having the same or a corresponding technical feature if they had a common property or activity and shared a common significant structural element essential to said common property or activity. Although all of the sequences share specificity in the serodiagnosis of toxoplasmosis, it is not possible to identify a significant structural element in common between these sequences and, therefore, they do not share a common technical feature.

In addition to the antigens GRA7, ROP1, p35 and GRA6 (and the subject matter related thereto), another inventive concept contained in the present international application relates to compositions containing the antigens GRA7, ROP1 and p35 (or their fragments), or to a combination containing GRA7, ROP1 and GRA6 (or their fragments), each one of these specific combinations of antigens allowing a specific use (the first being used in the detection of IgG antibodies to *Toxoplasma gondii*, and the second for detecting IgM antibodies to *Toxoplasma gondii*). These combinations have in common the fact that they contain the antigens GRA7 and ROP1 and are used in the immunodiagnosis of *Toxoplasma*. However, such a feature is already known from the prior art, as illustrated by document US6329157 B1. Said document discloses antigens for use in detecting IgM and/or IgG antibodies to *Toxoplasma gondii*, as well as combinations of said antigens, such as a combination of the antigens GRA7 (p29), p35 and ROP1 (p66) (abstract, and column 2, lines 60 to 65). Example 12 of D1 relates to the preparation of an antigen composition for detecting *Toxoplasma* specific IgG and IgM, containing the antigens GRA7 (p29), p30 and p35, or GRA7 (p29), p35 and ROP1 (p66). Thus, the common technical feature among claims 10 and 16 and their related claims is not a technical feature that defines a contribution over the prior art, constituting distinct inventive concepts.

Therefore, the present international application does not relate to a single invention or to a group of inventions so linked as to form a single inventive concept, and thus is not in compliance with PCT Rule 13.

The subject matter of the international application can be grouped into 6 inventions, as specified below:

- invention 1: GRA7 antigen or antigen fragments and its encoding nucleotide sequence - claims 1 and 2 (in part), 3, 6 to 9 (in part);
- Invention 2: ROP1 antigen or antigen fragments and its encoding nucleotide sequence - claims 1 and 2 (in part), 4, 6 to 9 (in part);
- Invention 3: p35 antigen or antigen fragments and its encoding nucleotide sequence - claims 1 and 2 (in part), 5, 6 to 9 (in part);
- Invention 4: GRA6 antigen or antigen fragments and its encoding nucleotide sequence - claims 1 and 2 (in part), 6 to 9 (in part);

- Invention 5: composition comprising the antigens GRA7, ROP1 and p35 or their antigen fragments, kit for detecting IgG comprising said composition, and method for detecting IgG using said composition - claims 10 to 15, 22 and 23 (in part), 24 and 26;
- Invention 6: composition comprising the antigens GRA7, ROP1 and GRA6 or their antigen fragments, kit for detecting IgM comprising said composition, and method for detecting IgM using said composition - claims 16 to 21, 22 and 23 (in part), 25 and 27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
Information on patent family members

International application No.

PCT/BR2018/050079

US6329157 B1

2001-12-11

AT530572 T  
CA2333598 A1  
CA2333598 C  
EP1082343 A2  
EP2062913 A1  
EP2062913 B1  
ES2373928 T3  
US6221619 B1  
US2002025542 A1  
US2003119053 A1  
WO9961906 A2  
WO9961906 A3

2011-11-15  
1999-12-02  
2009-10-13  
2001-03-14  
2009-05-27  
2011-10-26  
2012-02-10  
2001-04-24  
2002-02-28  
2003-06-26  
1999-12-02  
2000-05-04

-----  
US6172192 B1

-----  
2001-01-09

-----  
AU1596897 A  
AU722103 B2  
CA2242200 A1  
EP0877809 A1  
JP2000506376 A  
WO9727300 A1

-----  
1997-08-20  
2000-07-20  
1997-07-31  
1998-11-18  
2000-05-30  
1997-07-31

## A. CLASSIFICAÇÃO DO OBJETO

C07K 14/45 (2006.01), C12N 15/30 (2006.01), A61K 39/002 (2006.01), G01N 33/569 (2006.01), C07K 17/08 (2006.01)

De acordo com a Classificação Internacional de Patentes (IPC) ou conforme a classificação nacional e IPC

## B. DOMÍNIOS ABRANGIDOS PELA PESQUISA

Documentação mínima pesquisada (sistema de classificação seguido pelo símbolo da classificação)

Documentação adicional pesquisada, além da mínima, na medida em que tais documentos estão incluídos nos domínios pesquisados

**Base de patentes do INPI-BR (SINPI), Plataforma Lattes (<http://lattes.cnpq.br/>)**

Base de dados eletrônica consultada durante a pesquisa internacional (nome da base de dados e, se necessário, termos usados na pesquisa)

**GENESEQ, USGENE, WOGENE, GenBank, EPODOC**

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações Nº
X	FISCHER, H. G. <i>et al.</i> GRA7, an excretory 29 kDa <i>Toxoplasma gondii</i> dense granule antigen released by infected host cells. <i>Molecular and Biochemical Parasitology</i> . 1998. Vol. 91, No. 2, páginas: 251-262. <a href="https://doi.org/10.1016/S0166-6851(97)00227-2">https://doi.org/10.1016/S0166-6851(97)00227-2</a> . Resumo, Figura 2.	1 e 2 (parcialmente), 3, 6 a 9 (parcialmente).
X	US6329157 B1 (ABBOTT LAB [US]) 11 dezembro 2001 (2001-12-11) Resumo, linha 60 da coluna 2 à linha 10 da coluna 3, Exemplos 9 e 12, Figura 3, SEQ ID nºs 26 e 27.	1 e 2 (parcialmente), 3, 6 a 9 (parcialmente).
X	US6172192 B1 (INNOGENETICS NV [US]) 09 janeiro 2001 (2001-01-09) Resumo, Exemplo 2, reivindicação 1, SEQ ID nºs 1 e 2.	1 e 2 (parcialmente), 3, 6 a 9 (parcialmente).

 Documentos adicionais estão listados na continuação do quadro C Ver o anexo de famílias das patentes

\* Categorias especiais dos documentos citados:

"A" documento que define o estado geral da técnica, mas não é considerado de particular relevância.

"E" pedido ou patente anterior, mas publicada após ou na data do depósito internacional

"L" documento que pode lançar dúvida na(s) reivindicação(ões) de prioridade ou na qual é citado para determinar a data de outra citação ou por outra razão especial

"O" documento referente a uma divulgação oral, uso, exibição ou por outros meios.

"P" documento publicado antes do depósito internacional, porém posterior a data de prioridade reivindicada.

"T" documento publicado depois da data de depósito internacional, ou de prioridade e que não conflita como depósito, porém citado para entender o princípio ou teoria na qual se baseia a invenção.

"X" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada nova e não pode ser considerada envolver uma atividade inventiva quando o documento é considerado isoladamente.

"Y" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada envolver atividade inventiva quando o documento é combinado com outro documento ou mais de um, tal combinação sendo óbvia para um técnico no assunto.

"&amp;" documento membro da mesma família de patentes.

Data da conclusão da pesquisa internacional

10/05/2018

Data do envio do relatório de pesquisa internacional:

28/06/2018

Nome e endereço postal da ISA/BR


 INSTITUTO NACIONAL DA  
 PROPRIEDADE INDUSTRIAL  
 Rua Sao Bento nº 1, 17º andar  
 cep: 20090-010, Centro - Rio de Janeiro/RJ

Nº de fax:

+55 21 3037-3663

Funcionário autorizado

Flávia Riso Rocha

Nº de telefone:

+55 21 3037-3493/3742

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações Nº
X	<p>HOLEC-GASIOR, L. <i>Toxoplasma gondii</i> recombinant antigens as tools for serodiagnosis of human toxoplasmosis: current status of studies. Clin Vaccine Immunol. 2013. Vol. 20, No. 9, páginas: 1343-51. doi: 10.1128/CVI.00117-13.</p> <p>Citado na descrição.</p> <p>Resumo, último parágrafo da página 1343, Tabelas 1 a 3.</p> <p>-----</p>	<p>1 e 2 (parcialmente), 3, 6 a 9 (parcialmente).</p>
X	<p>ARAÚJO, P. R. B. &amp; FERREIRA, A. W. High diagnostic efficiency of IgM-ELISA with the use of multiple antigen peptides (MAP1) from <i>T. gondii</i> ESA (SAG-1, GRA-1 and GRA-7), in acute toxoplasmosis. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo. 2010. Vol. 52, No. 2. <a href="http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652010000200001">http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652010000200001</a>.</p> <p>Citado na descrição.</p> <p>Resumo, seção “Materiais e Métodos”, Tabela 1.</p> <p>-----</p>	<p>1 e 2 (parcialmente), 3, 6 a 9 (parcialmente).</p>
X	<p>AUBERT, D. <i>et al.</i> Recombinant Antigens To Detect <i>Toxoplasma gondii</i>-Specific Immunoglobulin G and Immunoglobulin M in Human Sera by Enzyme Immunoassay. J Clin Microbiol. 2000. Vol. 38, No. 3, páginas: 1144–1150. PMID: 10699010.</p> <p>Citado na descrição.</p> <p>Resumo, seção “Materiais e Métodos”, segunda coluna da página 1148, Tabelas 1, 2 e 4.</p> <p>-----</p>	<p>1 e 2 (parcialmente), 3, 6 a 9 (parcialmente).</p>
P, A	<p>BASCHIROTTI, P. T. <i>et al.</i> Preliminary multiplex microarray IgG immunoassay for the diagnosis of toxoplasmosis and rubella. Mem Inst Oswaldo Cruz. Junho de 2017. Vol. 112, No. 6, página: 428-436. doi: 10.1590/0074-02760160509.</p> <p>Resumo, seção “Materiais e Métodos”.</p> <p>-----</p>	<p>1 e 2 (parcialmente), 3, 6 a 9 (parcialmente).</p>

**Quadro II Observações quando certas reivindicações não puderam ser objeto de pesquisa (Continuação do ponto 2 da primeira página)**

Este relatório de pesquisa internacional não foi formulado em relação a certas reivindicações, sob Artigo 17.2).a), pelas seguintes razões:

1.  Reivindicações:

porque estas se referem a matéria na qual esta Autoridade não está obrigada a realizar a pesquisa, a saber:

2.  Reivindicações:

porque estas se referem a partes do pedido internacional que não estão de acordo com os requisitos estabelecidos, de tal forma que não foi possível realizar uma pesquisa significativa, especificamente:

3.  Reivindicações:

porque estas são reivindicações dependentes e não estão redigidas de acordo com a segunda e terceira frase da Regra 6.4.a).

**Quadro III Observações por falta de unidade de invenção (Continuação do ponto 3 da primeira página)**

Esta Autoridade de pesquisa internacional encontrou múltiplas invenções neste depósito internacional, a saber:

A presente invenção refere-se ao desenvolvimento de combinações de antígenos (compreendendo os antígenos GRA7, ROP1, p35 e GRA6, ou porções desses), obtidos de forma recombinante ou sintética, para emprego em método de imunodiagnóstico que permite a distinção entre a fase aguda e a fase crônica da toxoplasmose.

A matéria reivindicada compreende antígeno recombinante selecionado dentre GRA7, ROP1, p35 e GRA6 ou seus fragmentos antigênicos, sequência nucleotídica codificadora do antígeno, composição compreendendo a combinação dos antígenos GRA7, ROP1 e p35 (ou seus fragmentos antigênicos), composição compreendendo a combinação dos antígenos GRA7, ROP1 e GRA6 (ou seus fragmentos antigênicos), kit compreendendo as referidas composições e método para detecção de IgG ou IgM de *Toxoplasma gondii*. **(continua em Quadro Suplementar)**

1.  como todas as taxas requeridas para pesquisas adicionais foram pagas pelo depositante dentro do prazo, este relatório de pesquisa cobre todas as reivindicações pesquisáveis.

2.  como a pesquisa em todas as reivindicações pesquisáveis pode ser feita sem esforço que justifique pagamento adicional, esta Autoridade não solicitou o pagamento de taxas adicionais.

3.  como somente algumas das taxas requeridas para pesquisas adicionais foram pagas pelo depositante dentro do prazo, este relatório de pesquisa internacional cobre somente aquelas reivindicações cujas taxas foram pagas, especificamente as reivindicações:

4.  as taxas de pesquisas adicionais requeridas não foram pagas dentro do prazo pelo depositante. Consequentemente, este relatório de pesquisa internacional se limita à invenção mencionada primeiramente nas reivindicações, na qual é coberta pelas reivindicações:

**1 e 2 (parcialmente), 3, 6 a 9 (parcialmente).**

**Observações da reclamação**

as taxas adicionais para pesquisas foram acompanhadas pela reclamação do depositante e, se for o caso, pelo pagamento da taxa de reclamação.

as taxas adicionais para pesquisa foram acompanhadas pela reclamação do depositante mas a taxa de reclamação não foi paga dentro do prazo especificado pela solicitação.

o pagamento de pesquisas adicionais não acompanha nenhuma reclamação.

**Quadro Suplementar**

**No caso do espaço em qualquer quadro precedente não for suficiente.**

Continuação de: Quadro III

O antígenos GRA7, ROP1, p35 e GRA6 foram selecionados com base em diferentes critérios, tais como desempenho em imunoenaios publicados, presença de epítomos de células B e presença nas fases infectivas e em diferentes cepas (parágrafo [0076] da descrição). Tais antígenos, no entanto, apenas advêm de um mesmo processo de seleção, não sendo possível, no entanto, identificar qualquer similaridade estrutural entre essas sequências, ou grupos dessas sequências.

As sequências referentes aos supracitados antígenos poderiam ser consideradas como apresentando uma característica técnica em comum ou correspondente se apresentassem uma propriedade ou atividade em comum e compartilhassem de um elemento estrutural significativo em comum que fosse essencial à dita propriedade ou atividade em comum. Embora todas essas sequências possuam em comum a especificidade no sorodiagnóstico da toxoplasmose, não é possível evidenciar um elemento estrutural significativo em comum entre essas sequências e, portanto, essas não compartilham de uma característica técnica em comum.

Além dos antígenos GRA7, ROP1, p35 e GRA6 (e matérias a eles relacionadas), outro conceito inventivo contido no presente depósito internacional diz respeito às composições compreendendo os antígenos GRA7, ROP1 e p35 (ou seus fragmentos), ou à combinação compreendendo GRA7, ROP1 e GRA6 (ou seus fragmentos), cada uma dessas combinações específicas de antígenos permitindo uma aplicação específica (sendo a primeira empregada na detecção de IgG anti-*Toxoplasma gondii* e a segunda, para a detecção de IgM anti-*Toxoplasma gondii*). Essas combinações possuem em comum o fato de compreenderem os antígenos GRA7 e ROP1 e serem empregadas no imunodiagnóstico de *Toxoplasma*. Entretanto, tal característica já era conhecida do estado da técnica, como ilustrado pelo documento US6329157 B1. Esse documento divulga antígenos para o emprego na detecção de anticorpos IgM e/ou IgG anti-*Toxoplasma gondii*, bem como combinações desses antígenos, tal como a combinação dos antígenos GRA7 (p29), p35 e ROP1 (p66) (resumo, linhas 60 à 65 da coluna 2). O Exemplo 12 de D1 refere-se ao preparo de uma composição antigênica para detecção de IgG e IgM específicos para *Toxoplasma* compreendendo os antígenos GRA7 (p29), p30 e p35, ou GRA7 (p29), p35 e ROP1 (p66). Desse modo, a característica técnica em comum entre as reivindicações reivindicadas 10 e 16 e reivindicações relacionadas não é uma característica técnica que define uma contribuição ao estado da técnica, constituindo conceitos inventivos distintos.

Logo, o presente depósito internacional não se refere a uma única invenção ou a um grupo de invenções interligadas de modo a constituir um único conceito inventivo, estando, desse modo, em desacordo com a Regra 13 do PCT.

A matéria reivindicada pode ser agrupada em 6 invenções, conforme abaixo especificado:

- **Invenção 1:** antígeno GRA7 ou seus fragmentos antigênicos e sequência nucleotídica codificadora - reivindicações 1 e 2 (parcialmente), 3, 6 a 9 (parcialmente);
- **Invenção 2:** antígeno ROP1 ou seus fragmentos antigênicos e sequência nucleotídica codificadora - reivindicações 1 e 2 (parcialmente), 4, 6 a 9 (parcialmente);
- **Invenção 3:** antígeno p35 ou seus fragmentos antigênicos e sequência nucleotídica codificadora - reivindicações 1 e 2 (parcialmente), 5, 6 a 9 (parcialmente);
- **Invenção 4:** antígeno GRA6 ou seus fragmentos antigênicos e sequência nucleotídica codificadora - reivindicações 1 e 2 (parcialmente), 6 a 9 (parcialmente);
- **Invenção 5:** composição compreendendo os antígenos GRA7, ROP1 e p35 ou seus fragmentos antigênicos, kit para detecção de IgG compreendendo a composição e método para detecção de IgG empregando a composição - reivindicações 10 a 15, 22 e 23 (parcialmente), 24 e 26;
- **Invenção 6:** composição compreendendo os antígenos GRA7, ROP1 e GRA6 ou seus fragmentos antigênicos, kit para detecção de IgM compreendendo a composição e método para detecção de IgM empregando a composição - reivindicações 16 a 21, 22 e 23 (parcialmente), 25 e 27.

**RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL**  
 Informação relativa a membros da família de patentes

Depósito internacional N°  
**PCT/BR2018/050079**

<b>Documentos de patente citados no relatório de pesquisa</b>	<b>Data de publicação</b>	<b>Membro(s) da família de patentes</b>	<b>Data de publicação</b>
US6329157 B1	2001-12-11	AT530572 T CA2333598 A1 CA2333598 C EP1082343 A2 EP2062913 A1 EP2062913 B1 ES2373928 T3 US6221619 B1 US2002025542 A1 US2003119053 A1 WO9961906 A2 WO9961906 A3	2011-11-15 1999-12-02 2009-10-13 2001-03-14 2009-05-27 2011-10-26 2012-02-10 2001-04-24 2002-02-28 2003-06-26 1999-12-02 2000-05-04
----- US6172192 B1	----- 2001-01-09	----- AU1596897 A AU722103 B2 CA2242200 A1 EP0877809 A1 JP2000506376 A WO9727300 A1	----- 1997-08-20 2000-07-20 1997-07-31 1998-11-18 2000-05-30 1997-07-31
-----	-----	-----	-----